

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

**Evaluación de los efectos de residuos de fluvalinato
(piretroide) en la cera de la cámara de cría, sobre larvas de
abejas de la casta obrera (*Apis mellifera* L.)**

Tesis presentada como parte
de los requisitos para optar
al grado de Licenciado en
Agronomía

Carolina Andrea Kauzlarich Rojas

VALDIVIA – CHILE

2008

PROFESOR PATROCINANTE

Miguel Neira C.

Ing. Agr.

PROFESORES INFORMANTES

Claudia Dussaubat A.

Ing. Agr

Marcelo Vera .A.

Ing. Agr

INSTITUTO DE PRODUCCION Y SANIDAD VEGETAL

*"Los sueños son sólo sueños si uno no se
esfuerza por hacerlos realidad"*

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Características de <i>Apis mellifera</i> L.	3
2.1.1	Desarrollo de la cría de abeja obrera	4
2.1.2	Anatomía de la larva de abeja melífera	6
2.2	<i>Varroa destructor</i> Anderson & Trueman	8
2.2.1	Varroa en Chile	9
2.3	Control de varroa	11
2.3.1	Control no químico	12
2.3.2	Control químico	13
2.4	Uso de fluvalinato en el control de varroa	14
2.4.1	Toxicidad del fluvalinato	15
2.5	Residuos de fluvalinato en la cera de abeja	16
2.5.1	Migración de fluvalinato de la cera a la miel	19
2.6	Medicamentos veterinarios de uso apícola registrados en Chile	20
2.6.1	Medicamentos veterinarios de uso apícola, para el control de varroa no registrados en Chile	21
2.7	Origen y composición de la cera de abeja	23
2.7.1	Celdilla del panal	24
3	MATERIAL Y METODO	26
3.1	Ubicación del estudio	26
3.2	Material utilizado en laboratorio	26
3.3	Material para ensayo de campo	26
3.4	Metodología	28

Capítulo		Página
3.4.1	Metodología en laboratorio	28
3.4.2	Metodología del ensayo de campo	28
3.4.2.1	Periodo experimental	28
3.4.2.2	Diseño experimental	28
3.4.2.3	Descripción de los tratamientos	28
3.4.2.3.1	Descripción de las repeticiones	29
3.4.2.4	Orientación de las colmenas	29
3.4.2.5	Ubicación de las colmenas	29
3.4.2.6	Introducción de los marcos experimentales	29
3.4.2.7	Mediciones y observaciones	31
3.4.2.8	Toma de muestras de larvas	31
3.5	Parámetros de las características a evaluar	32
3.6	Análisis estadístico de los datos	33
3.6.1	Variables cuantitativas	33
3.6.2	Variables cualitativas	34
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
4.1	Efectos de los tratamientos en el primer estadio larval en abejas de la casta obrera	36
4.1.1	Peso de larvas	36
4.1.2	Tamaño de larvas	37
4.1.3	Color y aroma de larvas	39
4.1.4	Mortalidad de larvas	39
4.2	Efectos de los tratamientos en el tercer estadio larval en abejas de la casta obrera	41
4.2.1	Peso de larvas	41
4.2.2	Tamaño de larvas	42
4.2.3	Color y aroma de larvas	44
4.2.4	Mortalidad de larvas	44
4.3	Efectos de los tratamientos en el quinto estadio larval en abejas de la casta obrera	45
4.3.1	Peso de larvas	45

Capítulo		Página
4.3.2	Tamaño de larvas	47
4.3.3	Color y aroma de larvas	48
4.3.4	Mortalidad de larvas	49
4.4	Concentración inicial y final de fluvalinato en la cera de la cámara de cría, al finalizar el ensayo de campo	49
4.4.1	Concentración final de fluvalinato en la cera, para los tratamientos 8, 12 y 18 ppm	50
5	CONCLUSIONES	52
6	RESUMEN	53
	SUMMARY	54
7	BIBLIOGRAFIA	55
	ANEXOS	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ciclo biológico y alimentación de la abeja en días	5
2	Migración de fluvalinato desde la cera a la miel	20
3	Medicamentos veterinarios de uso apícola, registrados en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para el control de varroa	21
4	Medicamentos veterinarios de uso apícola, no registrados en el SAG para el control de varroa	22
5	Parámetros a medir en el presente trabajo de investigación	32
6	Pauta de evaluación para aroma	35
7	Pauta de evaluación para color	35
8	Concentraciones iniciales y finales de fluvalinato en las ceras de la cámara de cría	50

INDICE DE FIGURA

Figura		Página
1	Tiempo de vida y tareas de la obrera	3
2	Desarrollo de la cría de abeja en la celdilla del panal. A: huevo en posición vertical. B: larva inclinada en posición horizontal	5
3	Aparato digestivo de una larva de abeja	7
4	Espiráculos de una larva de abeja	7
5	Porcentaje de abejas adultas y crías que presentan algún tipo de enfermedad, entre la IV y X Región, de la temporada 2004-2005.	11
6	Modo de acción del fluvalinato	15
7	Concentraciones de fluvalinato, en ceras entre las Regiones IV y X, en las temporadas 2004-2005	18
8	Geometría tridimensional de celdas de panal de lados opuestos	25
9	Apiario experimental Santa Rosa, Universidad Austral de Chile (UACH)	26
10	Distribución de los tratamientos en campo	29
11	Enumeración de los marcos, en una colmena tipo Langstroth	30
12	Reina joven	31
13	Toma de muestra en el panal de la cámara de cría	32
14	Análisis de cera en laboratorio	33
15	Medición del peso de una larva de primer estadio	36
16	Peso promedio de larvas de primer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.	37
17	Medición de larva de primer estadio	38
18	Tamaño promedio de larvas de primer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.	38

Figura		Página
19	Larva de primer estadio color blanco perlado.	39
20	Medición de mortalidad en larvas de primer estadio	40
21	Mortalidad corregida de larvas de primer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.	40
22	Medición del peso de una larva de tercer estadio	41
23	Peso promedio de larvas del tercer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.	42
24	Medición de larva de tercer estadio	43
25	Tamaño promedio de larvas de tercer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.	43
26	Larva de tercer estadio, de color blanco perlado	44
27	Mortalidad corregida de larvas de tercer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría	45
28	Medición de larva de quinto estadio	45
29	Peso promedio de larvas de quinto estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.	46
30	Medición de larvas de quinto estadio	47
31	Tamaño promedio de larvas de quinto estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.	48
32	Larvas de los cinco estadios, de color blanco perlado	48
33	Mortalidad corregida de larvas de quinto estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría	49

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Clasificación taxonómica de <i>Apis mellifera</i> L	67
2	Clasificación taxonómica de <i>Varroa destructor</i>	67
3	Ciclo de vida de <i>Varroa destructor</i> en <i>Apis mellifera</i> L.	68
4	Características químicas del fluvalinato	69
5	Nivel de contaminación de la cera con residuos de fluvalinato por distintos autores	70
6	Composición química y propiedades físicas de la cera de abejas (<i>Apis mellifera</i> L.)	71
7	Materiales utilizados en laboratorio para la extracción y fortificación de las ceras	72
8	Materiales básicos utilizados en el ensayo de campo	74
9	Equipo del operador	74
10	Materiales para la medición de peso y tamaño de larvas	75
11	Metodología utilizada en laboratorio	75
12	Extracción líquido – líquido de fluvalinato en cera en embudos de decantación	78
13	Procedimiento analítico de extracción y purificación de fluvalinato en muestras de cera	78
14	Temperaturas máximas y mínimas entre los días 4/01 y 1/02 de 2007	79
15	Temperatura de la cámara de cría durante el ensayo de campo	80
16	Granos de café utilizados en la neutralización del aroma	80
17	Cartilla de colores	81
18	Peso de larvas (g), del presente ensayo de campo	82
19	Tamaño de larvas (mm), del presente ensayo de campo	83
20	Color de larvas del presente ensayo de campo	84

Anexo		Página
21	Aroma de larvas del presente ensayo de campo	85
22	Mortalidad de larvas, corregida con la fórmula de Schneider y Orelli	86
23	Estadística descriptiva para pesos de larvas de primer estadio larval	87
24	Prueba de homogeneidad de varianza para pesos de larvas de primer estadio	88
25	Análisis de varianza para pesos de larvas de primer estadio	88
26	Estadística descriptiva para tamaño de larvas de primer estadio	88
27	Prueba de homogeneidad de varianza para tamaño de larvas de primer estadio	89
28	Análisis de varianza para tamaño de larvas de primer estadio	89
29	Test Tukey, para tamaño de larvas de primer estadio	90
30	Prueba de homogeneidad de varianza para la mortalidad de larvas de primer estadio larval	90
31	Análisis de varianza para mortalidad de larvas de primer estadio larval	91
32	Estadística descriptiva para pesos de larvas de tercer estadio	91
33	Prueba de homogeneidad de varianza para el peso de larvas del tercer estadio	91
34	Análisis de varianza para el peso de larvas del tercer estadio	92
35	Test Tukey (Comparaciones múltiples) para peso de larvas del tercer estadio	92
36	Estadística descriptiva para tamaños de larvas de tercer estadio	93
37	Prueba de homogeneidad de varianza para el tamaño de larvas del tercer estadio	93

Anexo		Página
38	Análisis de varianza para el tamaño de larvas del tercer estadio	93
39	Test Dunnett`C (Comparaciones múltiples) para el tamaño de larvas del tercer estadio larval	94
40	Prueba de homogeneidad de varianza para la mortalidad de larvas de tercer estadio	94
41	Análisis de varianza para mortalidad de larvas de tercer estadio	95
42	Estadística descriptiva para pesos de larvas de quinto estadio	95
43	Prueba de homogeneidad de varianza para el peso de larvas de quinto estadio	95
44	Análisis de varianza para pesos de larvas del quinto estadio	96
45	Test Tukey (Comparaciones múltiples) para peso de larvas de quinto estadio	96
46	Estadística descriptiva para tamaño de larvas de quinto estadio	97
47	Prueba de homogeneidad de varianza para el tamaño de larvas de quinto estadio	97
48	Análisis de varianza para el tamaño de larvas de quinto estadio	97
49	Test Dunnett`C para el tamaño de larvas de quinto estadio	98
50	Prueba de homogeneidad de varianza para la mortalidad de larvas de quinto estadio	98
51	Análisis de varianza para mortalidad de larvas de quinto estadio	99
52	Prueba t-student, para el tratamiento 8 ppm	99
53	Prueba t-student, para el tratamiento 12 ppm	99
54	Prueba t-student, para el tratamiento 18 ppm	100
55	Cálculo de la dilución de fluvalinato cera	101

1 INTRODUCCION

La producción agrícola se ve afectada por plagas y enfermedades; en este sentido los apiarios no son la excepción, ya que son atacados fuertemente por el ácaro *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Esta plaga fue introducida accidentalmente a Chile, alrededor de 1992, siendo el primer registro en apiarios del sector de Aguas Buenas, comuna de San Fernando, VI Región. Esta plaga se desplaza de una colmena a otra, transportada por las abejas, produciendo el debilitamiento e incluso la muerte de ellas.

Para el control de esta plaga, los apicultores han aplicado diversos productos químicos, algunos de los cuales contienen fluvalinato, compuesto perteneciente al grupo de los piretroides, que tiene gran afinidad por la cera de abejas, cuyo nombre comercial en Chile es Apistan ® y Mavrik ®. Los residuos de pesticidas por su aplicación indiscriminada, se han transformado en un problema, incluso más serio que el control del ácaro en sí, ya que cada año van aumentando sus concentraciones en las ceras, ocasionando riesgos permanentes de migración desde la cera a la miel. Lo anterior puede provocar graves daños en industrias con fines farmacéuticos, cosmetológicos o alimentarias, afectando directamente la salud del consumidor. Además, existe el riesgo de efectos negativos de los residuos sobre la abeja, tanto en cría como en abeja adulta.

Como hipótesis para este trabajo, se plantea que el desarrollo larvario de las abejas de la casta obrera, presenta daños por efectos de residuos de fluvalinato en cera de la cámara de cría.

El objetivo general de este estudio es determinar si existen daños durante el desarrollo larval de *Apis mellifera* L. de la casta obrera, por efecto de residuos de fluvalinato presentes en cera de la cámara de cría.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Evaluar los efectos de distintas concentraciones de fluvalinato, presentes en cera de la cámara de cría, sobre el desarrollo larvario de la abeja obrera.
- Evaluar si existen variaciones en los niveles de residuos de fluvalinato en cera de la cámara de cría, durante el periodo experimental.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Características de *Apis mellifera* L.

Según MANTILLA (2006), la colonia de abejas está formada por tres castas: una única reina, muchas obreras y unos pocos zánganos. La colmena tiene normalmente entre 30.000 a 80.000 individuos de los cuales el 95% son obreras (Figura 1), éstas son hembras más pequeñas que la reina y sus aparatos reproductores se encuentran atrofiados, siendo, por ello, hembras infértiles (LESSER, 2001).



FIGURA 1 Tiempo de vida y tareas de la obrera.

FUENTE: LESSER (2004).

Pese a la condición de infertilidad, las obreras son capaces de producir jalea real, cera y veneno, elementos muy valiosos, no sólo para ellas sino también para el

hombre. Desde que nace la obrera cumple múltiples funciones: los primeros 10 días es nodriza, esto es preocuparse de la alimentación y crianza de larvas; luego construye celdillas y también puede contribuir a la ventilación de la colmena, regular la temperatura, aseo y vigilancia. Después de 20 días de servicio interno pasa a ser abeja pecoreadora (trabajo fuera de la colmena). La duración de su vida depende de la estación del año, ya que en verano sólo alcanza 4 a 6 seis semanas de vida, mientras que en invierno puede llegar a los 4 a 6 meses (LESSER, 2004). En cuanto a la clasificación taxonómica ver Anexo 1.

2.1.1 Desarrollo de la cría de abeja obrera. En la etapa de ovipostura, la reina deposita un huevo en cada celda elegida por el séquito de obreras que la acompañan, éste puede fecundarse y dar origen a obreras o a reinas, o bien no fecundarse originando zánganos. La cámara de cría se mantiene a una temperatura de aproximadamente 35 °C y una humedad relativa de 65 a 75%, ideal para el desarrollo de los embriones (MANTILLA, 2006). Las obreras son todas hijas de la misma madre, pero no del mismo padre, esto explica por qué dentro de la colmena podemos identificar camadas de obreras con diferentes coloraciones (MORENO, 2006).

La abeja se encuentra clasificada como holometábola, por pasar por todos los estados, (Cuadro 1), para conocer con más detalles cada etapa de la metamorfosis MORENO (2006) señala que el huevo es blanco perlado, cilíndrico, oval y alargado, se encuentra en el fondo de la celdilla en posición vertical y antes del surgimiento de la larva, éste se inclina hasta descansar totalmente de forma horizontal en el piso de la celda (Figura 2).

CUADRO 1 Ciclo biológico y alimentación de la abeja en días.

Estado	Reina	Obrera	Zángano
Huevo	3	3	3
Larva	5,5	6	6,5
Prepupa	1	1	1
Pupa	6-7	9,5	13,5
Adulto	16	21	24
Nutrición con jalea	5,5	3	3,5
Nutrición con miel+polen	-	3	3

FUENTE: MANTILLA (2006).

Cuando el embrión se encuentra completamente desarrollado, una larva joven eclosiona del huevo, ésta es una criatura muy simple, tiene forma de "C", es pequeña sin patas ni alas, de color blanco perlado. Durante el transcurso de su vida esta larva pasa por cinco estadios, mudando su cutícula después de cada etapa y creciendo hasta ocupar completamente la celdilla. En la 5ª muda se encuentra de forma vertical, estado llamado prepupa. Al final de esta etapa, las abejas obreras tapan con cera todas las celdillas (operculación) (MANTILLA, 2006; SONDGRASS, 2006).

**FIGURA 2 Desarrollo de la cría de abeja en la celdilla del panal.**

A: huevo en posición vertical.

B: larva inclinada en posición horizontal.

En el estado de pupa o ninfa, la segmentación de la cabeza, tórax y abdomen es más nítida, su cutícula cambia y gradualmente se oscurece, los cambios principales durante esta etapa ocurren internamente, por lo que la pupa comienza a tomar forma

de abeja adulta (MORENO, 2006). El adulto o imago, al momento de nacer, roe el opérculo en forma circular y emerge; en sus primeras etapas de adultas, obtienen prácticamente la totalidad del nitrógeno desde las proteínas del polen, por consiguiente, deben consumir grandes cantidades de éste. Su exoesqueleto se termina de endurecer cuando entra en contacto con el aire (SONDGRASS, 2006).

En la etapa de operculado las larvas quedan bien provistas con células de reserva llenas de grasa, proteínas e hidratos de carbono, de modo que, cuando ya están listas para convertirse en pupa y posteriormente en adulto se encuentran en su peso máximo (MANTILLA, 2006; SONDGRASS, 2006).

2.1.2 Anatomía de la larva de abeja melífera. Debe tenerse en cuenta que en los insectos, el estado larval es la etapa de crecimiento, sólo entonces aumentan de tamaño, con muy poca diferencia entre la anatomía de la larva grande y la pequeña que recién ha salido del huevo (SONDGRASS, 2006).

En el aspecto externo, la larva joven comienza a diferenciarse en dos segmentos bien típicos, una cabeza pequeña, en la que se encuentran los órganos de alimentación, que incluyen un par de pequeñas mandíbulas y un par de maxilares simples, y un cuerpo de 13 segmentos, pasando sin diferenciar de tórax a abdomen. En la cabeza se forman pequeños lóbulos, que corresponden a los rudimentos del labro, antenas, patas y alas (MORENO, 2006).

Ya que su función principal es comer, tiene un estómago de gran tamaño (Figura 3). En una larva joven los tubos son finos, pero en la larva madura se dilatan mucho por la acumulación de las secreciones que se encuentran dentro de ellas (MORENO, 2006).

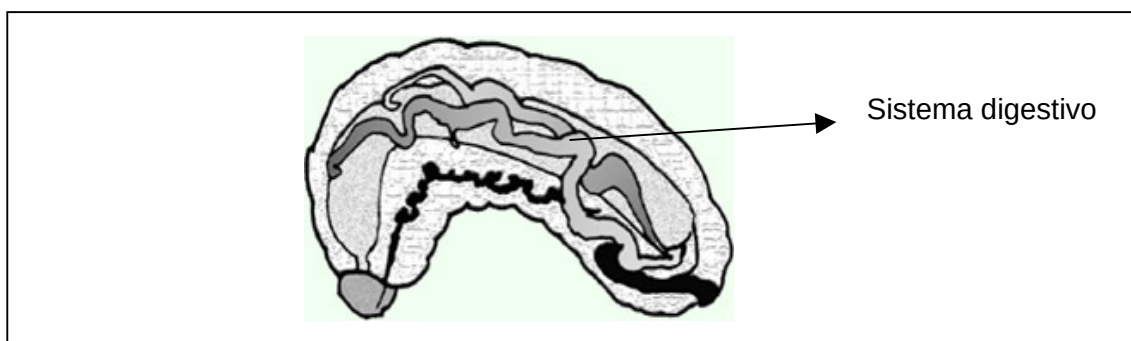


FIGURA 3 Aparato digestivo de una larva de abeja.

FUENTE: MANTILLA (2006).

Con el fin de conservar la limpieza en la celda, tanto los tubos de malpighi como el estómago se encuentran cerrados y no conectados con el intestino, hasta que la larva está madura; en ese momento la celda es operculada. Luego se abren los tubos y el estómago se conecta con el intestino y su contenido es despedido por el ano al fondo de la celda (SONDGRASS, 2006; MORENO, 2006).

El sistema respiratorio traqueal es igualmente ectodérmico (Figura 4). Está compuesto por los espiráculos, que son los orificios por donde penetra el aire, y por gran cantidad de tubos llamados tráqueas, traqueolas y sacos aéreos. Los espiráculos son 10 pares, los tres primeros están en el tórax y los 7 restantes en el abdomen. Las tráqueas y traqueolas son tubos que llevan el oxígeno hasta las células (MORENO, 2006).

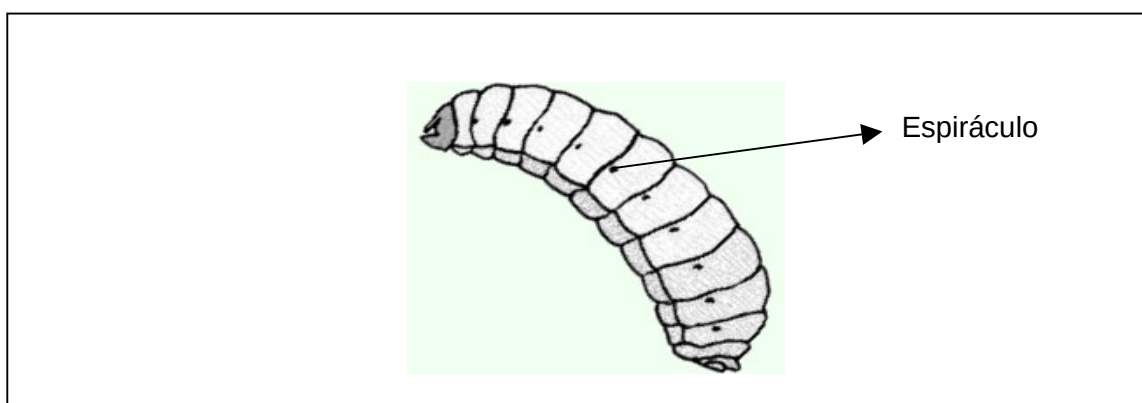


FIGURA 4 Espiráculos de una larva de abeja.

FUENTE: MANTILLA (2006).

2.2 *Varroa destructor* Anderson & Trueman.

Varroa destructor Anderson & Trueman anteriormente clasificado como *Varroa jacobsoni*, fue descrito por el Holandés Oudemans (1904) a partir de ejemplares encontrados en la isla de Java sobre colonias de *Apis indica* (actualmente *Apis cerana* Javana). Este investigador lo identificó como un parásito obligado de la abeja asiática, que no provoca gran daño dentro de la colonia, debido a que las abejas lo toleran y llegan a limpiar las varroas de la cría y de ellas mismas (ANDERSON, 2000; YAÑEZ, 2004).

Sin embargo, en 1958 *V. jacobsoni* logra infestar a *A. mellifera* L., hecho que presumiblemente tuvo lugar cuando a principios del siglo XX, algunas colonias de *A. mellifera*, ubicadas en las provincias orientales de la Unión República Socialista Soviética (URSS), Japón y el sureste de Asia, entran en contacto con colonias de *A. cerana* que se encontraban en estado silvestre, propagándose posteriormente por toda África, Norte América y Sudamérica (Eickwort, 1990 y Fredes, 1993, citados por YAÑEZ, 2004; DEL HOYO y CABRERA, 2004).

BEETSMA (1994), señala que el parásito se trasladó al Cáucaso y de allí a Bulgaria, más tarde a Rumania y a Tunisia. En el año 1982 se detectó en Israel, mientras que la primera aparición en España fue en el año 1985 y en México en 1992.

La introducción del ácaro en América del Sur se produce cuando apicultores de Paraguay importaron abejas desde Japón. En Argentina se detectó por primera vez en 1976, en colmenas de Laguna Blanca, provincia de Formosa; en 1978 se encontró en la Provincia de Buenos Aires, hecho que ilustra su gran capacidad de dispersión. Este parásito fue el causante de severas pérdidas en colonias de abejas melíferas causando la desaparición de cientos de colmenas entre los años 1978 y 1982 (DE JONG *et al.*, 1984; BEETSMA, 1994; MONTIEL, 1978). En Cuba fue reportado en abril de 1996, donde se instauró y extendió a todo el país; entre 1996 y 1997 en sólo dos provincias se perdieron más de 10.000 colmenas (VERDE, 2002).

El indiscriminado movimiento internacional de las colonias y abejas reinas ha ocasionado que la enfermedad se haya dispersado por todo el mundo, lo que significa

que en la actualidad no existen zonas libres de varroa, por lo cual se comenzó a buscar alternativas de combate (BEETSMA, 1994; CAMAZINE, 1986).

Según lo señalado por ANDERSON y TRUEMAN (2000), *V. destructor* se alimenta de la hemolinfa de *A. mellifera* y otras especies, hasta producir la muerte de ellas. La clasificación taxonómica del ácaro se presenta en el Anexo 2.

A la vez, MORSE y NOWOGRODZKI (1990), afirman que éste se alimenta y reproduce en la cría de la abeja, principalmente durante los estados de larva tardía y pupa. En las abejas adultas penetran las membranas intersegmentales, clavando sus quelíceros para alimentarse de la hemolinfa, ubicándose principalmente en el abdomen, donde quedan protegidos. Actualmente representa un grave problema en la apicultura mundial, ya que provoca masivas pérdidas, por bajas en los rendimientos individuales o por mortalidad de colmenas (la sincronización de los ciclos de la abeja y varroa se indican en el Anexo 3).

ARECHAVALETA y GUZMÁN (2001), comentan que *V. destructor* es un ácaro forético, es decir, se desplaza de una colmena a otra transportado por las abejas y ectoparásito, ya que se trata de un parásito externo obligado, que no puede llevar vida libre.

FERNÁNDEZ y COINEAU (2002) y SANFORD *et al.* (2004), reconocen que dentro del amplio rango de daños que el ácaro produce sobre la abeja, se destacan los siguientes:

- a) Disminución del peso de las abejas adultas.
- b) Acortamiento de la duración de la vida de las abejas (menor longevidad).
- c) Transmisión de virus a las pupas.
- d) Deformación de alas y abdomen, presumiblemente por infecciones virosas.
- e) Reducción del número de zánganos y disminución de su fertilidad.

2.2.1 Varroa en Chile. Hasta el año 1991, el país se encontraba clasificado como libre de la enfermedad, según la Oficina Internacional de Epizootías (OIE) y se consideraba

que la condición sanitaria de la apicultura Chilena era excepcional. Esto era respaldado por estudios realizados entre 1985 y 1987 (PELDOZA, 1992). Los únicos problemas sanitarios existentes para la actividad eran la presencia de patologías como la nosemosis y amebiasis (originadas por *Nosema apis* Zander y *Malpighamoeba mellificae* Prell, respectivamente) y la parasitosis causada por el díptero *Braula coeca* Nitsch (FREDES, 1993; HINOJOSA y GONZALEZ, 2004).

CASANUEVA (1992) y LESSER (2001), comentan que los primeros registros del ácaro *V. destructor* en Chile se efectuaron en marzo de 1992 en Requinoa, en apiarios del sector de Aguas Buenas, comuna de San Fernando, VI Región. Se presume que habría ingresado al territorio dos a tres años antes de dicha fecha y en menos de un año ya había sido detectada en apiarios de Curicó y Talca.

A partir de 1993, monitoreos efectuados en todo el país determinaron la presencia del ácaro desde la Región de Tarapacá hasta la Región de Los Lagos, presentándose grados de infestación variables y siendo la Región de O'Higgins la más afectada. Se decretaron ciertas zonas libres, pero posteriormente el ácaro ingresó en ellas. Debe considerarse que las poblaciones han ido aumentando progresivamente y a los pocos años después de su ingreso, éste ya mostraba una alta frecuencia de presentación y en la actualidad se encuentra distribuido en todo el país (FREDES, 1993; DURAN, 1997; LESSER, 2001).

Según RÍOS (2001), la varroosis es la enfermedad con mayor presencia en explotaciones de la X Región, con un 84,5%, siguiéndole nosemosis con un 50%, lo que concuerda con la Universidad Austral de Chile (UACH) (2003), donde un estudio realizado entre la IX y X Región para conocer las enfermedades más predominantes en la zona (Figura 5), obtuvo como resultado que la enfermedad con mayor porcentaje es varroosis en cría y en adulto, con un 75 % y 63 % respectivamente.

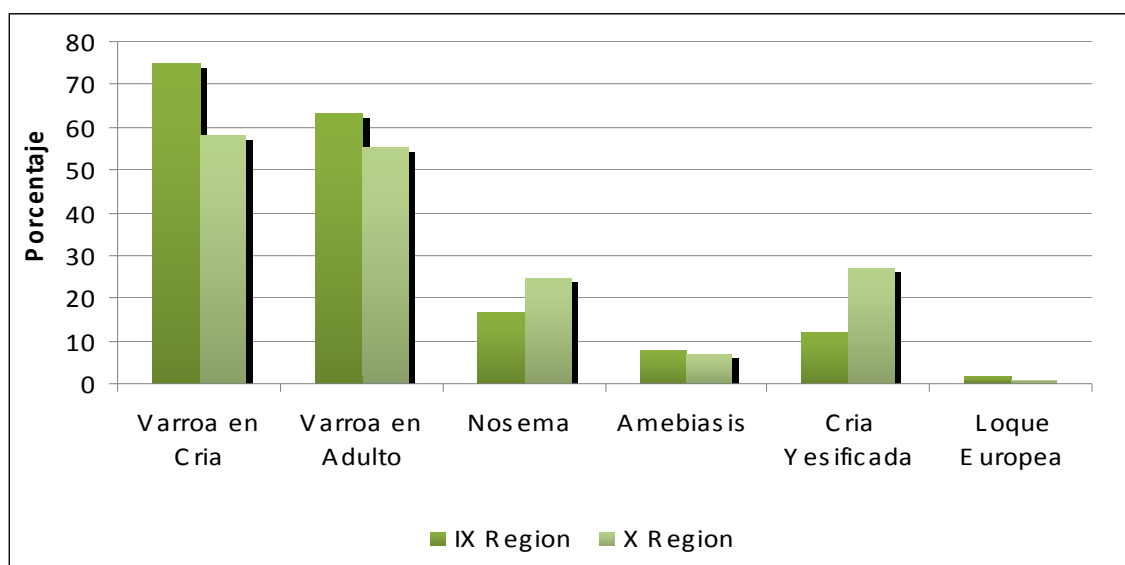


FIGURA 5 Porcentaje de abejas adultas y crías que presentan algún tipo de enfermedad, entre la IX y X Región.

FUENTE: UACH (2003).

Es importante hacer notar que a pesar del daño que ha causado en Chile, la presencia de varroosis ha determinado un grado de transformación hacia la mayor profesionalización del rubro apícola, aunque aún existan sectores con importantes deficiencias de manejo productivo y sanitarios en Chile (OYARZUN *et al.*, 2005).

2.3 Control de varroa.

Según NEIRA (1999), para realizar un efectivo control es necesario detectar y realizar un diagnóstico que permita su identificación en forma oportuna. Además el mismo autor señala que los acaricidas deben cumplir los siguientes requisitos:

- El producto debe ser mortal para los ácaros, sin dañar las abejas.
- No deben quedar residuos en la miel y tampoco en la cera, o bien, estar presentes en trazas o cantidades no detectables.
- El producto debe estar autorizado por el país de destino, como medicamento veterinario, si la miel va a ser exportada a dicho país.
- Debe ser fácilmente utilizable por el apicultor, sin que le provoque ningún trastorno de salud.

El objetivo es mantener las infestaciones de varroa en abejas adultas siempre bajo el 5 %. Esto deberá ser vigilado periódicamente cada dos meses, dada la velocidad de crecimiento de sus poblaciones, la alta posibilidad de reinfestación producto de la existencia de colmenas sin manejo y familias en vida silvestre. Infestaciones sobre el 5% en abejas adultas y de 10% en crías de obreras deben ser tratadas en forma rápida, ya que en poco tiempo pueden alcanzar niveles que resultan mortales para las colonias de abejas (CHILE, SERVICIO AGRÍCOLA y GANADERO (SAG), 2007).

2.3.1 Control no químico. Calatayud (2001), citado por SILLARD (2002), afirma que esta modalidad clasificatoria distingue al menos tres métodos:

- Método biotécnico: son aquellos relacionados con el control de la parasitosis, sin la utilización de agentes químicos. Existen diversos métodos, tales como formación de núcleos mediante un sistema rotatorio y la introducción de cuadros zanganeros. ROBLES (1995), sustituyó marcos zanganeros varias veces en las colmenas, obteniendo una eficacia media de control de 51%, con rangos de variación 44% a 75,5 %.
- Método biológico-cultural: su eficacia es muy limitada, además es costoso y laborioso, la ventaja es que forma parte de las labores habituales del apicultor, como la aplicación de humo, pero con plantas que causen caídas de ácaros, por ejemplo el tabaco. Además SAMMATARO *et al.* (2000), señalan que el método biológico apunta al mejoramiento genético en contra de varroa, considerando los siguientes aspectos:
 - a) Selección de abejas tolerantes a varroa.
 - b) Selección de abejas con comportamiento higiénico.
 - c) Selección de abejas con un menor periodo post-operculado, con el fin que se desarrollen menos varroas.
 - d) Utilización de razas menos atractivas a varroa.
 - e) Selección de ácaros de baja fertilidad.

- **Método físico:** basado en el efecto de la alta temperatura, en el cual se utilizan variados dispositivos que aumentan artificialmente la temperatura de la colmena. Este procedimiento resulta poco eficiente debido a la imposibilidad de distribuir de manera uniforme el calor al interior de la colmena. Además, RITTER (1981) y BARRIGA y NEIRA (1988), señalan que el uso de calor para tratar colonias infestadas está basado en el hecho que los ácaros se desprenden del cuerpo de las abejas adultas a temperaturas de 46 a 48°C, método muy riesgoso, ya que las abejas mueren a temperaturas de 49 a 50°C, por lo que su éxito, incluso en combinación con agentes químicos, es muy variable.

Además, Imdorf *et al.* (1996), citado por YAÑEZ (2004), propone el uso de sustancias activas que son los ácidos orgánicos, tales como, fórmico, láctico y oxálico, o también componentes de aceites volátiles como timol, mentol y eucaliptol, entre otros. Con la utilización de los ácidos orgánicos, los problemas de residuos son prácticamente inexistentes.

2.3.2 Control químico. BACCI (2005) define como un producto químico "perfecto" a aquel que no altera el funcionamiento interno de la colonia, que su aplicación sea práctica y que presente mayor eficacia con la menor cantidad de aplicaciones, además, que no signifique un riesgo de contaminación para la miel y la cera y que no sea perjudicial para la salud humana. Por último, hay que agregar quizás la más importante de las variables: que el producto sea de bajo costo. En la apicultura existen las siguientes formas de acción de los productos acaricidas:

- **Sistémicos:** estos productos son distribuidos a las abejas gota a gota o a través del alimento que se les ha ofrecido. Este pasa por la hemolinfa sin producir daño alguno a la abeja, pero causando la muerte del ácaro que se alimenta de ella (FERNÁNDEZ y COINEAU, 2002).
- **De contacto:** son los que comienzan a actuar a partir del momento en que éste es depositado sobre el exosqueleto del ácaro. El parásito puede ser alcanzado

en forma directa o debido a los múltiples contactos que se efectúan entre las abejas, en el normal desarrollo de la colmena (BACCI, 2005).

En la década del 80 en Argentina y posteriormente en Chile, se comenzaron a aplicar métodos de control de liberación lenta que permitían que el principio activo actuara durante un mayor período de tiempo dentro de la colmena y alcanzara los ácaros que van emergiendo de las celdas de cría. Un ejemplo son los piretroides, como el fluvalinato, éste posee un buen efecto acaricida cuando se aplica en tiras plásticas, entre los cuadros de la cámara de cría (COLIN *et al.*, 1997; BLOOMQUIST, 1999).

2.4 Uso de fluvalinato en el control de varroa.

Según BLOOMQUIST (1999), el fluvalinato es un poderoso insecticida del follaje y acaricida, proviene de las piretrinas, que son de origen botánico, éstas son aisladas a partir de las flores del crisantemo, siendo los piretroides básicamente ésteres del ácido crisantémico, caracterizados por ser altamente lipofílicos. Las características químicas del fluvalinato se presentan en el Anexo 4.

Tanto el Apistan®, Mavrik® y Klartan® son formulaciones comerciales que existen en el mercado mundial, de los cuales, Apistan® es el que presenta una gran eficacia en el control de varroa, además, es el único químico aprobado para el uso apícola, mientras que los otros son utilizados en la agricultura (FAUCON *et al.*, 1995; TSIGOURI *et al.*, 2001). Por lo general se realizan dos tratamientos en el año, uno en otoño y otro en primavera para evitar que el ácaro alcance niveles poblacionales que produzcan algún daño económico. Se utilizan dos cintas por tratamiento, las cuales se ubican entre los marcos 3/4 y 7/8, las que permanecen entre seis y ocho semanas y en la época cuando no haya recolección de néctar ni de polen por parte de las abejas. El producto muestra una importante inocuidad sobre las abejas (FERNÁNDEZ y COINEAU, 2002; BACCI, 2005).

Según SLABEZKI *et al.* (1991), WALLNER (1999) y TSIGOURI *et al.* (2001), el fluvalinato impregnado en tiras plásticas fue oficialmente aprobado para ser utilizado en Estados Unidos y en varios países desde 1988, mientras que en Chile se utilizan tablillas artesanales impregnadas con fluvalinato desde hace aproximadamente 11

años. En Chile, al igual que en otros países de Sudamérica, se ha usado el fluvalinato impregnado en tiras de madera preparadas a partir de las formulaciones registradas con los nombres comerciales Klartan® o Mavrik® (CALATAYUD *et al.*, 1994). Aunque esta práctica no resulte correcta desde el punto de vista científico, se ha impuesto dada su facilidad de aplicación y bajo precio (HIGES *et al.*, 1998).

Por su parte, el SAG (2007), sustenta que el uso reiterado de esta metodología, debido a su falta de control y estandarización, ha significado el aumento de las concentraciones y la probable acumulación de fluvalinato en la cera de abeja, creando situaciones de toxicidad para larvas de primeros estadios y contaminación de la miel almacenada en dichas celdillas.

2.4.1 Toxicidad del fluvalinato. Según EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA) (1995), el fluvalinato está clasificado como una molécula moderadamente dañina. Su modo de acción está basado en cambios de permeabilidad de los canales del sodio en las membranas de las células nerviosas, causando una despolarización e hiperexcitabilidad prolongada (Figura 6). Es decir, durante la fase de recuperación del potencial de acción de las neuronas se prolonga la permeabilidad al sodio y aumenta su flujo, persistiendo la despolarización de la membrana con descargas repetidas. La sinapsis neuromuscular de los insectos es un blanco especialmente importante para los piretroides, como también para otros insecticidas (ROSIER, 1994).

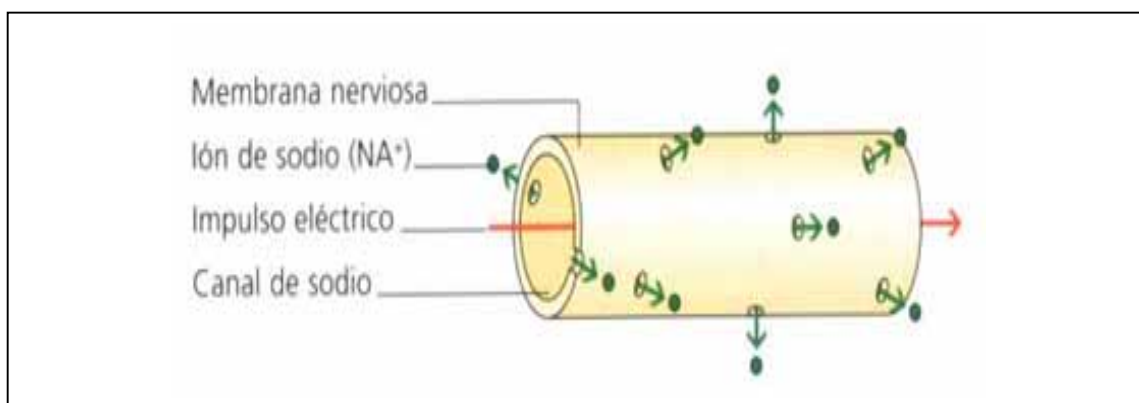


FIGURA 6 Modo de acción del fluvalinato.

FUENTE: BAYER CROP SCIENCE (2005).

No obstante, BACCI (2005) señala que los piretroides se usan ampliamente, debido a su baja toxicidad, en general hacia los pájaros y mamíferos. Vía oral presenta una dosis letal al 50% (LD_{50}) para ratas de 260 a 280 ppm, vía dermal es prácticamente no tóxico (con un LD_{50} para ratas de 20.000 ppm y más de 2.000 ppm para conejos). En cambio, es altamente tóxico para los peces y las abejas, los valores de LD_{50} para peces pequeños y otros organismos acuáticos se encuentra por debajo de 1 ppm y el valor LD_{50} para abejas es de 300 ppm, cifra que no concuerda con lo publicado por MILANI (1995); FERNANDEZ y COINEAU (2002), los cuales mencionan que el LD_{50} para abeja adulta varía entre 20-200 ppm.

Los signos de intoxicación con piretroides en insectos se desarrollan rápidamente entre 1-2 minutos y son; hiperexcitabilidad, convulsiones, ataxia, descoordinación y pueden resultar en la caída, es decir, la pérdida de la postura normal y de la locomoción (BACCI, 2005; ROSIER, 1994).

2.5. Residuos de fluvalinato en la cera de abeja.

El fluvalinato, a diferencia de otros residuos, se presenta en la cera muy fácilmente, no así en la miel. Sin embargo, una vez que se encuentra en la miel permanece ahí por un largo tiempo. Éste es uno de los piretroides sintéticos fotoestables modernos más utilizados en el control de varroosis (LIU, 1992; WALLNER, 1999). El uso de estas sustancias tiene el riesgo de contaminar los diferentes productos de la colmena, dado el carácter lipofílico de algunos de ellos (HIGES, 1996). Otro riesgo que conlleva el uso sistemático de acaricidas sintéticos, es la aparición de resistencia a éstos por parte del ácaro (LODESANI *et al.*, 1995; LLORENTE, 1994). Niveles de contaminación de la cera con residuos de fluvalinato descrito por distintos autores se presenta en el Anexo 5.

Según BACCI (2005), se debe prestar mucho cuidado y trabajar con mucha conciencia para evitar que queden residuos químicos en los productos de la colmena, ya que no sólo ponen en riesgo la continuidad del comercio de la miel, sino que también constituyen un riesgo para las abejas. Los productos de la colmena pueden contaminarse en menor o mayor grado, de acuerdo a la naturaleza química de la sustancia con la que estamos trabajando. Además, la alta estabilidad y duración que

presenta el fluvalinato en la cera provoca que éste perdure en ella, ocasionando efectos letales sobre los estados de desarrollo de la abeja, los cuales pueden producir la muerte de estadíos larvarios (NEIRA, 2001).

En Bélgica, se observó un incremento en la cantidad de fluvalinato presente en cera de abeja, los estudios demostraron que más del 91% de las ceras contenían entre 0,1 y 10 ppm y unas pocas alcanzaban valores entre 10 y 100 ppm (BEETSMA, 1994). Esto puede inducir problemas en la aceptación de las celdillas para la postura, por parte de la reina y determinar un patrón de postura irregular o un nido de cría pequeño, lo cual puede ser confundido con una enfermedad o favorecer su desarrollo, introduciendo equivocadamente elementos químicos o fármacos (ARGENTINA, COMISION NACIONAL DE SANIDAD APÍCOLA (CONASA), 2005).

WALLNER (1999) señala que la principal vía de paso del ingrediente activo hacia la cera, es por contacto con las abejas que acumulan el producto sobre sus cuerpos. Una vez en la cera, éste pasa hacia otros productos apícolas, de tal manera que en condiciones de alta concentración de residuos en la cera luego de varios años de aplicación, el ingrediente activo pasaría a la miel por difusión. Por lo anterior GRANDJEAN y CAMPO (2002), aconsejan efectuar el tratamiento con productos oficialmente autorizados por cada país para el control de la varroosis en abejas.

Los residuos en cera son elevados a nivel nacional y cada vez que se recicla la cera de la cámara de cría (donde se colocan las tablillas) el fluvalinato se concentra y puede determinar niveles tan altos que sean incompatibles con la vida de la larva de las abejas en la colmena. Además podría traer graves consecuencias para el desarrollo de nuestra apicultura, con los días contados de una producción competitiva en el mercado internacional si no se revierte esta situación, ya que actualmente los mercados tienen cada vez mayores exigencias respecto a la calidad de los productos de la colmena y la presencia de residuos es un factor limitante para su comercialización (VIT, 2005).

En el marco del desarrollo del proyecto Fondo SAG N° 71, se realizó un estudio durante los años 2000, 2001 y 2002, en Chile, abarcando las regiones Novena y

Décima, con el fin de determinar el porcentaje de ceras que contenían residuos de fluvalinato, el cual arrojó como resultado una disminución de las muestras positivas en los años comprendidos para el estudio en la Novena Región, a diferencia de lo ocurrido en la Décima Región, en donde se produjo un aumento con respecto al primer año de estudio (UACH, 2003).

Los resultados de otro estudio realizado en Chile (Figura 7), indican que las mayores concentraciones de fluvalinato en cera, en el año 2004, corresponden a las Regiones Metropolitana y Sexta, ambas con 1 ppm, pero, en el año 2005 las concentraciones disminuyeron considerablemente, siendo la más alta la VII Región con 0,38 ppm. Estos resultados constituyen la primera aproximación a la situación real de residuos en cera del país (UACH, 2005¹).

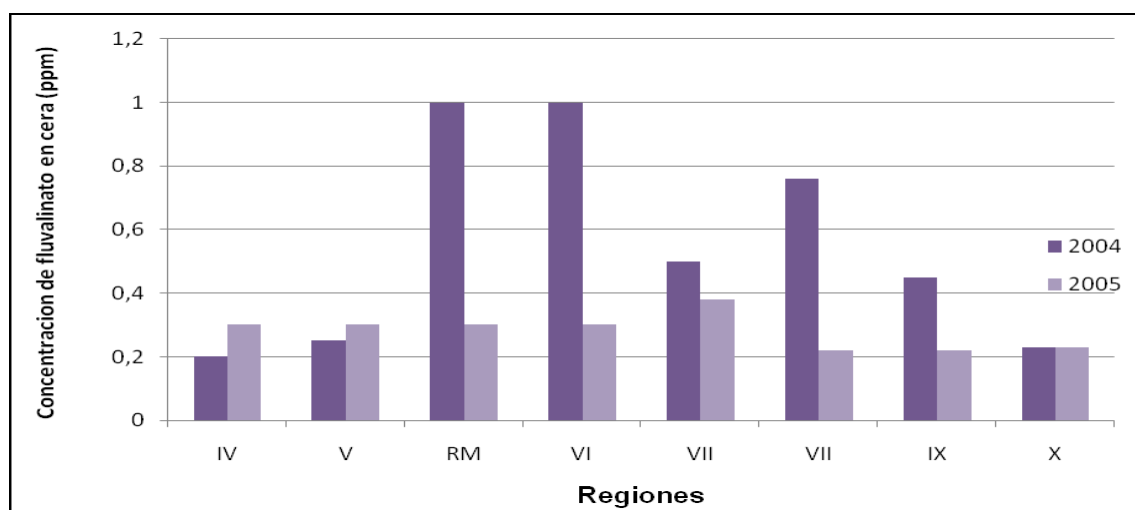


FIGURA 7 Concentraciones de fluvalinato, en ceras entre las Regiones IV y X, en las temporadas 2004-2005.

FUENTE: UACH (2005¹).

SOTO (2002) señala que el fluvalinato es el ingrediente activo mayoritariamente utilizado por apicultores Chilenos, realizando hasta tres tratamientos anuales sin el

¹ UACH, 2005. Proyecto Apícola Fondo SAG n° 64. Informe técnico financiero período: 16 de marzo al 15 de julio 2005. Datos no publicados.

empleo de una metodología adecuada, lo que se traduce en un aumento del porcentaje de ceras que contienen residuos de fluvalinato, que en los años 2004 y 2005 bordean el 100% (UACH, 2005¹).

La presencia de residuos en la cera y la evaluación de riesgos para el hombre y las abejas, es un tema de actualidad en el control de producciones biológicas. La relevancia de este asunto es aún mayor si se piensa que la cera es ampliamente utilizada en cosméticos y fármacos, además de encontrar residuos en cera, se ha encontrado en la jalea real residuos veterinarios como los acaricidas coumaphos, fluvalinato y los antibióticos ampicilina y oxitetraciclina en Argentina (BACCI, 2005; HIGES *et al.*, 1998).

Algunas comprobaciones experimentales han demostrado como aún hoy día es difícil eliminar estos compuestos sin comprometer las características físico-químicas de la cera. La estabilidad de los residuos en la cera permite actualmente verificar y trazar una historia de los tratamientos realizados en la colmena, es importante mencionar que la concentración de acaricidas aumenta con el número de aplicaciones del producto, pero decrece muy lentamente cuando se deja de aplicar. La vida media de un acaricida en la cera es de cinco años, con concentraciones que van desde los 0,5 a los 10 ppm, ya que el tiempo en desaparecer totalmente depende de la concentración inicial. En Italia, Alemania y Suiza sólo se permiten máximos entre 0,1 y 1 ppm de residuos de acaricida en las ceras utilizadas, límites que garantizan que los acaricidas no pasarán a la miel (BOGDANOV, 2004; GÓMEZ, 2000).

2.5.1 Migración de fluvalinato de la cera a la miel. Para garantizar que no exista migración de residuos de la cera a la miel WALLNER (1999) señala que los residuos en la cera deben estar bajo 1 ppm, pues con esa cantidad ya es posible esperar 0,4 partes por billón (ppb) de este ingrediente activo en la miel. En el Cuadro 2 se observan diferentes concentraciones de fluvalinato en la cera y sus correspondientes migraciones a la miel.

CUADRO 2 Migración de fluvalinato desde la cera a la miel.

Nivel de residuos en la cera (ppm)	Análisis de los niveles de residuos en miel (ppb)		
	Perizin ® (Coumaphos)	Apistan ® (Fluvalinato)	Bayvarol ® (Flumetrina)
1	0,7	0,4	n.d
10	5	0,6	n.d
20	7	0,8	n.d
50	18	1,5	n.d
100	31	4,5	n.d
400	94	10	n.d

n.d: no detectable.

FUENTE: Adaptado de WALLNER (1995).

Estudios realizados por el mismo autor en el año 1995, en laboratorio, indican que algunos pesticidas como el bromopropilato, coumaphos y en menor cantidad el fluvalinato pueden migrar a la miel. El autor además apunta a que mientras más frecuente sea la utilización de pesticidas en la colmena, más alto es el riesgo que puedan detectarse residuos en los productos de ésta, como miel, propóleos y cera (WALLNER, 1995; ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO), 2005).

2.6 Medicamentos veterinarios de uso apícola registrados en Chile.

Actualmente se encuentran registrados sólo dos medicamentos de uso apícola, ya que la industria farmacéutica no ha solicitado el registro de otros productos. El SERVICIO AGRÍCOLA y GANADERO (SAG), (2007), aconseja efectuar el tratamiento con estos productos, ya que cuentan con el respaldo de la autoridad sanitaria animal del SAG y además se les han realizado estudios que avalan su efectividad en el uso apícola y su inocuidad, tanto para las abejas, como para los humanos. Estos productos se señalan en el Cuadro 3.

En el caso de Bayvarol ® no se ha encontrado resistencia en Chile, (GRANDJEAN y CAMPO, 2002). A pesar que flumetrina es químicamente similar a

fluvalinato y que podría existir un caso de resistencia cruzada a ambos principios, no existen hasta el momento antecedentes que lo demuestren (MILANI, 1995, 1999).

CUADRO 3 Medicamentos veterinarios de uso apícola, registrados en el SAG para el control de varroa.

Características	BAYBAROL	APILAB
N° de Registro SAG	614	1828
Presentación	Tiras de 3,6 mg	Tiras de 16 g
Composición	Flumetrina	Amitraz 6,25%
Indicaciones	Control de <i>Varroa destructor</i> .	Control de <i>Varroa destructor</i> .
Período de resguardo	No requiere, si se respetan las instrucciones de dosis	60 días, entre el retiro de las tiras y el inicio de la mielada.

FUENTE: (SAG) (2007).

Cabe destacar que la Unión Europea prohibió el uso de los productos fitosanitarios que contengan amitraz el 12 de febrero de 2004, lo cual fue publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea el 17 de febrero del mismo año, en la página de Agricultura (BYRNE, 2004).

2.6.1 Medicamentos veterinarios de uso apícola, para el control de varroa no registrados en Chile. El riesgo de usar productos no registrados (Cuadro 4) para uso apícola radica, principalmente, en la presencia de residuos que quedan en la miel y cera y consecuentemente, los daños que esta situación puede causar en la salud de las personas. También pueden ocasionar pérdidas directas en las colmenas, como una baja en la producción de miel, muerte de abejas y baja postura, entre otros (SAG, 2007).

Además SAG (2007), tiene antecedentes que habitualmente los apicultores utilizan en las colmenas diversos productos formulados para otras especies como, por

ejemplo, antiparasitarios de uso externo para caninos como el Asuntol. Sin embargo, este producto no debe aplicarse en abejas, ya que no existen antecedentes científicos que respalden dicho uso. Por lo tanto, los productos de uso indebido no cuentan con el respaldo oficial respecto de su inocuidad, tanto para abejas como para humanos.

CUADRO 4 Medicamentos veterinarios de uso apícola, no registrados en el SAG para el control de varroa.

	Principio activo	Efectos negativos
Mavrick	Fluvalinato	Residuos en ceras y miel, muerte de abejas, daños en salud humana y producción.
Apistán	Fluvalinato	
Tablitas de fluvalinato	Fluvalinato	
Asuntol	Coumaphos	
Ácidos orgánicos y Aceites esenciales	Ácido oxálico y fórmico Aceite de tomillo, mentol y eucalipto	No se han realizado estudios que avalen su efectividad en el uso apícola.

FUENTE: SAG (2007).

El uso indiscriminado y sucesivo de sustancias acaricidas sintéticas, como los piretroides, poseen el riesgo de provocar resistencia por parte del ácaro y minimizar su efecto. Esto implica dosis cada vez más altas que traen aparejado una mayor concentración de residuos en los productos de la colmena (HIGES, 1996; MARLETTO, 1994). Ya que los piretroides son relativamente similares en el aspecto químico, una especie de plaga resistente a un miembro de la familia piretroide es con frecuencia resistente a otro o a todos los tipos de piretroides (THOMPSON *et al.*, 2002). Por lo tanto, reemplazar un piretroide por otro puede no ser conveniente cuando aparece resistencia (LODESANI *et al.*, 1995).

En el año 1988, el uso de fluvalinato pareció proveer una herramienta eficaz y de largo plazo para el control de varroa (VANDAME *et al.*, 2003). Sin embargo, la

situación cambió notablemente a raíz de la aparición de cepas resistentes al fluvalinato en Italia en la provincia de Lombarda, Francia, Suiza, Austria y España en los inicios de los años 90 (MUTINELLI, 2003; MILANI, 2001; COLIN *et al.*, 1997). Además, en Estados Unidos, la resistencia al fluvalinato se ha verificado en los estados de Florida y Dakota del Sur (EISCHEN, 1996; MILANI, 1995). Se ha constatado un descenso en la eficacia del fluvalinato en diferentes regiones del norte de Italia y sur de Francia (FAUCON *et al.*, 1995; MILANI *et al.*, 1995; FAUCON y DRAJNUDEL, 1996), así como la aparición de residuos de este piretroide en diferentes productos de la colmena (sobre todo en la cera), es por ello que se debería suspender su uso durante al menos dos años para eliminar las descendencias de varroas resistentes y poder reutilizarlo luego, con éxito (LODESANI *et al.*, 1992, VELIS *et al.*, 1993; WALLNER, 1995).

2.7 Origen y composición de la cera de abeja.

Según RIVERA (2006) la cera es un producto natural, obtenido a partir del metabolismo de la abeja (*A. mellifera*), las únicas que la pueden secretar son las obreras, éstas poseen cuatro pares de glándulas cereras en el abdomen. La cera se produce en forma líquida y se endurece al contacto con el aire, formando pequeñas escamas de color blanco, que posteriormente cambian de tonalidad, cada escama pesa alrededor de 0,0008 g, las que son retiradas del abdomen por medio de las patas y llevadas a las partes bucales, para ser amasadas y utilizadas en la construcción de los panales. Para producir 0,5 kilos de cera ellas necesitan consumir entre 3 a 4 kilos de miel (BOGDANOV, 2004; GRAJALES y SCHMIDT, 2001). Los ácidos o los jugos digestivos de los animales no pueden destruirla, con excepción de los secretados por larvas de polillas de la cera como, *Galleria mellonella* L. (BOGDANOV, 2004).

BIANCHI (1990) y BOGDANOV (2004), señalan que la composición química de la cera de abejas (Anexo 6) difiere según la especie, en relación a la cera de *A. mellifera*, ésta contiene compuestos principalmente de ésteres de ácido grasos y alcoholes, dándole la característica de lipofílica, donde la parte apolar (hidrofóbica) hace que los piretroides como el fluvalinato se adhieran a ella.

La cera de abejas es utilizada industrialmente en la elaboración de cosméticos, drogas, betunes, ceras para piso, impermeabilizantes y velas litúrgicas. En apicultura

se utiliza para la elaboración de láminas de cera estampada, ésta es una lámina de 2 o 3 milímetros de espesor a la cual se le imprimen los hexágonos, pudiendo en la actualidad ser de material plástico con hexágonos impresos y un baño de cera en la superficie (MICHAUD *et al.*, 2006).

Respecto a la cera estampada utilizada en la elaboración de marcos, el apicultor Chileno no tiene acceso a conocer su origen, ésto es muy importante ya que es el potencial vehículo de contaminación con residuos de medicamentos o pesticidas si proviene de una colmena que no ha sido manejada adecuadamente (OYARZUN *et al.*, 2005). Los panales construidos por las abejas deben ser cambiados cada dos o tres años, el apicultor recupera la cera de los panales y de los opérculos, después de la extracción de la miel, fundiéndolos según diferentes procedimientos. La cera de opérculos es la de mejor calidad (MICHAUD *et al.*, 2006; DEL HOYO y CABRERA 2004).

2.7.1 Celdilla del panal. A la lámina de cera se le imprimen los hexágonos, los cuales, al ser estirados por las obreras constructoras, forman las celdillas de 6 lados, todas iguales y alineadas sin ningún desperdicio de espacio, con el mayor ahorro de cera, gracias a la forma geométrica perfecta hexagonal (VIT, 2005).

En el año 1700 se hicieron los primeros cálculos referentes a la medida de los ángulos de los rombos presentes en los fondos piramidales de las celdas del panal, pero, serían el ingenio Italiano, Jean Dominique Maraldi y el matemático Alemán Samuel Koenig, los que obtuvieron los cálculos exactos, con un ángulo de $109^{\circ} 28'$ (VIT, 2005).

Además de medir el ángulo de las celdas, estos científicos midieron el largo de éstas y descubrieron que las tres castas de la colonia poseen celdas diferentes, la de obrera tiene una profundidad de 12-13 mm por 6 mm de diámetro, la de zángano tiene una profundidad de 15 mm por 8 mm de diámetro, en cambio la celda real, es la única más sobresaliente del panal y se ubica hacia abajo, abarca el espacio de 3 celdas de obreras. A continuación, se muestra en la Figura 8 un panal tridimensional con lados opuestos (VIT, 2005).

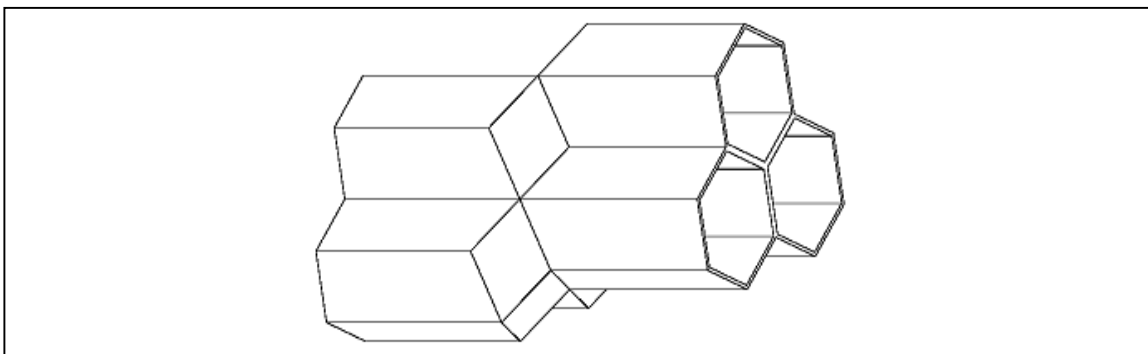


FIGURA 8 Geometría tridimensional de celdas de panal de lados opuestos.

FUENTE: VIT (2005).

Cada una de las celdas cumple una función de cámara de incubación, específica en permeabilidad, conductividad y mantención de temperatura en relación a los ambientes interno y externo. De similar importancia, la celda también cumple la función de receptáculo de preparación y almacenamiento del alimento, como son el polen y el néctar que será transformado en miel. En momentos de altas temperaturas también se las utiliza como reservorio de agua (VIT, 2005).

3 MATERIAL Y METODO

3.1 Ubicación del estudio.

El ensayo de campo se realizó en el apiario experimental Santa Rosa (Figura 9), perteneciente a la Universidad Austral de Chile, (UACH), ubicado 5 km al norte de la ciudad de Valdivia, entre los paralelos 39°45'30" y 39°47'30" latitud sur y los meridianos 73°14'55" y 73°13'15" longitud oeste. Los análisis de residuos y medición de larvas se realizaron en el Laboratorio de Fitoquímica, perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la misma universidad. El estudio fue financiado por el Proyecto Fondo SAG N° 64 (2004-2007).



FIGURA 9 Apiario experimental Santa Rosa, (UACH).

3.2 Material utilizado en laboratorio, para extracción y fortificador de ceras.

Los materiales utilizados en este estudio se detallan en el Anexo 7, entre ellos destaca el estándar externo Tau-fluvalinato, marca Dr. EHRENSTORFER importado de Alemania, el cual posee 85% de pureza, con una concentración de 100 µg/µL en ciclohexano.

3.3 Materiales para ensayo de campo.

A continuación se presentan los materiales utilizados en campo, mencionando las cantidades utilizadas por tratamiento y sus tres repeticiones.

- Materiales básicos. (Anexo 8)
 - 3 láminas de cera estampada medida Langstroth.
 - 3 láminas de poliestireno marca APICOLA CALEU para el testigo, medida Langstroth.
 - 3 marcos de madera medida Langstroth.
 - Tensador de alambre.
 - Incrustador de cera.
 - 3 colonias de *A. mellifera* L. dispuestas en colmenas de tipo Langstroth.
 - 1,95 m de alambre de diámetro 0.1 mm por marco.
 - Acumulador térmico, para mantener la temperatura inicial de las larvas de abejas de la casta obrera en el traslado al laboratorio.
 - Bolso acondicionado para el transporte de larvas, desde la estación experimental Santa Rosa hasta el Laboratorio de Fitoquímica (UACH).
- Equipo del operador. (Anexo 9)
 - Traje apícola (velo, guantes, overol).
 - Calzado tipo media bota.
 - Ahumador.
 - Acículas de pino secas como combustible para el ahumador.
 - Palanca Root.
- Medición de parámetros. (Anexo 10)
 - Regla para la medición de longitud de larva en milímetros (mm).
 - Pinzas para el manejo de larva.
 - Balanza analítica marca Sartorius, para la medición del peso de larva en gramos (g).
 - Corta cartón para sacar las muestras del panal de 14 x 4 cm.
 - Servilletas de papel para transportar las muestras.

- Termómetro ambiental para determinar la temperatura de la cámara de cría, en grados Celsius (°C).
- Aguja enmangada para la medición de la mortalidad.
- Granos de café, con el fin de neutralizar los distintos aromas al momento de realizar el análisis olfativo de las larvas.

3.4 Metodología.

La metodología aplicada cuenta con tres etapas; la primera en el Laboratorio de Fitoquímica, donde se seleccionaron y fortificaron con fluvalinato las ceras que se utilizaron en campo. La segunda etapa se efectuó en la Estación Experimental Santa Rosa, donde se realizó el ensayo de campo para determinar la relación entre ceras fortificadas con fluvalinato y el desarrollo larval, mientras que la tercera etapa se realizó en el laboratorio anteriormente nombrado, en donde se realizaron las mediciones de las larvas y un estudio cromatográfico a las ceras, con el fin de medir las concentraciones finales de fluvalinato en ellas.

3.4.1 Metodología en laboratorio. El método utilizado para la extracción y purificación de fluvalinato a partir de la cera, está basado en DE GREEF *et al.* (1994) (Anexo 11), que consiste en una extracción líquido-líquido en embudos de decantación (Anexo 12 y 13). Posterior a la extracción y purificación se realizó una cromatografía gaseosa, (con dos repeticiones), al inicio y al final del ensayo.

3.4.2 Metodología del ensayo de campo. Los principales aspectos se detallan a continuación.

3.4.2.1 Período experimental. El ensayo se realizó en la temporada de verano, entre el 4 de enero y 1 de febrero de 2007, abarcando el estudio un período total de aproximadamente 27 días.

3.4.2.2 Diseño experimental. El diseño empleado presenta una distribución completamente al azar, utilizando cuatro tratamientos con tres repeticiones; cada repetición corresponde a una colmena.

3.4.2.3 Descripción de los tratamientos. Cada tratamiento consistió en concentraciones diferentes de fluvalinato descritas a continuación.

- Tratamiento 1: 3 marcos con láminas de poliestireno, con 0 ppm de fluvalinato.
- Tratamiento 2: 3 marcos con cera estampada, con 8 ppm de fluvalinato.
- Tratamiento 3: 3 marcos con cera estampada, con 12 ppm de fluvalinato.
- Tratamiento 4: 3 marcos con cera estampada, con 18 ppm de fluvalinato.

3.4.2.3.1 Descripción de las repeticiones. Cada tratamiento fue aplicado a una unidad experimental (una unidad experimental corresponde a tres colmenas de iguales características físicas y que poseen colonias homogéneas). Cada colmena de una unidad experimental corresponde a una repetición. Gráficamente el ensayo presentó el ordenamiento que se muestra en la Figura 10.

Tratamientos	T_0 A	T_1 A	T_2 A	T_3 A	Repeticiones
T_0					A
T_1	T_2 B	T_3 B	T_1 B	T_0 B	B
T_2					C
T_3	T_3 C	T_0 C	T_2 C	T_1 C	

FIGURA 10 Distribución de los tratamientos en campo.

3.4.2.4 Orientación de las colmenas. La orientación utilizada fue Sur-Este, en función de los vientos dominantes, ya que el viento excesivo dificulta la salida y entrada de abejas a la colonia. Una colmena aireada en exceso puede afectar a las crías provocando su muerte o la incidencia de patógenos (INFOAGRO, 2006).

3.4.2.5 Ubicación de las colmenas. Éstas se ubicaron sobre un caballete de madera, con una altura aproximada de 50 cm, con la finalidad de aislarlas del suelo, y así evitar la humedad, zonas de malezas y el posible ingreso de enemigos (INFOAGRO, 2006).

3.4.2.6 Introducción de los marcos experimentales. Cada una de las 12 colmenas contiene una cámara, un piso, una entretapa, un techo y 10 marcos, de éstos, el quinto fue extraído (Figura 11) y reemplazado por un marco experimental, el cual contenía cera estampada fortificada con fluvalinato. Esta actividad se llevó a cabo en un día.

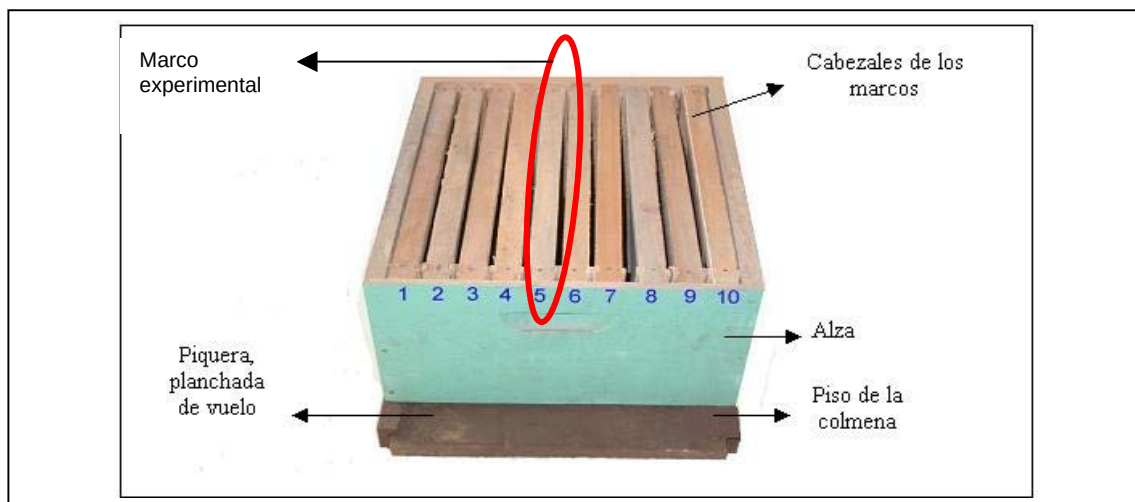


FIGURA 11 Numeración de los marcos en una colmena tipo Langstroth.

FUENTE: SEELY (2003).

El marco reemplazado es el quinto, ya que en las colmenas la cámara de cría se encuentra en el centro, pudiendo así tener oviposición de la reina, posterior al estiramiento de la cera realizado por las obreras. Para ello, las reinas de cada colmena deben ser jóvenes para asegurar una buena oviposición (2500 – 3000 huevos al día), (Figura 12). Las características que se ven a simple vista en una reina joven son: cuerpo cubierto de pelos y alas con bordes parejos (MANTILLA, 2006; LESSER, 2001).

Es importante mencionar que la cera en el marco introducido contenía concentraciones de fluvalinato inferiores a 20 ppm, por lo que no afectó a las abejas adultas de las colmenas, según lo demostrado en estudios realizados por MILANI (1995); FERNANDEZ y COINEAU (2002) los que mencionan un LD₅₀ de fluvalinato para abejas adulta de 20-200 ppm.

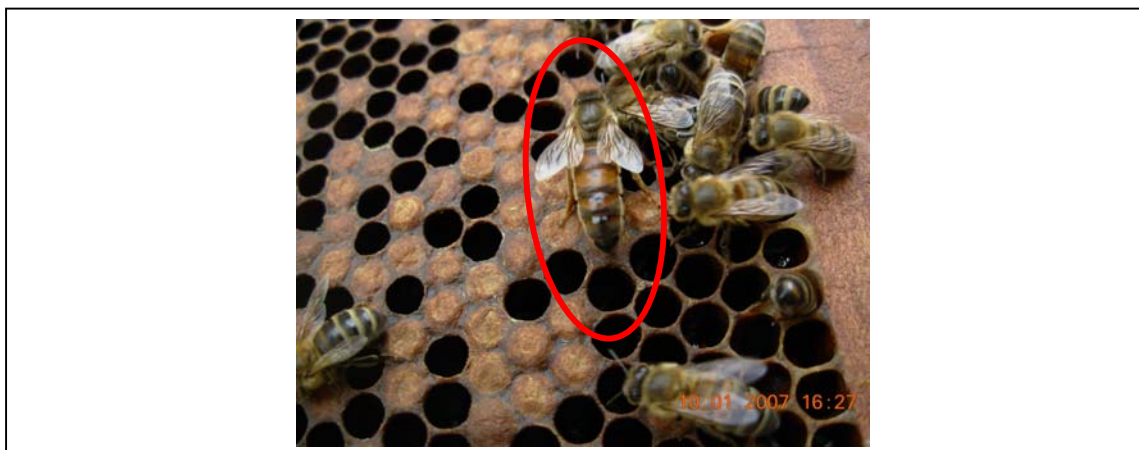


FIGURA 12 Reina joven.

Una vez finalizado el experimento, los marcos fueron extraídos y las ceras llevadas al Laboratorio de Fitoquímica, para analizar las concentraciones de fluvalinato, estos marcos fueron reemplazados por ceras no fortificadas para un normal funcionamiento de las colmenas, llevándolas nuevamente a su estado original.

3.4.2.7 Mediciones y observaciones. Éstas se realizaron los días 1, 3 y 5 del desarrollo larval, entre las 12:00 y las 17:00 horas. Se prefiere este horario para alcanzar una temperatura ambiente superior a los 12°C para abrir las colmenas (ver Anexo 14), evitando, de esta forma, descensos bruscos en la temperatura interna de las colmenas, la cual fue de 35° C y 36° C (ver Anexo 15). Se tendrá también, la consideración de no abrir las colmenas en circunstancias de lluvia o de mucho frío, por la misma razón. Las mediciones comenzaron el día 12 de enero de 2007.

3.4.2.8 Toma de muestras de larvas. Para obtener las muestras, se recolectó, por cada marco experimental, un trozo de panal de 14 cm de largo por 4 cm de ancho (Figura 13), el cual se envolvió en papel absorbente para ser trasladado a laboratorio, en un bolso acondicionado para ello con un acumulador térmico, con el fin de mantener la misma temperatura que se produce al interior de la colmena, evitando de esta forma posibles daños a las larvas.



FIGURA 13 Toma de muestra en el panal de la cámara de cría.

3.5 Parámetros a evaluar. Los parámetros (Cuadro 5) evaluados en las larvas de abeja fueron los siguientes:

CUADRO 5 Parámetros a medir en larvas de 1º, 3º y 5º estadio.

Tipo de variable	Parámetros	Normal día 1	Normal día 3	Normal día 5
Cuantitativa	Tamaño	2 mm	6 mm	10 mm
	Peso	0,0034 g	0,05 g	0,134 g
	Mortalidad	5 -35%	5 -35%	5 -35%
Cualitativa	Color	Blanco perlado	Blanco perlado	Blanco perlado
	Aroma	Sin olor	Sin olor	Sin olor

FUENTE: Adaptado de MORENO (2006); MANTILLA (2006); SONDGRASS (2006); GARRIDO (2007)²

La medición de la mortalidad de larvas se realizó en el trozo de panal, antes de ser cortado y llevado a laboratorio, con una aguja enmangada con la cual se pincharon al azar 10 larvas por cada lado de la cera, viendo así cuales se encuentran vivas o muertas como se muestra en la Figura 14.

² GARRIDO, C. (2007). Dra. Instituto de Apicultura Kirchhain. Comunicación personal.



FIGURA 14 Medición de la mortalidad de las larvas en el ensayo de campo.

Es importante mencionar que en el momento de evaluar el aroma de las larvas se utilizó un recipiente con granos de café (Anexo 16) con el fin neutralizar el olor en la nariz entre una muestra a otra (GALLARDO, 2006)³.

El parámetro evaluado en la cera (Figura 15) al finalizar el experimento, fue la concentración de fluvalinato, con el fin de establecer si existieron variaciones en los niveles de residuos del químico (ppm), durante el periodo experimental. Para esto, se tomaron tres sub-muestras por marco de cada repetición y se fundieron, obteniendo una muestra por cada repetición las que fueron analizadas por cromatografía gaseosa.

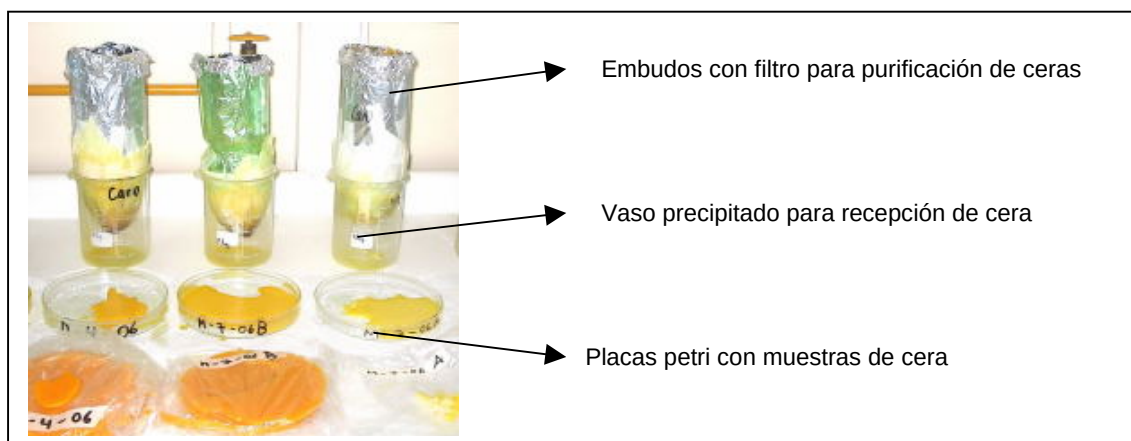


FIGURA 15 Análisis de cera en laboratorio.

³ GALLARDO, E. 2006. Ing. en Alimento. Evaluación sensorial de alimentos. Comunicación personal.

3.6 Análisis estadístico de los datos.

La información analizada se dividió en dos grupos, correspondiente a variables cuantitativas y cualitativas.

3.6.1 Variables cuantitativas. A las variables: peso y tamaño se les realizó estadística descriptiva, la cual busca especificar las propiedades importantes de los datos sometidos a análisis (HERNANDEZ *et al.*, 2003). Para el cálculo de mortalidad se utilizó la formula de mortalidad corregida (3.1) de los tratamientos de Schneider-Orelli (BAKR, 2002).

$$\%M. \text{ corregida} = \frac{(\%mortalidad \text{ tratamiento} - \% mortalidad \text{ testigo})}{100 - \% mortalidad \text{ testigo}} * 100 \quad (3.1)$$

Para el análisis de peso, tamaño y mortalidad se realizó el supuesto de homogeneidad de varianza, para luego aplicar Análisis de Varianza (ANDEVA) de un factor y test de Tukey, en donde la variable independiente fue la concentración de fluvalinato y las variables dependientes correspondieron al tamaño, peso y mortalidad de las larvas. Cuando los datos analizados no obtuvieron homogeneidad de varianza, se realizó el test de Dunnett`C indicada para esos casos (VISAUTA y MARTORI, 2002). Lo anterior se realizó en el programa computacional SPSS 12.0.

La diferencia entre las concentraciones iniciales y finales de fluvalinato de los tratamientos se analizaron estadísticamente con la prueba t de student (FREUOND *et al.*, 2000; DIXON y MASSEY, 1970). Es importante mencionar que la concentración inicial fue medida en la lámina de cera estampada (fortificada), en tanto la concentración final fue medida en la lámina de cera estirada por las abejas. Existen pocas publicaciones que cuantifiquen el aumento de volumen y peso de una lámina de cera estampada al ser estirada por las abejas.

Como referencia algunos estudios ⁴señalan que la lámina de cera estampada tiene un peso de 77 g y al ser estirada por las obreras ésta aumenta tres veces su peso, por lo que, las concentraciones finales de fluvalinato se ven disminuidas en esa proporción por adicción de cera virgen.

3.6.2 Variables cualitativas. Dentro de estas variables se encuentran: aroma y color, para las cuales se utilizó una escala nominal, en la cual los números no tienen valor real, sino que sólo designan categorías (FREUOND *et al.*, 2000) (Cuadro 6 y 7). En el Anexo 17 se encuentra la cartilla de colores utilizada en el ensayo de campo.

CUADRO 6 Pauta de evaluación para aroma.

Valor	Categorías
1	Ácido
2	Agrio
3	Sin olor
4	Podrido
5	Dulce

⁴ <http://www.apijuneda.com/datos%20tecnicos/cuadros.htm>

CUADRO 7 Pauta de evaluación para color.

Color	Código	Letra	Número
Blanco	155	B	1
Blanco perlado	155	D	2
Blanco amarillento	158	C	3
Blanco amarillento	158	B	4
Blanco grisáceo	156	C	5
Blanco grisáceo	156	D	6
Amarillo grisáceo	162	C	7
Amarillo grisáceo	162	A	8
Naranja grisáceo	165	D	9
Naranja grisáceo	165	A	10

FUENTE: ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY (RHS) (1966).

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se presentan a continuación los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos, para los parámetros peso, tamaño, color, aroma y mortalidad de larvas de abejas de la casta obrera, en el primero, tercer y quinto estadio larval (los datos se encuentran en los Anexos 18 al 22). Seguidos por la concentración final de fluvalinato en la cera de la cámara de cría al término del ensayo de campo.

4.1 Efectos de los tratamientos en el primer estadio larval en abejas de la casta obrera.

Los efectos de los cuatro tratamientos con distintas concentraciones de fluvalinato (0, 8, 12 y 18 ppm), en la cera de la cámara de cría, sobre larvas de primer estadio de la casta obrera, se presentan a continuación.

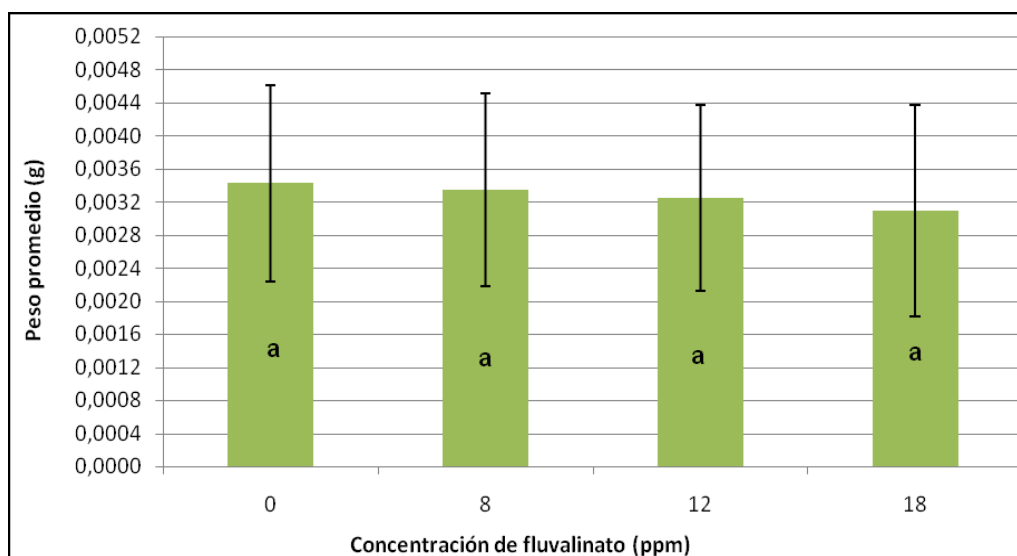
4.1.1 Peso de larvas. No existen diferencias estadísticamente significativas en los pesos promedios de larvas de primer estadio entre los distintos tratamientos. Figura 16 y 17 (los análisis estadísticos se presentan en los Anexos 23, 24 y 25).



FIGURA 16 Medición del peso de una larva de primer estadio.

Las larvas del tratamiento control, presentaron un peso promedio de 0,003427 g lo que concuerda con lo mencionado por MORENO (2006), quien señala que el peso normal de una larva de primer estadio es de 0,0034 g. Por otro lado, los autores DE FELIPE y VANDAME (2000), señalan que 0,0035 g es el peso normal para este tipo de larvas; por lo tanto el tratamiento control, así como los tratamientos 8, 12 y 18 ppm se encuentran dentro de los parámetros normales.

Aún así, dentro del rango normal descrito, el menor peso promedio lo presentó el tratamiento 18 ppm, con un 10% menos que el control. La menor diferencia se presenta en el tratamiento 8 ppm con un 2,36% menos que el control.



* Letras iguales indican diferencias no significativas, (ANDEVA).

FIGURA 17 Peso promedio de larvas de primer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.

4.1.2 Tamaño de larvas. Para este parámetro, existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos Figura 18 y 19 (los análisis estadísticos se presentan en los Anexos 26, 27, 28 y 29).

Los autores MANTILLA (2006); FERNANDEZ y COINEAU (2002), señalan que el tamaño normal de una larva obrera de primer estadio corresponde a 2 mm,

por consiguiente, el tratamiento control, es el que obtuvo los resultados más cercano a lo normal, con un tamaño promedio de 1,976 mm, no así los demás tratamientos, que obtuvieron tamaños menores.

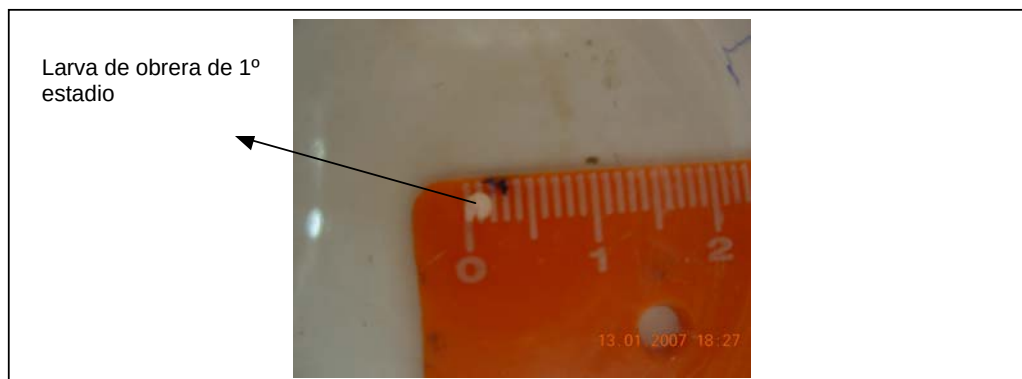
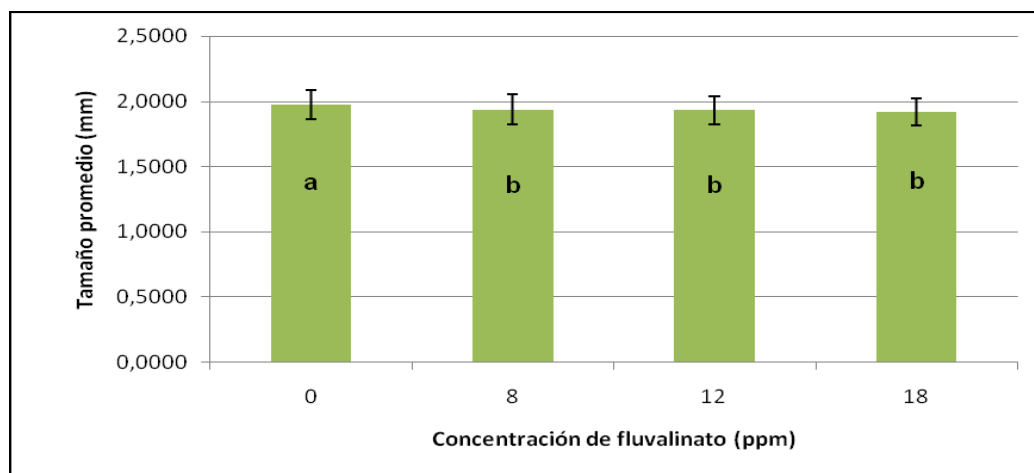


FIGURA 18 Medición de larva de primer estadio.

Las diferencias estadísticas de tamaño en las larvas de primer estadio son entre el tratamiento control y los tres restantes, vale decir que entre los tratamientos 8, 12 y 18 ppm no existen diferencias estadísticas, lo anterior indica que concentraciones mayores o iguales a 8 ppm de fluvalinato en la cámara de cría podrían afectar negativamente el tamaño de las larvas de 1º estadio.



* Letras distintas indican diferencias significativas, (Test de Tukey, 5%).

FIGURA 19 Tamaño promedio de larvas de primer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.

4.1.3 Color y aroma de larvas. Según MORENO (2006) y SONDGRASS (2006), el color natural de larvas de abeja de la casta obrera de primer estadio corresponde a blanco perlado y no poseen aroma alguno. Los resultados de las mediciones para los parámetros de color y aroma se presentan en la Figura 20.



FIGURA 20 Larva de primer estadio color blanco perlado.

En los cuatro tratamientos la totalidad de larvas observadas presentaron características normales en estos dos parámetros, por lo que se puede deducir que las concentraciones utilizadas de fluvalinato en la cera de la cámara de cría, no causan efectos adversos en el color ni en el aroma.

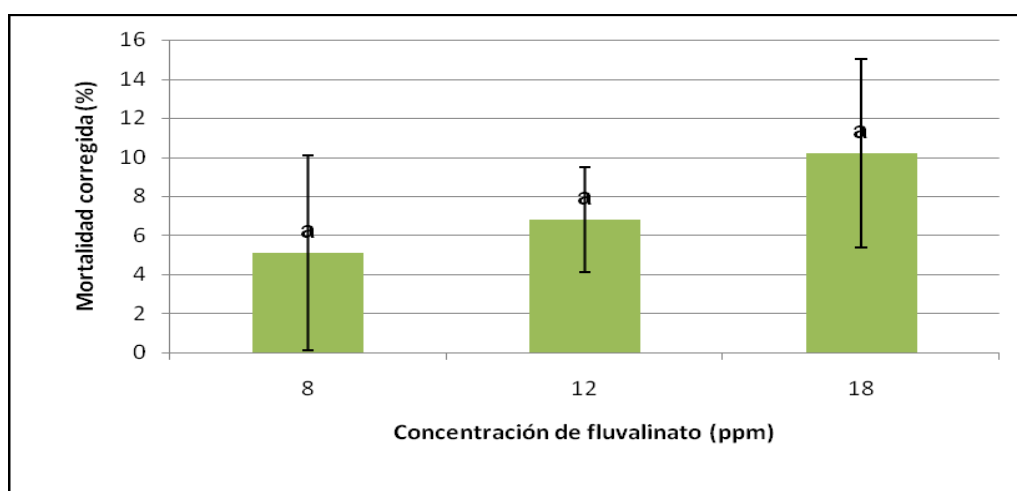
4.1.4 Mortalidad de larvas. El análisis realizado señala que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, tal como se muestra en la Figura 21 (los análisis estadísticos se presentan en los Anexos 30 y 31). No hubo problemas para medir este parámetro ya que las larvas reaccionan a los estímulos con la aguja por lo que la diferenciación entre larvas vivas y muertas no presenta mayor dificultad.

La mortalidad natural de larvas de primer estadio para la casta obrera varía entre un 5% y un 35%, por lo que no se puede asegurar que el fluvalinato en las concentraciones utilizadas cause la muerte a larvas del primer estadio². Este planteamiento coincide con LLORENTE (2007)⁵ quien propone que la mortalidad natural de larvas de primer estadio se encuentra entre los rangos 10 % y 30%,

⁵ LLORENTE, J. (2007). Lic. en Veterinaria. Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. Comunicación personal. (España).

dando a conocer que mortalidades mayores corresponden a factores externos de la vida normal de la colonia.

Para abejas adultas, en una colonia sana, la mortalidad rara vez excede el 15 % de la población y la mayor parte de estas muertes parece ser causada por las abejas que no logran mantenerse dentro del racimo GRAHAM (1992). Sin embargo, HERBERT *et al.* (1983), sostienen que el hambre es la principal causa de muerte de las colonias durante el invierno, otra causa de mortalidad son las bajas temperaturas, por lapsos prolongados (GOULD y GRANT, 1988).



* Letras iguales indican diferencias no significativas, (ANDEVA).

FIGURA 21 Mortalidad corregida de larvas de primer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.

4.2 Efectos de los tratamientos en el tercer estadio larval en abejas de la casta obrera.

Los efectos de los cuatro tratamientos con distintas concentraciones de fluvalinato (0, 8, 12 y 18 ppm), en cera de la cámara de cría, sobre larvas de la casta obrera en el tercer estadio se presentan a continuación.

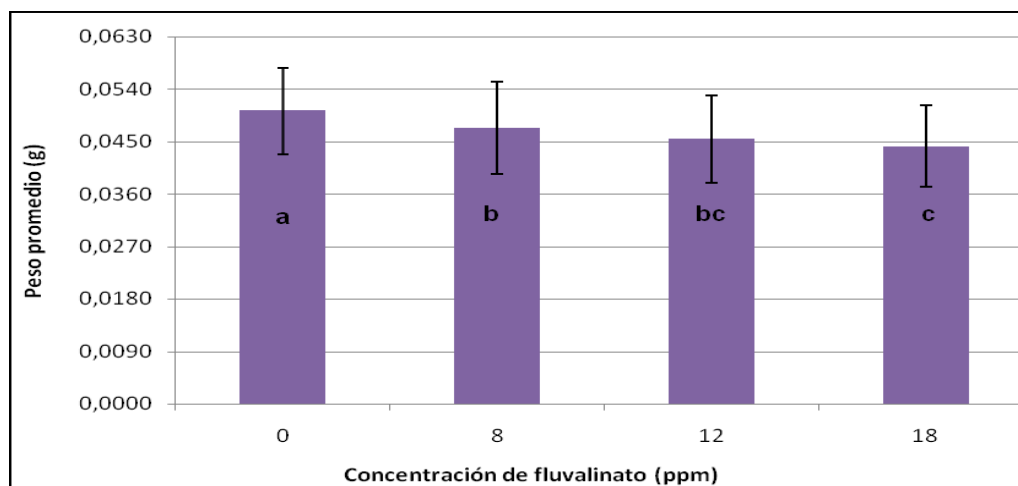
4.2.1 Peso de larvas. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos Figura 22 y 23 (los análisis se presentan en los Anexos 32, 33, 34 y 35). Estas diferencias estadísticas se presentan entre el tratamiento control y cada uno de los tres tratamientos restantes, además, existen diferencias entre el tratamiento 8 ppm con el de 18 ppm.



FIGURA 22 Medición del peso de una larva de tercer estadio.

Según MICHAUD *et al.* (2006), el peso que debieran tener las larvas de obreras cuando se encuentran en el tercer estadio o sexto día de vida en condiciones normales es de 0,055 g, a su vez MORENO (2006) afirma que las larvas de este estadio tienen un peso de 0,05 g. El tratamiento que obtuvo los parámetros normales, es el tratamiento control, con un peso promedio de 0,0503 g, el resto de los tratamientos obtuvieron cifras menores. Por lo tanto, el fluvalinato en las concentraciones utilizadas en este ensayo en las ceras de la cámara de cría provoca efectos negativos en el tamaño de las larvas de tercer estadio.

Esto concuerda con lo planteado por el SAG (2007), el cual explica que la acumulación de fluvalinato en la cera de abeja, crean situaciones de toxicidad para larvas de primeros estadios, además de la contaminación de la miel almacenada en dichas celdillas.



* Letras distintas indican diferencias significativas, (Test de Tukey, 5%).

FIGURA 23 Peso promedio de larvas del tercer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.

Cabe señalar que los residuos en cera son elevados a nivel nacional y cada vez que se recicla la cera de la cámara de cría en donde se colocan las tablillas de fluvalinato, se concentra y puede determinar niveles tan altos que sean incompatibles con la vida de la larva de las abejas en la colmena (VIT, 2005).

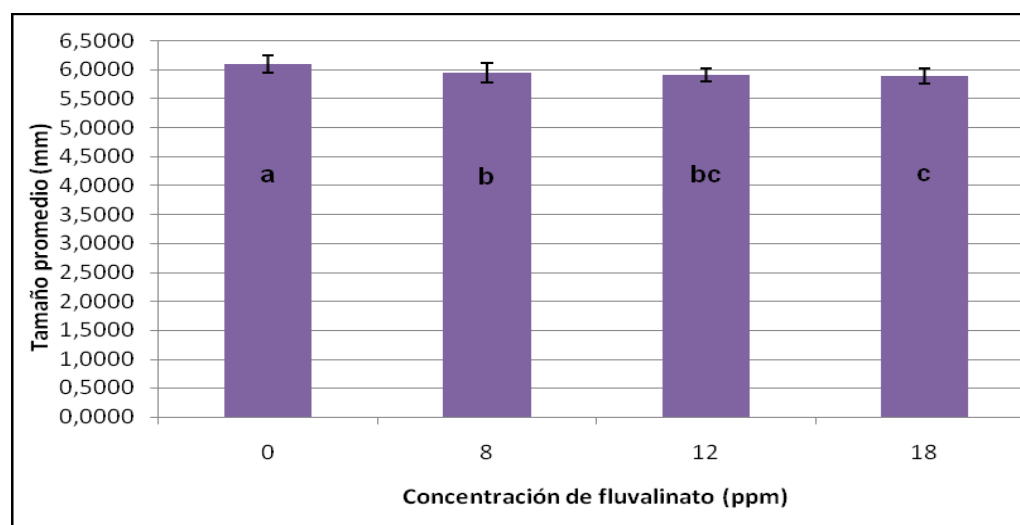
4.2.2 Tamaño de larvas. En la medición del tamaño de larvas (Figura 24) se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos Figura 25, (los análisis se presentan en los Anexos 36, 37, 38 y 39). El tratamiento control tiene diferencias con los tratamientos restantes, sólo los tratamientos 8 ppm y 18 ppm de fluvalinato presentan diferencias entre ellos, por lo que el tratamiento con 12 ppm sólo se diferencia con el tratamiento control.

MANTILLA (2006) y MONTIEL (1978) señalan que el tamaño normal para este estadio de desarrollo larval es de 6 mm. En el presente ensayo el tratamiento control obtuvo una media de 6,097 mm, siendo el valor más cercano a lo normal, las larvas de los otros tratamientos se vieron afectadas por la presencia de fluvalinato, ya que obtuvieron medias de tamaños menores al control, con una tendencia a seguir disminuyendo a medida que va aumentando la concentración de este producto en la cera de la cámara de cría.



FIGURA 24 Medición de larva de tercer estadio.

El tamaño más bajo lo obtuvo el tratamiento de 18 ppm con un 3,3 % menos que el control, la menor diferencia se encuentra entre el tratamiento 18 ppm con un 0,35% menos que el tratamiento 12 ppm. Por lo anterior, el fluvalinato en las concentraciones utilizadas en este trabajo afecta negativamente al desarrollo de las larvas de tercer estadio.



* Letras distintas indican diferencias significativas, (Test de Dunnett`C, 5%).

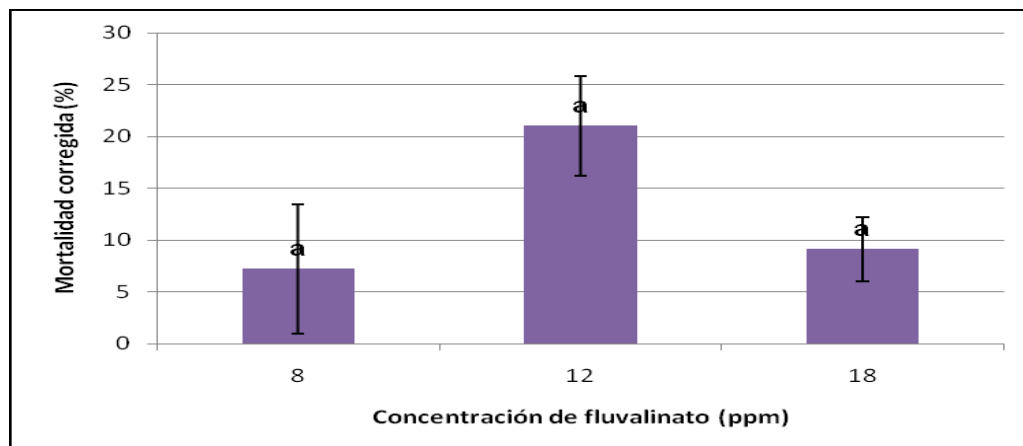
FIGURA 25 Tamaño promedio de larvas de tercer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.

4.2.3 Color y aroma de larvas. Las larvas de tercer estadio en los cuatro tratamientos tuvieron color y aroma normal (Figura 26) según lo descrito por MORENO (2006) y SONDGRASS (2006). Ambos autores señalan que los parámetros normales, en larvas de tercer estadio corresponden a blanco perlado y sin aroma. Deduciendo que las cantidades de fluvalinato utilizadas en este ensayo no provocaron efecto negativo en las larvas, en las características anteriormente nombradas.



FIGURA 26 Larva de tercer estadio, de color blanco perlado.

4.2.4 Mortalidad de larvas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos Figura 27 (análisis en Anexos 40 y 41). Se observa que el tratamiento 12 ppm presenta la mayor mortalidad de las larvas con un 22%, superando al tratamiento con mayor cantidad de fluvalinato; ésto se pudo deber a factores externos al ensayo, como irregularidades en la ventilación o humedad en las cámaras de cría. Los resultados obtenidos en estos tratamientos están dentro de los parámetros normales, ya que la mortalidad natural de larvas del tercer estadio para la casta obrera varía entre un 5% y 35% ² y un 10% y 30% ⁵.



* Letras iguales indican diferencias no significativas, (ANDEVA).

FIGURA 27 Mortalidad corregida de larvas de tercer estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.

4.3 Efectos de los tratamientos en el quinto estadio larval en abejas de la casta obrera.

Los efectos de los cuatro tratamientos con distintas concentraciones de fluvalinato (0, 8, 12 y 18 ppm), en la cera de la cámara de cría, en las larvas de la casta obrera, en el quinto estadio, se presentan a continuación.

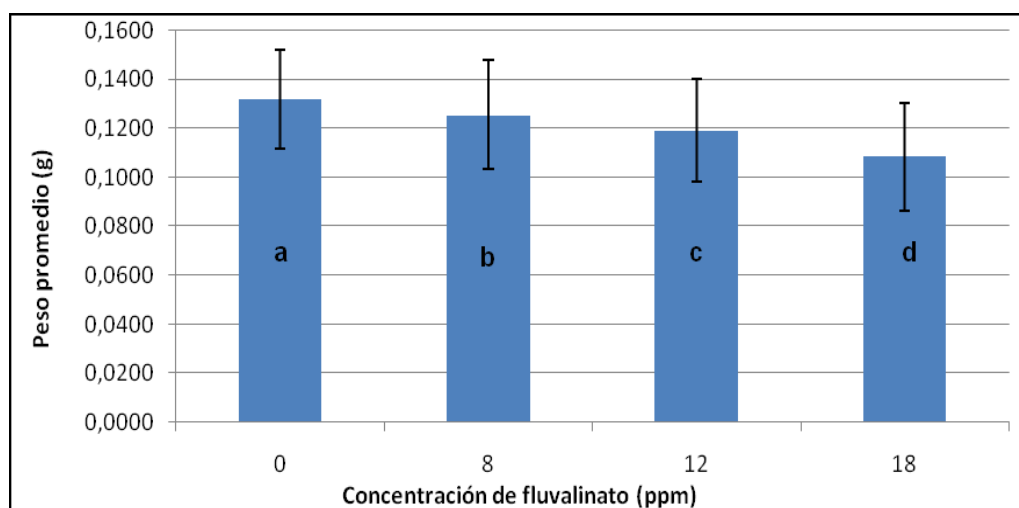
4.3.1 Peso de larvas. Para este parámetro existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, Figura 28 y 29, (los análisis se presentan en los Anexos 42, 43, 44 y 45).



FIGURA 28 Medición de larva de quinto estadio.

En relación a lo mencionado por MORENO (2006), DE FELIPE y VANDAME (2000) el peso normal que tienen las larvas de obreras, cuando se encuentran en el quinto estadio u octavo día de vida, es de 0,134 g. El tratamiento control es el que tiene el valor más cercano a lo planteado por dichos autores, con un peso promedio de 0,1321g.

En la Figura 29, se observa la disminución del peso de las larvas de quinto estadio a medida que la concentración del químico va aumentando, demostrando que el fluvalinato ocasiona problemas de desarrollo en las larvas de este estadio, ya que la diferencia de peso de larvas entre ceras que no contienen fluvalinato a otra que contiene 18 ppm del mismo, varía en forma negativa en un 17,8 %. La menor diferencia se obtuvo entre el tratamiento control y el que contiene 8 ppm de fluvalinato, con 0,0066 g menos, lo que equivale al 4,9 %. Este resultado concuerda con lo observado en el tercer estadio, en el cual ya existía un efecto, aunque no tan marcado, del fluvalinato en el peso de la larva.



* Letras distintas indican diferencias significativas, (Test de Tukey, 5%).

FIGURA 29 Peso promedio de larvas de quinto estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.

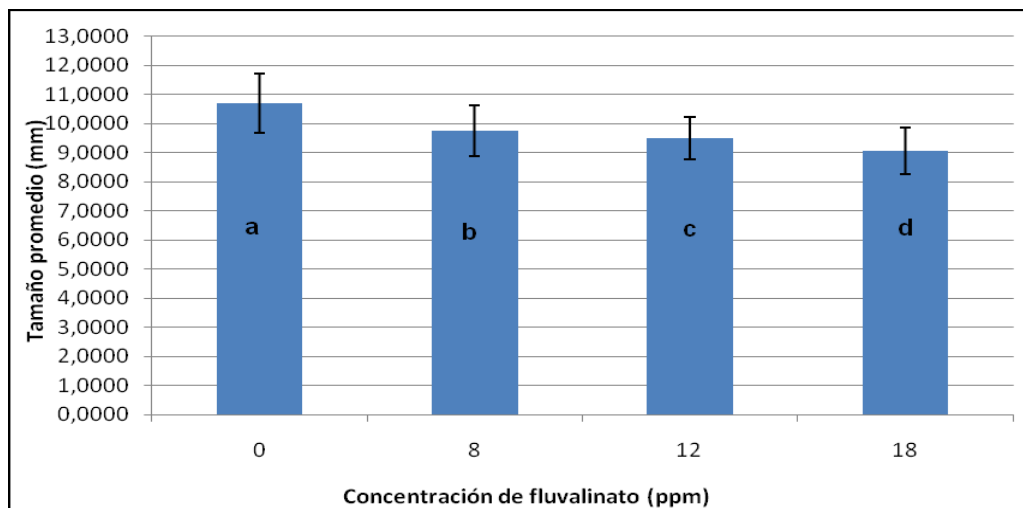
4.3.2 Tamaño de larvas. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos Figura 30 y 31, (los análisis realizados se presentan en los Anexos 46, 47, 48 y 49).



FIGURA 30 Medición de larvas de quinto estadio.

Según MANTILLA (2006) y MONTIEL (1978) para larvas de quinto estadio, el tamaño normal es de 10 mm, en este análisis se observó que el tratamiento control obtuvo una media de 10,32 mm, siendo el valor más cercano a lo normal.

En relación a los demás tratamientos, en la Figura 31, se observa que a mayor concentración de fluvalinato en la cera de la cámara de cría las larvas desarrollan tamaños menores, siendo el tratamiento que obtuvo el valor más bajo el de 18 ppm con un 12,2 % menos que el control. Entre los tratamientos 8 ppm y 12 ppm de fluvalinato se encontró la menor diferencia de tamaño, con 0,25 mm. Lo que indica que el fluvalinato causa problemas en el tamaño de larvas de este estadio, ya que provoca que no se desarrolle normalmente, obteniendo medidas menores a la normal. Lo anterior concuerda con los resultados observados en el tercer estadio, en el que el tamaño de las larvas disminuye a medida que el fluvalinato aumenta en la cera de la cámara de cría.



* Letras distintas indican diferencias significativas, (Test de Dunnett`C, 5%).

FIGURA 31 Tamaño promedio de larvas de quinto estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.

4.3.3 Color y aroma de larvas. Según MORENO (2006) y SONDGRASS (2006), el color natural de larvas de abeja de la casta obrera de quinto estadio corresponde a blanco perlado (Figura 32) y no poseen aroma alguno. En los cuatro tratamientos, la totalidad de larvas presentan características normales en estos dos parámetros, deduciendo que las cantidades de fluvalinato utilizadas en este estudio no ocasionan problemas en el color ni en el aroma de las larvas.

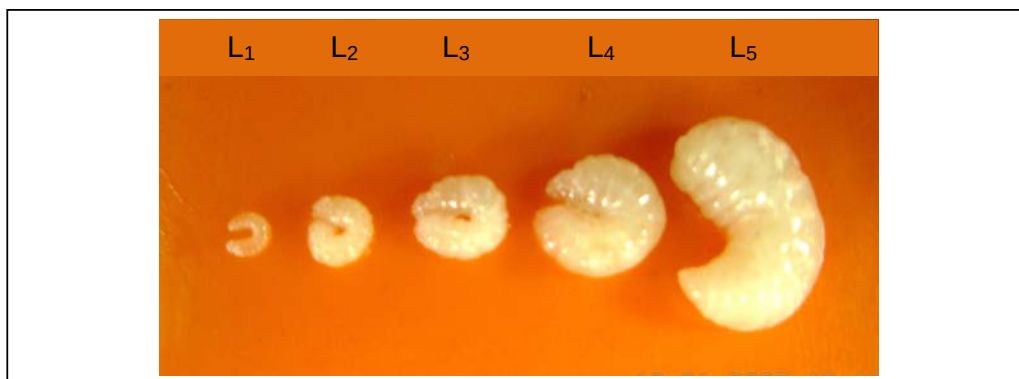
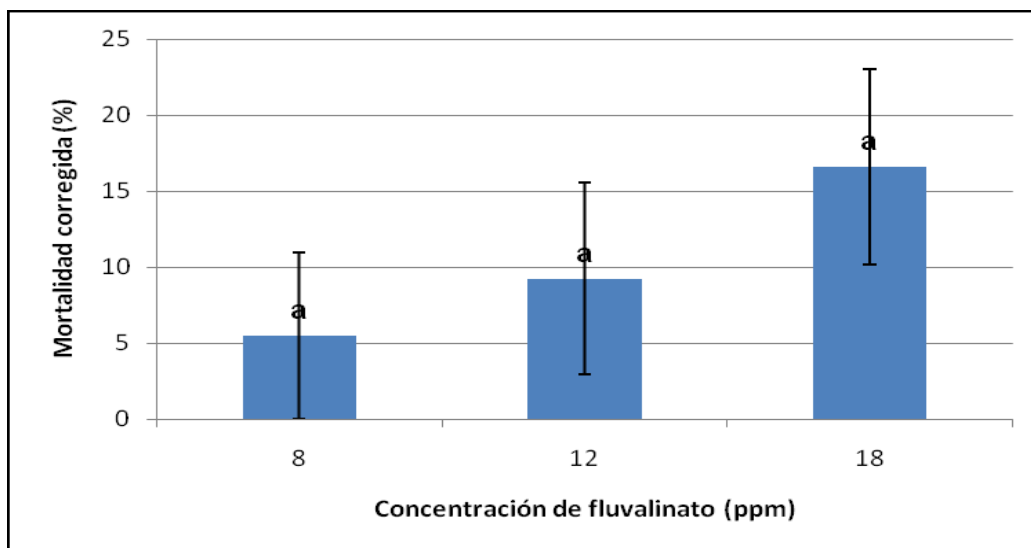


FIGURA 32 Larvas de los cinco estadios, de color blanco perlado.

4.3.4 Mortalidad de larvas. Para este parámetro no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, Figura 33 (los análisis se presentan en los Anexos 50 y 51). Los resultados de este estudio se encuentran dentro de los parámetros normales mencionados anteriormente, por lo que se deduce que las cantidades utilizadas de fluvalinato en las ceras de la cámara de cría, no influyen en la mortalidad de las larvas del quinto estadio.



* Letras iguales indican diferencias no significativas, (ANDEVA).

FIGURA 33 Mortalidad corregida de larvas de quinto estadio en las distintas concentraciones de fluvalinato en cera de la cámara de cría.

4.4 Concentración inicial y final de fluvalinato en la cera de la cámara de cría, al finalizar el ensayo de campo.

Al terminar el ensayo de campo, las ceras utilizadas se analizaron nuevamente en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Austral de Chile, con el fin de verificar si la concentración inicial de fluvalinato en las ceras de la cámara de cría se mantuvo o disminuyó.

4.4.1 Concentración final de fluvalinato en la cera, para los tratamientos 8, 12 y 18 ppm. Existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración inicial de fluvalinato y la concentración final en los tres tratamientos tal como se muestra en el Cuadro 8, los análisis estadísticos se presentan en los Anexos 52, 53 y 54.

Cuadro 8 Concentraciones iniciales y finales de fluvalinato en las ceras de la cámara de cría.

Concentración cera estampada (ppm)	Concentración cera estirada (ppm)	Disminución (%) por estiramiento	Concentración final, termino de ensayo campo (ppm)	% final de fluvalinato en la cera
8	2,6	33	0,260	10
12	4	33	0,188	5
18	6	33	0,360	6

La diferencia de fluvalinato en las ceras de la cámara de cría con respecto al inicio del ensayo se puede deber a distintos factores. Además WALLNER (1995), señala que existe migración de fluvalinato desde la cera a la miel a partir de 1 ppm, por lo que al tener valores iniciales en las ceras mayores de 8 ppm, se deduce que parte del fluvalinato que se encontraba en ellas migró. En el presente estudio se observa que la concentración inicial de fluvalinato en la cera disminuye en un 33% al ser ésta estirada por las abejas y al finalizar el ensayo de campo el químico disminuye en promedio en un 7% (los cálculos realizados se encuentran en el Anexo 55).

En cuanto a la persistencia y degradación de los residuos de fluvalinato en cera, son pocas las publicaciones que reportan la persistencia de tau-fluvalinato. BALAYANNIS y SANTAS (1992), a través de experimentos en terreno informan que a temperaturas de 35° C (la cámara de cría de las 12 colmenas utilizadas en el presente ensayo tuvieron la misma temperatura) la concentración de fluvalinato después de 24 semanas disminuye en un 90%, en tanto que a 16° C la degradación es más lenta, encontrándose disminuciones del 68%.

Sin embargo Jiménez *et al.* (1995), citado por TSIGOURI *et al.* (2001), en estudios de laboratorio, determinó una rápida degradación de los niveles de tau-

fluvalinato. Por el contrario WALLNER (1999), en ensayos a largo plazo (3 meses) no confirma el estudio previo, mencionando la estabilidad de dicho compuesto y su lenta degradación en varios metabolitos. Así mismo TSIGOURI *et al.* (2001), demostró que el fluvalinato permanece estable por más de 8 meses considerando factores como: concentración inicial de residuos, pH, temperatura de almacenamiento y tratamiento térmico simulando los sistemas utilizados en el proceso de fusión de la miel.

Según Jaycox (1987) citado por ATKINS (1993) en cera, su degradación es aún más lenta, debido a su carácter altamente lipofílico y se ha demostrado que la cera de abejas contiene hasta seis veces más químicos que la miel. Finalmente TSIGOURI *et al.* (2001) concluye que son necesarios más estudios para lograr esclarecer este aspecto, considerando otros factores al interior de la colmena que pueden tener efectos sobre la degradación o disipación del fluvalinato, como el ambiente altamente lipofílico y la actividad de las abejas.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo a la metodología y condiciones en que se realizó este ensayo se puede concluir lo siguiente:

La hipótesis del trabajo se acepta, ya que los residuos de fluvalinato causaron daños en el desarrollo larvario de las abejas obreras, específicamente en los parámetros de peso y tamaño de larvas. En relación a los parámetros color, aroma y mortalidad, el químico en las concentraciones empleadas no provocó cambios significativos.

El tratamiento control obtuvo rangos referenciales normales en todos los estadios larvarios, dentro las variables estudiadas.

Los tratamientos con 8, 12 y 18 ppm de fluvalinato, generaron resultados bajo los valores referenciales, en la variable peso en el 3° y 5° estadio. En tanto las diferencias en tamaño se observaron desde el 1° estadio en adelante.

El tratamiento más perjudicial fue aquel que contenía una concentración de 18 ppm de fluvalinato, afectando a los tres estadios estudiados, pero más fuertemente al quinto estadio, en el cual se produjeron los menores pesos y tamaños larvarios.

Por último, se concluye que la concentración de fluvalinato presente en la cera de la cámara de cría, disminuyó, al finalizar el ensayo de campo, en un 93%, lo que se puede atribuir a migración o degradación del producto. Aunque se requieren más estudios para sostener esta afirmación.

6 RESUMEN

Debido a la aplicación de fluvalinato para el control de *Varroa destructor* Anderson & Trueman, se planteó que el desarrollo larvario de las abejas de la casta obrera, presenta daños por la presencia del químico en cera de la cámara de cría, por ello se estudió el primer, tercer y quinto estadio larval. El producto fue monitoreado utilizando 4 tratamientos con 0, 8, 12 y 18 ppm del químico en ceras, con tres repeticiones. Para ello se utilizaron 12 colmenas tipo Langstroth ubicadas en el fundo Santa Rosa perteneciente a la Universidad Austral de Chile. De cada una de ellas, el quinto marco de la cámara de cría fue extraído y reemplazado por un marco experimental. Los parámetros evaluados fueron peso, tamaño, color, aroma, mortalidad y la concentración final de fluvalinato en las ceras. Los datos relacionados con las larvas fueron analizados estadísticamente por ANDEVA de un factor y la concentración final de fluvalinato en las ceras con t de student.

El estudio determinó que fluvalinato afecta el normal desarrollo de las larvas en relación al peso y al tamaño de los tres estadios, ya que no se obtuvieron valores considerados dentro de los parámetros normales; en ambos casos el quinto estadio fue el más afectado con la concentración de 18 ppm, obteniendo 17,8% menos del peso normal y un 12,2% menos de tamaño. Las características de color y aroma en larvas, no son afectadas por el químico en ninguna de las concentraciones utilizadas. En relación al parámetro de mortalidad en larvas, no se observó ningún efecto estadísticamente significativo, observándose mortalidades dentro de los rangos normales, inclusive con el tratamiento de 18 ppm de fluvalinato, por lo que el LD₅₀ de este producto para larvas de obrera es mayor a 18 ppm. El marco experimental introducido en las colmenas contenía cera estampada, por lo que las obreras al estirla le adicionaron cera virgen, situación que provocó la dilución del químico, disminuyendo la concentración final de fluvalinato en las ceras en un 93%.

SUMMARY

Due to the application of fluvalinate to control *Varroa destructor* Anderson & Trueman, rose that the larva development of working bees shows damage caused by the presence of the chemical in the beeswax of the breeding chamber, that's why one studied the first, third and fifth larvae stages. The product was monitored using 4 treatments with 0, 8, 12 and 18 ppm of the chemical on the beeswax, with three repetitions. Twelve Langstroth beehives were used at Santa Rosa station, which belongs to Universidad Austral de Chile. Every fifth frame of the breeding chamber was replaced by a treated one. The parameters of evaluation where weight, size, color, scent, mortality and the final concentration of fluvalinate in beeswax. The data related to the larva were statistically analyzed by one way ANDEVA and the final concentration of fluvalinate by t - student.

The study determined that fluvalinate affects the normal larva development in their weight and size in the three stages, for one not obtains data considered normal; in both cases the fifth stage was more affected with the concentration of 18 ppm, having less of 17,8% of the normal weight and less of 12,2% of the normal size. The color and odor of the larva is not affected by the chemical in any of the concentrations used. In relation with larva mortality, no statistically significant effect was observed, observing normal rank mortality, even with the 18 ppm of fluvalinate treatment, so the LD₅₀ of this product for the working bees is more than 18 ppm. The experimental frame put in the hives contained stamped beeswax, decreasing in 93% the final concentration of fluvalinato, so the chemical was decreasing for migration or degradation.

7 BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, D. 2000. Variation in the parasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* (Francia) 31: 281-292.
- ANDERSON, D. y TRUEMAN, J. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* (Francia) 24: 165-189.
- ARECHA VALETA, M. y GUZMÁN, E. 2001. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* (Francia) 32: (2): 157-174.
- ARGENTINA, COMISION NACIONAL DE SANIDAD APICOLA (CONASA). 2005. Recomendaciones para el control de varroa. (On line). <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/apicola/01_info/control_varroa.htm>. (20 jul. 2006).
- ATKINS, L. 1993. Injury to honey bees by poisoning. The hive and the honey bee. Dadant, Hamilton, Illinois, USA. pp: 1150-1208.
- BACCI, M. 2005. Tratamientos y productos para el control de la varroa. Uso de piretroides. (On line). <http://www.sada.org.ar/Articulos/Tecnicos/tratamientos_y_productos.htm>. (20 jul. 2006).
- BALAYANNIS, P. y SANTAS, L. 1992. Dissipation of malathion and fluvalinato residues from honey. *Journal of Apicultural Research*. (Inglaterra) 3(2): 70-76.
- BAKR, E. 2002. Fórmula de corrección Schneider y Orelli. (On line). <<http://www.ehabsoft.com/ldpline/onlinecontrol.htm>> (18 agos. 2006).

- BARRIGA, J. y NEIRA, M. 1988. *Varroa jacobsoni*, peligro potencial para las abejas en Chile. In: Seemann, P. y Neira, M. (eds). Tecnología para la producción apícola. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. Chile. pp: 31-46.
- BAYER CROP SCIENCE. 2005. Escarabajo de las colmenas. (On line). <<http://www.bayerconosur.com/noticias/tema14-3.asp>>. (20 jul. 2006).
- BEETSMA, J. 1994. The Varroa mite, a devastating parasite of western honeybees and an economic threat beekeeping. Outlook on Agriculture 23(3): 169-175.
- BIANCHI, E. 1990. Control de calidad de la miel y la cera. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO. Centro de Investigaciones Apícolas Cedia. Universidad Nacional de Santiago del Estero. República Argentina. p.53.
- BLOOMQUIST, J. 1999. Insecticides: chemistries and characteristics. (On Line) <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>> (18 feb. 2006).
- BOGDANOV, S. 2004. Cera de abeja: calidad e importancia para la apicultura. Centro Suizo de Investigación Apícola. Revista Vida Apícola N°126, Julio-Agosto, 50 p.
- BORROR, D. 1976. An introduction to the study of insects. 4th ed. The Ohio State University, USA. 852 p.
- BYRNE, D. 2004. Decisión de la comisión de 12 de febrero de 2004 relativa a la no inclusión del amitraz en el Anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia activa. Notificada con el número C (2004) 332. Diario Oficial de la Unión Europea página 35. (On line) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2004/l_046/l_04620040217es00350037.pdf> (30 sept. 2007).

- CALATAYUD, F., BARBER, C., y VERDÚ, M. 1994. Fluvalinato: Eficacia comparada de dos formas de aplicación. *Vida Apícola*. (España). 65:21-24.
- CAMAZINE, S. 1986. Differential reproduction of the mite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata, Varroidae), on Africanized and European honey bees (Hymenoptera, Apidae). *Annals of the Entomological Society of America* 79(5): 801-803.
- CASANUEVA, M. 1992. Acarofauna asociada con *Apis mellifera* L. primeros registros para Chile de *Varroa jacobsoni* Oud. *Boletín Sociedad Biológica de Concepción*. Chile. 63 p.
- CHILE, SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO, SAG. 2007. Medicamentos veterinarios de uso apícola indebidos no registrados en el SAG. (On line) <http://www.sag.gob.cl/portal/page?_pageid> (21 may. 2007).
- COLIN, M., VANDAME, R., JOURDAN, P., y DI PASQUALE, S. 1997. Fluvalinate resistance of *Varroa jacobsoni* (Acari:Varroidae) in Mediterranean apiaries of France. *Apidologie* 28: 375-384.
- CORNELL UNIVERSITY; OREGON STATE UNIVERSITY; UNIVERSITY OF IDAHO; UNIVERSITY OF CALIFORNIA AT DAVIS y MICHIGAN STATE UNIVERSITY. 1996. Fluvalinate. In: Extension toxicology network. Pesticide Information Profile. (On Line). <<http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/fluvalin.htm>> (9 jun. 2007).
- DE FELIPE, M y VANDAME, R. 2000. Curso de capacitación sobre control alternativo de varroa en la apicultura Edición 2.2. Tapachula, México. (On line) <http://www.beekeeping.com/articulos/control_varroa/curso2.htm> (3 abr. 2006).
- DE GREEF, M., DE Wael, L. y VAN LAERE, O. 1994. The determination of the fluvalinate residues in the Belgian honey and beeswax. *Apiacta* 29: 83-87.

- DE JONG, P., GONÇALVES, L. y MORSE, R. 1984. Dependence on climate of the virulence of *Varroa jacobsoni*. Bee World. (Inglaterra). 65(3): 117-121.
- DEL HOYO, M y CABRERA, C. 2004. Varroa, un problema con solución. INTA-Salta (On line)
<<http://www.inta.gov.ar/salta/info/documentos/varroa%5Fresumen%5Fold.pdf>> (14 agos. 2006).
- DIXON, W. y MASSEY, F. 1970. Introducción al análisis estadístico. 2ª ed. Madrid, España. 483 p.
- DURAN, G. 1997. Frecuencia de presentación y grado de infestación por *Varroa jacobsoni* en colmenares modernos de cinco comunas de la provincia de Ñuble. Memoria Med. Vet. Chillán. Universidad de Concepción, Facultad de Medicina Veterinaria. 42 p.
- EISCHEN, F. 1996. Botanical acaricides and varroa control. American Bee Journal. 136(4): 277-278.
- EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS, (EMA). 1995. Committee for veterinary medicinal products. Tau-fluvalinate. Revised summary report (On line).
<<http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/002195r1.pdf>> (17 mar. 2006).
- FAUCON, J.; DRAJNUDEL, P. y FLECHE, C. 1995. Mise en evidence de l'efficace de l' Apistan utilisé contre la varrose de l'abeille (*Apis mellifera*), Apidologie. (Francia) 26: 291-296.
- FAUCON, J. y DRAJNUDEL, P. 1996. Étude de la baisse d'efficacité de l'Apistan. Recherche du temps létal. Autres moyens de lutte. La Santé de l'Abeille, (Francia) 154: 165- 172.

- FERNANDEZ, N. y COINEAU, Y. 2002. Varroa. El verdugo de las abejas. Conocerla bien para combatirla mejor. Paris, Francia. Atlántica. 239 p.
- FREDES, F. 1993. Varroasis: Un nuevo problema parasitario para Chile. Monografías de Medicina Veterinaria (Chile) 15 (1): 11-16.
- FREUOND, J., MILLER, I. y MILLER, M. 2000. Estadística matemática con aplicaciones. Pearson educación. Sexta edición. Naucalpan de Juárez, México. 624 p.
- GOULD, J. y GRANT, C. 1988. The honey bee. New York, USA. Freeman and Company. 239 p.
- GRAHAM, J. 1992. The Hive and the Honey Bee. Michigan, USA. Bookcrafters Chelsea. 1324 p.
- GRAJALES, M. y SCHMIDT, J. 2001. Origen de la cera. Apícola Integral las Piedras. Uruguay. (On Line) <<http://webs.demasiado.com/apicultura/cera.html>>. (2 abr. 2006).
- GRANDJEAN, M y CAMPO, S. 2002. Manual de buenas prácticas para la apicultura. Serie de instrumentos técnicos para la microempresa rural. (On line). <<http://www.promer.cl/biblioteca/manual-buenas-practicas.pdf>> (15 feb. 2006).
- GÓMEZ, P. 2000. La varroosis en España, situación actual. Vida Apícola (España) 102: 49-53.
- HERBERT, E., SHIMANUKI, H. y ARGANER, R. 1983. Effect of feeding pollen substitutes to colonies of honey bees (Hymenoptera : Apidae) exposed to Carbaryl. Entomological Society of America. 12 (3) : 758-762.
- HERNANDEZ, R., FERNANDEZ, C. y BAPTISTA, P. 2003. Métodos de la investigación. Ciudad de México, México. Mc Grow Hill interamericana. 705 p.

- HIGES, M. 1996. Tratamientos alternativos en la lucha contra la varroa. En: XV Feria Apícola. Castilla- La Mancha, España. 130 p.
- HIGES, M., LLORENTE, J., y SANZ, j. 1998. Varroa. Sensibilidad al fluvalinato. Vida apícola. (España). 89:41-45.
- HINOJOSA, A. y GONZALEZ, D. 2004. Prevalencia de parásitos en *Apis mellifera* L. en colmenares del secano costero e interior de la VI Región, Chile. Parasitología Latinoamericana (Chile) 59: 137-141.
- INFOAGRO. 2006. Manejo apícola. Instalación del colmenar o apiario y alimentación de la colonia. (On line) <<http://www.infoagro.com>>. (14 agos. 2006).
- LESSER, R. 2001. Manual de apicultura moderna. 3ª ed. Santiago, Chile. Universitaria. 213 p.
- , 2004. Manual de apicultura moderna. 4ª ed. Santiago, Chile. Universitaria. 143 p.
- LIU, T. 1992. Fluvalinate and its after effects. American Bee Journal 132(6): 398.
- LODESANI M., COLOMBO, M. y SPREAFICO, M. 1995. Ineffectiveness of Apistan® treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud. In several districts of Lombardy (Italy). Apidologie 26(1): 67-72.
- LODESANI, M.; PELLACANI, A.; BERGOMI, S.; CARPANA, E.; RABITTI, T. y LASANGI, R. 1992. Residue determination for some products used against varroa infestation in bees. Apidologie, 23: 257-272.
- LLORENTE, J. 1994. Tratamiento químico contra la *Varroa jacobsoni*. Perspectivas futuras en el control de la varroasis. En: XIII Feria Apícola. Castilla- La Mancha. Pastrana, España. 130 p.

- MARLETTO, F. 1994. Problemas de resistencia de *Varroa jacobsoni* Oud. a acaricidas detectados en Italia. En: XIII Feria Apícola. Castilla- La Mancha. Pastrana, España. 139 p.
- MANTILLA, C. 2006. Castas y ciclos de vida de la abeja. (On line). <<http://virtual.unal.edu.co/cursos/sedes/medellin/b4040/lecciones/cap01/1-.html>> (25 feb. 2006).
- MICHAUD, B.; SAINT, D. y DE BERDOULOU, C. 2006. Los otros productos de la colmena. (On line) <<http://www.lunedemiel.tm.fr/espagnol/05.htm>> (24 ene. 2006).
- MILANI, N. 1995. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* 26: 415-429.
- 1999. The Resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to acaricides. *Apidologie* 30: 229-234.
- 2001. The resistance to chemotherapy in parasites and pathogens of the honeybee / Euro Konference on Molecular Mechanismus of Disease Tolerance in Honeybees. Proceedings, Bee Institute Dol, Czech Republik. Pp: 117-131.
- MONTIEL, J. 1978. Varroosis en abejas. Dirección Nacional de Fiscalización y Comercialización Ganadera. Secretaria de Estado de Agricultura y Ganadería. Bs. As. Argentina. 30 p.
- MORENO, A. 2006. Manual control de enfermedades apícolas (descripción diagnostico y tratamiento). Red Nacional Apícola. Chile. (On line) <<http://www.promer.cl/getdoc.php?docid=751>>. (25 feb. 2006).

- MORSE, R. y NOWOGRODZKI, R. 1990. Mites: Varroa and Other Parasites of brood. In: Honey Bee Pest, Predators, and Diseases. Comstock. Cornell University Press. USA. pp: 201-300.
- MUTINELLI, F. 2003. Control integrado de la varroosis. (On line) <http://www.beekeeping.com/articulos/calidad_colmena.htm>. (21 sept. 2006).
- NEIRA, M. 1999. Apicultura. In: Amtmann, A; Mujica, F. Y Vera, B. (eds). Pequeña agricultura en la Región de los Lagos, Chile. Universidad Austral de Chile. pp: 261-295.
- NEIRA, M. 2001. Residuos que contaminan la miel, origen, detección y formas de evitar su presencia. In: Seminario Internacional Sanidad Apícola. 4 de octubre de 2001, Temuco, Chile. pp: 46 – 56.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). 2005. Codex Alimentarius: notas sobre las Plaguicidas. (On line) <http://faostat.fao.org/faostat/pestdes/pest_ref/prfs_195.htm> (20 jul. 2006).
- OYARZUN, M.; FIGUEROA, A. y TARTANAC, F. 2005. Oportunidades de mejoramiento en la calidad e inocuidad de la cadena productiva de la miel en Chile. Santiago, Chile. 101 p.
- PELDOZA, J. 1992. Varroasis de las abejas. Presencia en Chile. El Campesino (Chile) 123 (8): 47-58.
- RÍOS, L. 2001. Caracterización de explotaciones apícolas de la IX y X Región. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 100 p.
- RITTER, W. 1981. Varroa disease of the honey bee *Apis mellifera*. Bee World (Inglaterra) 62(4): 141-151.

- RIVERA, A. 2006. Velas y figuras de ceras de abejas. Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, México. (On line) <<http://www.sagarpa.gob.mx/dgg/apicola/manera.pdf>> (15 dic. 2006).
- ROBLES, M. 1995. Ensayo de la eficacia del método biotécnico “cría de zángano dirigida” en el control de varroasis. Vida Apícola (España) 73:16.
- ROSIER, M. 1994. Synthetic pyrethroids insecticides “cypermethrin”, toxicol. London, Inglaterra. (On line) <<http://www.laneta.apc.org/emis/sustanci/plaguici/ciper.htm>> (12 sept. 2006).
- ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY (RHS). 1966. The colour chart. London, Inglaterra.
- ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. 1990. The agrochemicals handbook. England. Graham. 1500 p.
- SAMMATARO, D; GERSON, U. y NEEDHAM, G. 2000. Parasitic mites of honey bees: life, history, implications, and impact. Annual Review of Entomology. 45 : 519 – 548.
- SANFORD, M.; DENMARK, H.; CUTTS, L. y CROMROY, H. 2004. Featured creatures. <http://creatures.ifas.ufl.edu/misc/bees/varroa_mite.htm> (24 agos. 2006).
- SEELY, T. 2003. The control of the type of comb constructed -worker comb or drone comb- is decentralized. Cornell University. (On Line). <www.nbb.cornell.edu/neurobio/seely/seely_res_rets.html> (5 sept. 2006).
- SILLARD, S. 2002. Residuos de fluvalinato en cera de abejas de colmenares de la Décima Región. Tesis Lic. Ing. Alimentos Valdivia, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 86 p.

- SLABEZKI, Y.; GAL, H. y LENSKEY, Y. 1991. The effect of fluvalinate application in bee colonies on population levels of *Varroa jacobsoni* and honey bees (*Apis mellifera* L) and on residues in honey and wax. *Bee Science* 1(4): 189-195.
- SONDGRASS, E. 2006. Anatomía de la abeja melífera. Informe técnico. (On line) <<http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/anatomia/inftotal.pdf>> (13 mar. 2006).
- SOTO, V. 2002. Niveles de infestación del ácaro *Varroa destructor* Anderson & Trueman, (Acari: Varroidae) en abejas adultas y crías de obreras en 67 explotaciones apícolas de la IX Región de la Araucanía, Chile. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias agrarias. 101 p.
- THOMPSON, H.; BROWN, M.; BALL, R. y BEW, M. 2002. First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. *Apidologie* (Francia) 33 (4): 357-366.
- TSIGOURI, A.; MENKISSOGLU - SPIROUDI, U. y THRASYVOULOU, A. 2001. Study of tau-fluvalinate persistence in honey. *Pest Management Science* 57: 467 – 471.
- UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE (UACH). 2003. Informe técnico final. Proyecto Apícola Fondo SAG nº 71. 14p.
- VANDAME, R. 2000. Control alternativo de *Varroa jacobsoni* en apicultura con ácido fórmico, ácido oxálico y tímolo. VI Encuentro Nacional de Ciencia y Tecnología Apícola, Valdivia, Chile 12 al 14 de agosto.
- VANDAME, R., COLIN, M., OTERO, G. 2003. Abejas europeas y africanizadas en México: la tolerancia a *Varroa jacobsoni*. (On line) <http://www.beekeeping.com/articulos/vandame/vandame2_sp.htm> (21 sept. 2006).

- VELIS, G.; EGUARAS, M.; OPPEDISANO, M. y FERNANDEZ, N. 1993. Diminuzione della popolazione de *Varroa jacobsoni* Oud. in alveari trattati con diversi acaricidi. Apicoltore Moderno, 84: 193-198.
- VERDE, M. 2002. Acciones complementarias a los tratamientos contra la varroa. Estrategias propuestas por la Dirección de Apicultura Cubana. Tema II varroasis. Medidas de Lucha y Control. El Uso del Panal Trampa. Revista Espacio Apícola. Argentina. Año XII, No. 55, pp: 4 – 11.
- VISAUTA, B. y MARTORI, J. 2002. Análisis estadístico con SPSS para WINDOWS®. Volumen II. Estadística multivariable. 2 ed. Madrid, España. 348 p.
- VIT, P. 2005. Productos de la colmena secretados por las abejas: Cera, jalea real y veneno. Caracas, Venezuela. Revista Cielo. 2005; 34(2): 32-39.
- WALLNER, K. 1995. The use of varroacides and their influence on the quality of bee products. American Bee Journal 135 (12): 817-821.
- WALLNER, K. 1999. Varroacides and their residues in bee products. Apidologie 30: 235-248.
- YAÑEZ, G. 2004. Evaluación de dos formas de aplicación de vaselina líquida, para el control del ácaro *Varroa jacobsoni* Oudemans en abejas *Apis mellifera* L., en la comuna de Freire sector San Ramón, IX Región, durante el período. Tesis Lic. Agr. Temuco, Universidad Católica de Temuco. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. 82 p.

ANEXOS

ANEXO 1 Clasificación taxonómica de *Apis mellifera* L.

Phylum	Artrópoda
Superclase	Insecta
Clase	Pterigógenos
Subclase	Holometábolos
Superorden	Himenópteros
Orden	Apócrifas
Suborden	Aculeados
Familia	Apidae
Subfamilia	Sociales
Género	Apis
Especie	Mellífera
Subespecie	mellífera

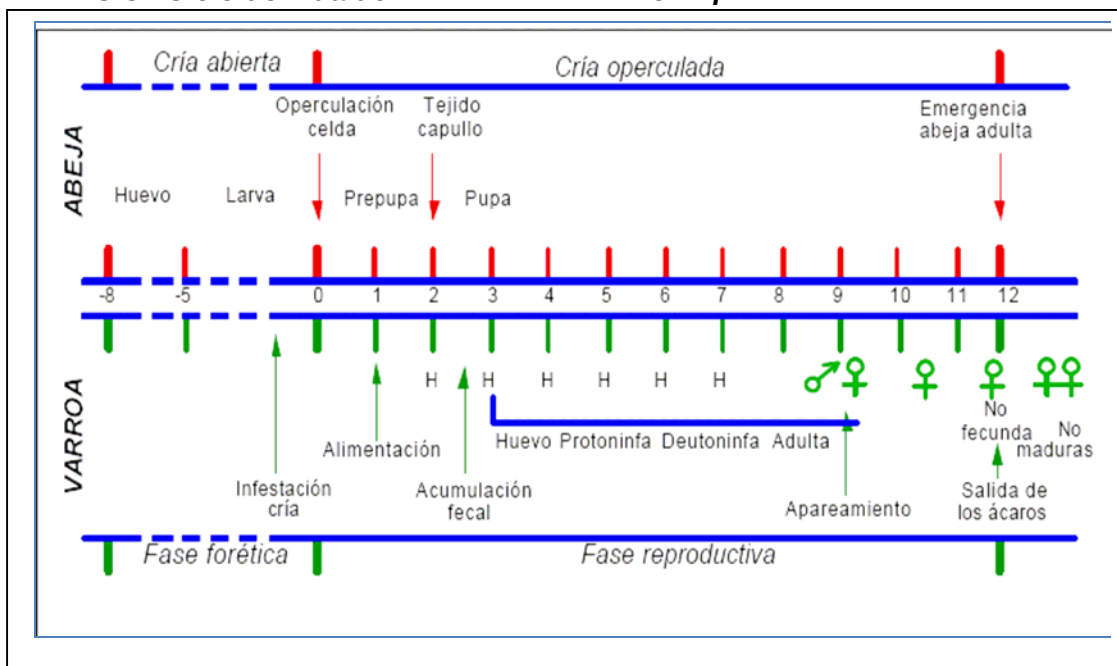
FUENTE: MORENO (2006) y BORROR (1976).

ANEXO 2 Clasificación taxonómica de *Varroa destructor*.

Phylum:	Artrópoda
Subphylum:	Chelicerata
Clase:	Arácnida
Subclase:	Acari
Orden:	Mesostigmata
Familia:	Varroidae
Genero y especie:	<i>Varroa destructor</i> Anderson & Trueman (anteriormente clasificado como <i>Varroa jacobsoni</i> Oud, reclasificado en el año 2000) (ANDERSON y TRUEMAN, 2000).

FUENTE: BARRIGA y NEIRA (1988).

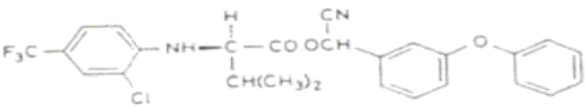
ANEXO 3 Ciclo de vida de *Varroa destructor* en *Apis mellifera* .



FUENTE: VANDAME (2000).

*Entre las dos líneas al centro, se indica el número de día, tomando como cero el día de la operculación. En la parte superior se presenta el desarrollo de la abeja y en la inferior el desarrollo del ácaro.

ANEXO 4 Características químicas del fluvalinato.

Fórmula química	
Fórmula molecular	$C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$
Nombre químico	(RS)--ciano-3-fenoxibenzil N-(2-cloro--trifluoro-ptolyl)-D-valinato. (IUPAC).Ciano(3- fenoxifenil)metil N-[2-cloro-4 (triflurometil) fenil]-D-valinato. (C.A.)
Familia química	Piretroides, trifluorometilos
Peso molecular	502,23
Estado físico	Aceite viscoso
Color	Amarillo
Densidad	1,29 g/cm ³
Presión de vapor	< 1*10 ⁻⁷ torr a 25°C
Solubilidad	Insoluble en 0,005 µ/ml de agua (2 ppb).
Altamente soluble	en solventes orgánicos e hidrocarburos aromáticos
Punto de ebullición	> 450° C

FUENTE: Adaptado de ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (1990) y CORNELL UNIVERSITY *et al.* (1996).

ANEXO 5 Nivel de contaminación de la cera con residuos de fluvalinato descrito por distintos autores.

Fuente	Nivel de residuos encontrados en mg/kg (ppm)
BOGDANOV <i>et al.</i> , 1990	De 0,2 a 7,3. Promedio 1,9
BORNECK, 1991	1,9
FAUCON, 1991	4,94
SLAVEZKI <i>et al.</i> , 1991	0,54 + 0,21 en exposición de 6 a 8 semanas, 0,83 + ,077 en exposición de 6 meses
LIU, 1992	0,9 a 1,2 en exposición de 4 semanas, 0,24 en exposición de 13 meses
LODESANI <i>et al.</i> , 1992	0,001 a 7,37 en exposición de 4 años
DE GREEF <i>et al.</i> , 1994	> Muestras presentan entre 1 y 10
NOWACKA <i>et al.</i> , 1994	Muestras 0,50 a 36,5
WALLNER y PECHHACKER, 1994	El 53% de las muestras presenta entre 0,05 y 3,5
BOGDANOV <i>et al.</i> , 1996	Control. 0,20 a 7,3 en promedio 1,90 Cera comercial: 100% muestras entre 1,50 y 3,40 Cera apicultores: 20% muestras entre 0,40 y 1,30
BOGDANOV <i>et al.</i> , 1998	Cera original: 17. Cera hervida 1H: 26,90 Cera hervida 2H: 26,50. Cera 1H en autoclave (140°C): 27,10. Cera 2H en autoclave (140°C): 24,3
FRISON <i>et al.</i> ,1999	Entre 0,25-2,12
WALLNER, 1999	Alemania: 37,2% positivas entre 0,50 y 10 Internacionales: 55,1% positivas entre 0,50 y 15

FUENTE: SILLARD (2002).

ANEXO 6 Composición química y propiedades físicas de la cera de abejas (*Apis mellifera* L.).

Composición química	
Esteres ácidos	1%
Poliésteres ácidos	2%
Hidrocarburos	14%
Monoésteres	35%
Diésteres	14%
Triésteres	3%
Hidroximonoésteres	4%
Hidroxipoliésteres	8%
Ácidos libres	12%
Alcoholes libres	1%
Propóleos, polen y pigmentos	6%
Propiedades Físicas	
Punto de fusión	63-65°C
Valor ácido	17-22
Valor éster	70-80
Valor saponificación	87-102
Valor proporcional	3,3-4,3
Densidad relativa a 15°C	0,958 - 0,970
Densidad relativa a 25°C	0,950 – 0,960
Punto de quema	242 - 250°C
Índice de refracción a 75°C	1,4398 – 1,4451
Constante dieléctrica	2,4

FUENTE: SILLARD (2002).

ANEXO 7 Materiales utilizados en laboratorio para la extracción y fortificación de las ceras.

Muestras de cera. La procedencia de las muestras de cera y sus concentraciones iniciales de fluvalinato se detalla a continuación.

- Paillaco, X Región, muestra donada por Apicoop, concentración de fluvalinato: 0,0843 ppm.
- Coyhaique, XI Región, muestra proporcionada por Myriam Rojas, del apicultor Paulo Quezada, concentración de fluvalinato: 0 ppm.
- Nancagua, VI Región, muestra donada por Edumilia Romero de Apícola Yáquil, concentración de fluvalinato: 0,042 ppm.

Materiales para extracción de fluvalinato. Los materiales que se utilizaron para la extracción de fluvalinato en la cera se detallan a continuación:

- Vasos precipitados, pipetas, matraces, baguetas, tubos de ensayo, embudos de decantación, frascos y probetas.
- Soportes universales, nueces, papel y alusafoil.
- Vasos cubiertos de papel aluminio con el extremo de papel filtrante.
- Tres recipientes metálicos de 1000 ml.

Equipos de laboratorio. Los equipos que se utilizaron para la extracción de fluvalinato en la cera se detallan a continuación:

- Estufa marca Heraues, tipo RTG 360, temperatura máxima 220 °C.
- Cromatógrafo de gases marca VARIAN, Modelo CP 3800, con detector de captura de electrones (DCE), columna capilar DB-5 (metil 5% fenil silicona) de diámetro interno 0,25 mm y 30 m de largo, con una estación de control "Varian Chromatography Workstation, Star System Control, versión 5.31"
- Baño ultrasonido marca COLE PALMER. Rango 47khz.

(Continua)

Continuación Anexo 7

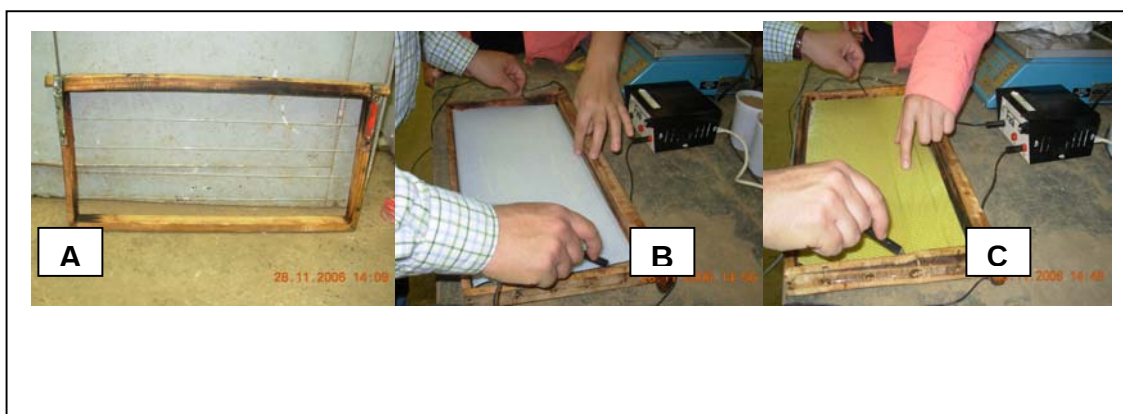
- Refractómetro digital manual marca ATAGO. Rango: 0-32°Brix. Grado de precisión: 1°Brix.
- Baño termostático marca HERAUES
- Balanza analítica marca SARTORIUS. Modelo A200S. Rango: 1 mg a 200 g. Grado de precisión: 0,1mg.
- Estufa MEMMERT, tipo U25. Rango: 1-220°C. Grado de precisión: 1°C.
- Centrífuga marca CHRIST. Tipo UJ. Modelo 3000. Rango: 1800-4200 rpm.
- Evaporador rotatorio digital marca HEIDOLPH. Modelo Laborota 4002.
- Bomba de vacío marca VACUBRAND. Tipo ME 2C. Rango: 50-60hz
- Soporte para columnas de separación cromatográfica (Vacuum manifold).

Estándar. EL estándar corresponde a TAU-FLUVALINATO, marca Dr. EHRENSTORFER importado de Alemania. Posee 85% de pureza, con una concentración de 100 µg/µL en ciclohexano. Con él se prepararon tres soluciones para fortificar las ceras.

Reactivos químicos. Los reactivos químicos utilizados en la extracción y purificación de las muestras se detallan a continuación:

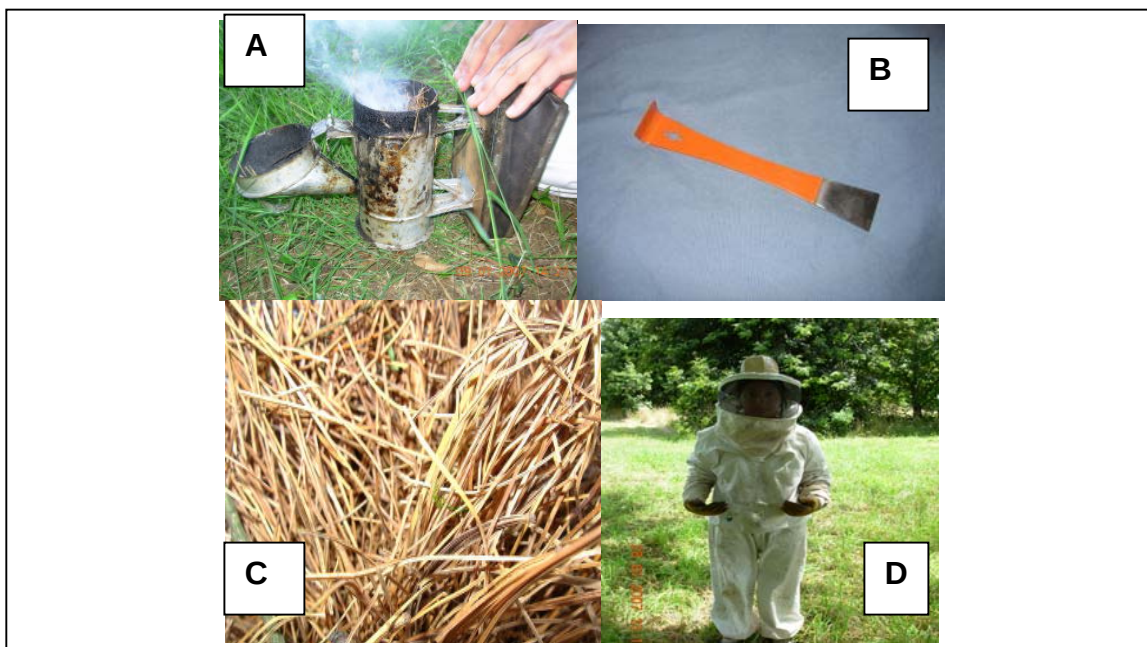
- n-Hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) Merck , grado para análisis, pureza 99%, con una temperatura de ebullición de 68 ° C.
- N-N Dimetilformamida (DMF) ($\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$) Merck grado para análisis, pureza 99,5%, con una temperatura de ebullición de 153 ° C.
- Ciclohexano (C_6H_{12}) Merck, grado para análisis, pureza 99,5%, con una temperatura de ebullición de 80,7 ° C.
- Diclorometano (CH_2Cl_2) Merck, división americana Em Science, grado análisis de residuos, pureza 99,98%, con una temperatura de ebullición entre 39,5 – 40,5°C.
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), Fluka, grado para análisis, pureza 99,5%, preparado al 5% (P/V).
- Columnas de extracción en fase sólida de florisil, montadas sobre un equipo al vacío Vacuum Manifold.

ANEXO 8 Materiales básicos utilizados en el ensayo de campo

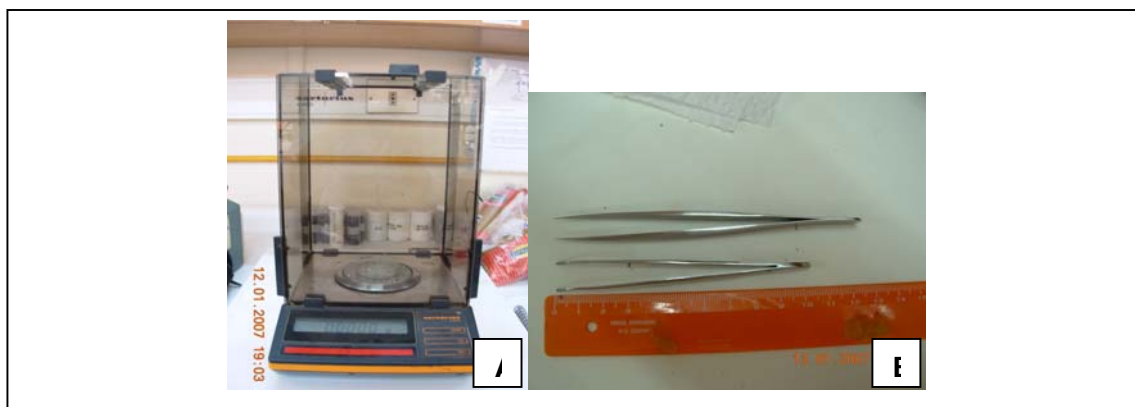


A: Marco alambrado; **B:** Marco con lámina de poliestireno; **C:** Marco con cera estampada.

ANEXO 9 Equipo del operador.



A: Ahumador; **B:** Palanca Root; **C:** Acículas de pino como combustible; **D:** Traje de protección.

ANEXO 10 Materiales para la medición de peso y tamaño de larvas.

A: Balanza analítica; **B:** Regla y pinzas.

ANEXO 11 Metodología utilizada en laboratorio.

Procedimientos de laboratorio. La cera recepcionada, fue separada de la miel por gravedad y luego pasada a un proceso de sucesivos lavados, para extraer todos los restos de miel. A continuación se detalla la preparación de las muestras.

Lavado de la muestra de cera. La muestra de cera fue sometida a un lavado previo, el cual se desarrolló de la siguiente manera: se pesaron aproximadamente 100 g de cera, dividiéndose en pequeños trozos y agregándole 500 ml de agua desionizada a 45 °C. Se colocó en el baño de ultrasonido por 20 minutos, luego con ayuda de un colador se cambió el agua (es importante destacar que el agua no fue vertida hacia las cañerías, si no que vaciada en bidones para posteriormente ser quemados, de esta forma se evita diseminar la enfermedad loque americana), el procedimiento se repite alrededor de 5 - 6 veces o hasta que la lectura del refractómetro indique 0 °Brix.

Luego que el refractómetro indica 0 °Brix, las muestras son secadas en bandejas con papel aluminio en la estufa a 55 °C, por dos a tres días, posteriormente con la cera ya seca se procede a la extracción del fluvalinato.

(Continúa)

Continuación Anexo 11

Extracción del fluvalinato. El método utilizado está basado en la metodología propuesta por DE GREEF *et al.*, (1994) para análisis de residuos en cera de abejas, que consiste en una extracción líquido-líquido en embudos de decantación; luego la muestra es diluida en una columna de gel de silicato de magnesio florisil y posteriormente evaporada a sequedad para su cuantificación final.

El método consistió en dos fases, la primera; pesando 1 g de cera, la que se disolvió en 10 ml de n-hexano con ayuda de un baño termoregulado a 55 – 60 °C, por diez minutos. Luego la mezcla se centrifugó a 3100 revoluciones por minuto (rpm) por veinte minutos, con el fin de separar materias extrañas presentes en la cera (polen, restos de pupa, etc.). El sobrenadante se recibió en embudos de decantación de 50 ml y se procedió a su extracción 4 veces con 5 ml DMF. La capa inferior fue recibida en un embudo de 125 o 250 ml y se le agregaron 40 ml de sulfato de sodio al 5 % (a una temperatura de 30 °C) y 4 ml de n-hexano, luego se procedió a agitar vigorosamente la mezcla. La capa superior del embudo se recibió en matraz de 10 ml, el cual se aforó con n-hexano.

La segunda fase correspondió a la purificación del extracto, antes de su ingreso al cromatógrafo. Se tomó 1 ml del extracto y se pasó por una columna de florisil previamente activada con 6 ml de n-Hexano, luego se agregó 4 ml de n-Hexano: diclorometano (1:1) y 6 ml (3:7). El extracto fue purificado sobre un equipo manifold sin vacío, a una velocidad de 0,5 ml por minuto. Finalmente el extracto fue evaporado a sequedad en el rotavapor y suspendido en 4 ml de n-hexano, de los que se inyectaron 1 µl en el cromatógrafo.

Fortificación de la cera. Según MILANI (1995) y FERNANDEZ y COINEAU (2002), el LD₅₀ de fluvalinato para abeja adulta es de 20-200 ppm. Sin embargo, como se trabajó con larvas de abeja, se utilizaron concentraciones menores a 20 ppm.

(Continúa)

Continuación Anexo 11

Para lograr estas concentraciones se pesaron 600 g de cera para cada nivel de concentración. Se dispuso de 30,8 mg de Tau-fluvalinato, con lo que se realizaron las siguientes concentraciones; 8 ppm para la muestra A, 12 ppm para la muestra B y 18 ppm para la muestra C. Para obtener estos resultados se tomaron los siguientes volúmenes:

- 295 μ l de Tau-fluvalinato en 25 ml de n-hexano para fortificar la muestra A.
- 585 μ l de Tau-fluvalinato en 25 ml de n-hexano para fortificar la muestra B.
- 1170 μ l de Tau-fluvalinato en 25 ml de n-hexano para fortificar la muestra C.

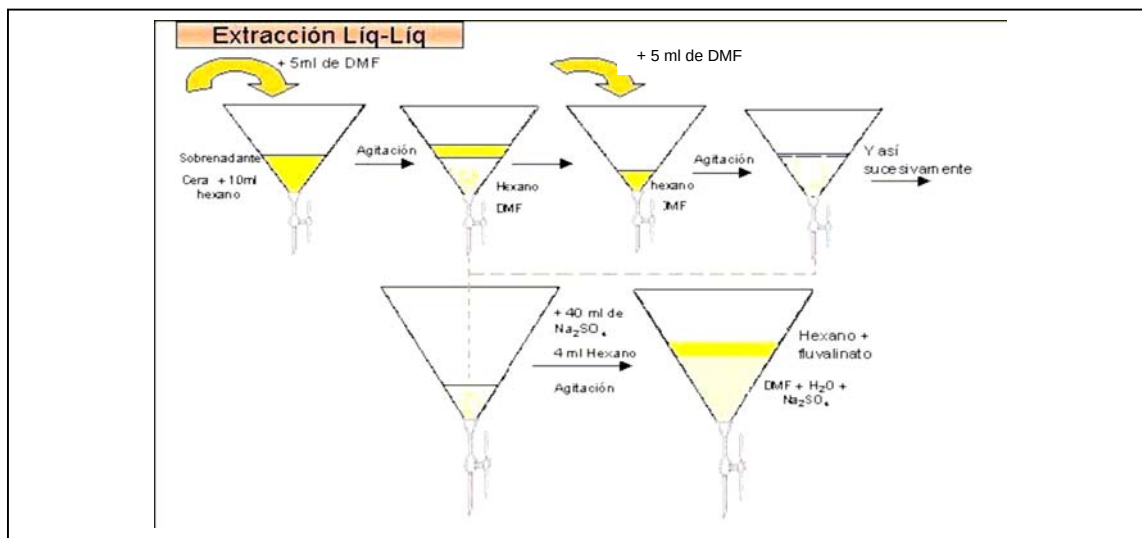
Las ceras se calentaron en recipientes metálicos a baño María a 65 °C, para mantenerla en estado líquido y facilitar la fortificación. Una vez que las ceras estuvieron en estado líquido se les inyectó a las mismas los volúmenes descritos anteriormente, sin dejar de revolver, para así homogenizar la mezcla y se dejaron enfriar. Luego se les realizó un segundo análisis de fluvalinato por cromatografía con el fin de verificar las concentraciones deseadas en las ceras.

Condiciones operacionales del cromatógrafo. El método diseñado en el cromatógrafo incorpora las siguientes condiciones de operación:

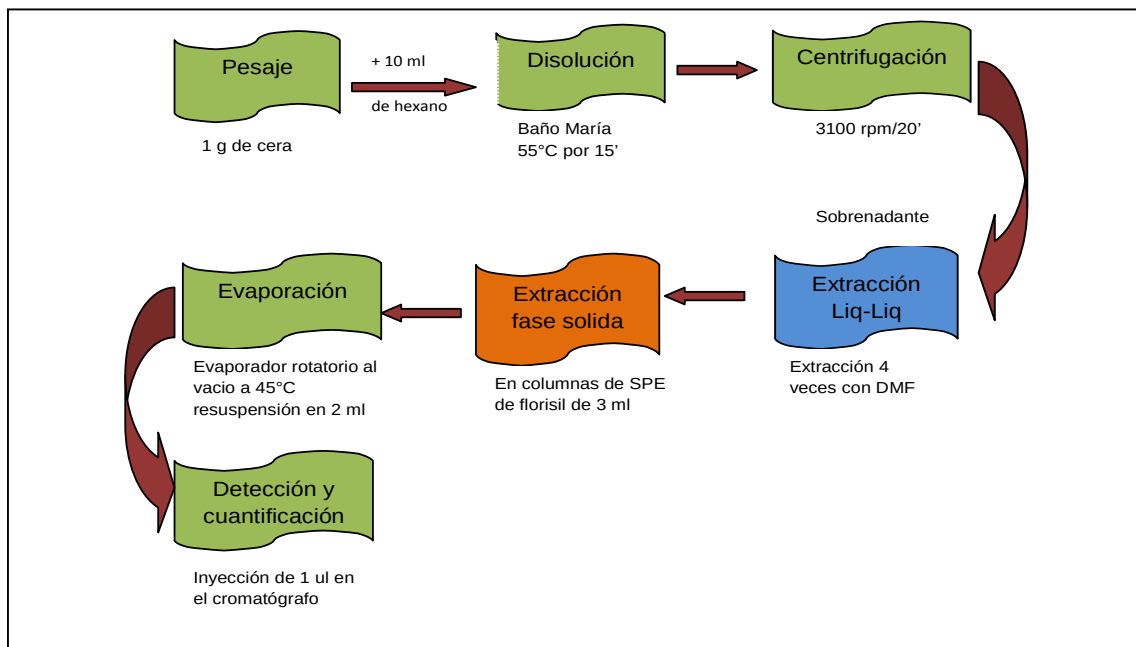
- Nitrógeno como gas de arrastre y make up (flujo impulsor).
- Flujo de gas de arrastre: 2,5 ml/min.
- Flujo de make up: 25 ml/min.
- Temperatura del detector: 300 °C.
- Temperatura inyector: 250 °C.

Expresión de resultados. El contenido de fluvalinato en las muestras de cera se expresó en mg/kg (ppm).

ANEXO 12 Extracción líquido – líquido de fluvalinato en cera en embudos de decantación.



ANEXO 13 Procedimiento analítico de extracción y purificación de fluvalinato en muestras de cera.



ANEXO 14 Temperaturas máximas y mínimas entre los días 4/01 y 1/02 de 2007.

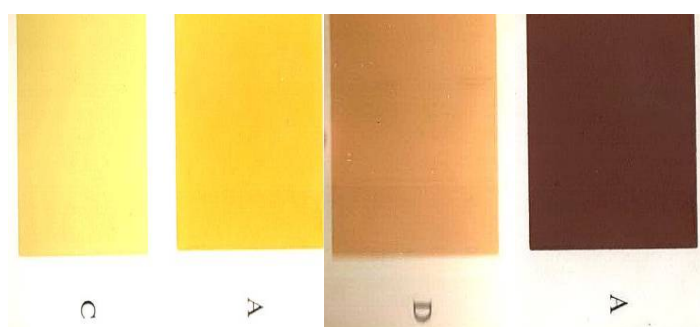
Día	Tº Máxima (°C)	Tº Mínima (°C)	Humedad R (%)
4	23.8	10.6	72
5	25.6	12.6	61
6	26.9	10.8	53
7	24.7	10.9	70
8	22.8	11.0	67
9	21.4	12.2	72
10	21.4	11.6	72
11	21.2	7.7	63
12	24.8	10.6	63
13	23.4	10.8	56
14	27.7	12.4	53
15	28	14.5	58
16	29.6	15.0	62
17	28.2	13.4	64
18	26	13.2	66
19	22.8	11.5	75
20	22.4	11.7	77
21	22.0	12.8	79
22	18.7	14.2	85
23	22	12.5	73
24	22.3	10.2	76
25	23.5	13.2	75
26	20.6	12.4	66
27	22.6	8.8	65
28	22.1	9.4	70
29	21.5	12.9	71
30	22.9	9.1	65
31	23.9	9.6	66
1	29.9	10.5	63

FUENTE: DR. ANTÓN HUBER. Estación Climatológica Isla Teja. Instituto de Geociencias, (UACH). Comunicación personal.

ANEXO 15 Temperatura de la cámara de cría durante el ensayo de campo (°C).

Colmena	Temperatura de la cámara de cría, ° C.		
	1° muestra	2° muestra	3° muestra
T 0 A	35	36	35
T 0 B	35	35	35
T 0 C	36	35	36
T 1 A	35	36	35
T 1 B	36	35	35
T 1 C	35	35	36
T 2 A	35	36	35
T 2 B	35	35	35
T 2 C	36	35	35
T 3 A	35	35	36
T 3 B	35	36	35
T 3 C	36	35	35
Promedio	35,3	35,3	35,25

ANEXO 16 Granos de café utilizados en la neutralización del aroma.

ANEXO 17 Cartilla de colores.

ANEXO 18 Peso de larvas (g), del presente ensayo de campo.

Ver documento impreso. Biblioteca Central, Universidad Austral de Chile.

ANEXO 19 Tamaño de larvas (mm), del presente ensayo de campo.

Ver documento impreso. Biblioteca Central, Universidad Austral de Chile.

ANEXO 20 Color de larvas del presente ensayo de campo.

Ver documento impreso. Biblioteca Central, Universidad Austral de Chile.

ANEXO 21 Aroma de larvas del presente ensayo de campo.

Ver documento impreso. Biblioteca Central, Universidad Austral de Chile.

ANEXO 22 Mortalidad de larvas, corregida con la fórmula de Schneider y Orelli.

Mortalidad del 1° estadio larval		
Tratamientos (ppm)	Mortalidad (%)	Mortalidad corregida (%)
0	5	0
0	0	0
0	5	0
8	15	10,5
8	5	5
8	5	0
12	10	5,26
12	10	10
12	10	5,26
18	10	5,26
18	15	15
18	15	10,5

Mortalidad del 3° estadio larval		
Tratamientos (ppm)	Mortalidad (%)	Mortalidad corregida (%)
0	5	0
0	10	0
0	10	0
8	15	10,5
8	10	0
8	20	11,11
12	30	26,3
12	25	16,6
12	30	22,2
18	10	5,26
18	20	11,11
18	20	11,11

(Continua)

Continuación Anexo 22

Mortalidad del 5° estadio larval		
Tratamientos (ppm)	Mortalidad (%)	Mortalidad corregida (%)
0	10	0
0	10	0
0	10	0
8	10	0
8	20	11,11
8	15	5,55
12	15	5,55
12	15	5,55
12	25	16,6
18	30	22,22
18	20	11,11
18	20	11,11

ANEXO 23 Estadística descriptiva para pesos de larvas de primer estadio.

T	N	Media	Desv. típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
0	140	0,003427	0,00119	0,000100	0,00322	0,00362	0,0014	0,0066
8	114	0,003346	0,00117	0,000110	0,00312	0,00356	0,0011	0,0058
12	104	0,003250	0,00113	0,000111	0,00302	0,00347	0,0012	0,0055
18	157	0,003090	0,00128	0,000102	0,00288	0,00329	0,0010	0,0061
Tota l	515	0,003271	0,00121	0,000053	0,00316	0,00337	0,0010	0,0066

T: tratamientos.

ANEXO 24 Prueba de homogeneidad de varianza para pesos de larvas de primer estadio.

Estadístico de Levene	gl1	Gl2	Sig.
1,314	3	511	0,269

ANEXO 25 Análisis de varianza para pesos de larvas de primer estadio.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,000	3	0,000	2,117	0,097
Intra-grupos	0,001	511	0,000		
Total	0,001	514			

ANEXO 26 Estadística descriptiva para tamaño de larvas de primer estadio.

T	N	Media	Desv. típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
0	140	1,9761	0,1141	0,0096	1,957	1,995	1,80	2,15
8	114	1,9377	0,1170	0,0109	1,916	1,959	1,80	2,10
12	104	1,9327	0,1092	0,0107	1,911	1,953	1,80	2,10
18	157	1,9185	0,1048	0,0083	1,901	1,935	1,80	2,10
Total	515	1,9413	0,1130	0,0049	1,931	1,951	1,80	2,15

T: tratamientos

ANEXO 27 Prueba de homogeneidad de varianza para tamaño de larvas de primer estadio.

Estadístico de Levene	gl1	Gl2	Sig.
1,246	3	511	0,292

ANEXO 28 Análisis de varianza para tamaño de larvas de primer estadio.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,260	3	0,087	7,030	0,000
Intra-grupos	6,305	511	0,012		
Total	6,566	514			

ANEXO 29 Test Tukey, para tamaño de larvas de primer estadio.

(I) Conc.	(J) Conc	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	8	0,03835(*)	0,01401	0,032	0,0022	0,0745
	12	0,04338(*)	0,01438	0,014	0,0063	0,0804
	18	0,05760(*)	0,01291	0,000	0,0243	0,0909
8	0	-0,03835(*)	0,01401	0,032	-0,0745	-0,0022
	12	0,00503	0,01506	0,987	-0,0338	0,0439
	18	0,01925	0,01367	0,495	-0,0160	0,0545
12	0	-0,04338(*)	0,01438	0,014	-0,0804	-0,0063
	8	-0,00503	0,01506	0,987	-0,0439	0,0338
	18	0,01422	0,01404	0,742	-0,0220	0,0504
18	0	-0,05760(*)	0,01291	0,000	-0,0909	-0,0243
	8	-0,01925	0,01367	0,495	-0,0545	0,0160
	12	-0,01422	0,01404	0,742	-0,0504	0,0220

* La diferencia entre las medias es significativa al 5%.

ANEXO 30 Prueba de homogeneidad de varianza para la mortalidad de larvas de primer estadio.

Estadístico de Levene	gl1	Gl2	Sig.
0,331	2	6	0,730

ANEXO 31 Análisis de varianza para mortalidad de larvas de primer estadio.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	40,438	2	20,219	1,031	0,412
Intra-grupos	117,680	6	19,613		
Total	158,119	8			

ANEXO 32 Estadística descriptiva para pesos de larvas de tercer estadio.

T	N	Media	Des. Típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
0	136	0,0503	0,0074	0,00063	0,0490	0,0515	0,0400	0,0600
8	123	0,0474	0,0079	0,00071	0,0460	0,0489	0,0300	0,0600
12	147	0,0455	0,0075	0,00062	0,0443	0,0468	0,0366	0,0607
18	133	0,0442	0,0070	0,00061	0,0430	0,0454	0,0350	0,0605
Total	539	0,0468	0,0078	0,00033	0,0462	0,0475	0,0300	0,0607

T: tratamientos

ANEXO 33 Prueba de homogeneidad de varianza para el peso de larvas de tercer estadio.

Estadístico de Levene	gl1	Gl2	Sig.
1,278	3	535	0,281

ANEXO 34 Análisis de varianza para el peso de larvas de tercer estadio.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,003	3	0,001	16,815	0,000
Intra-grupos	0,030	535	0,000		
Total	0,033	538			

ANEXO 35 Test Tukey para peso de larvas de tercer estadio.

(I) Conc	(J) Conc	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	8	0,00281(*)	0,000931	0,014	0,000411	0,005211
	12	0,00472(*)	0,000890	0,000	0,002433	0,007023
	18	0,00607(*)	0,000912	0,000	0,003723	0,008427
8	0	0,00281(*)	0,000931	0,014	-0,005211	-0,000411
	12	0,00191	0,000914	0,156	-0,000440	0,004274
	18	0,00326(*)	0,000936	0,003	0,000851	0,005677
12	0	0,00472(*)	0,000890	0,000	-0,007023	-0,002433
	8	-0,00191	0,000914	0,156	-0,004274	0,000440
	18	0,0013471	0,000895	0,436	-0,000961	0,003655
18	0	0,00607(*)	0,000912	0,000	-0,008427	-0,003723
	8	0,00326(*)	0,000936	0,003	-0,005677	-0,000851
	12	-0,00134	0,000895	0,436	-0,003655	0,000961

*La diferencia entre las medias es significativa al 5%.

ANEXO 36 Estadística descriptiva para tamaños de larvas de tercer estadio.

T	N	Media	Desv. Típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
0	136	6,097	0,15248	0,01308	6,0712	6,1229	5,90	6,30
8	127	5,948	0,16323	0,01448	5,9202	5,9775	5,80	6,20
12	147	5,915	0,11085	0,00914	5,8976	5,9337	5,80	6,10
18	133	5,894	0,12954	0,01123	5,8718	5,9162	5,70	6,10
Total	539	5,963	0,16036	0,00688	5,9500	5,9771	5,70	6,30

T: tratamientos.

ANEXO 37 Prueba de homogeneidad de varianza para el tamaño de larvas de tercer estadio.

Estadístico de Levene	gl1	Gl2	Sig.
19,305	3	539	0,000

ANEXO 38 Análisis de varianza para el tamaño de larvas de tercer estadio.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,433	3	1,144	58,707	0,000
Intra-grupos	10,505	539	0,019		
Total	13,938	542			

ANEXO 39 Test Dunnett`C para el tamaño de larvas de tercer estadio.

(I) CONC	(J) CONC	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
0	8	0,14824(*)	0,01951	0,0975	0,1990
	12	0,18141(*)	0,01595	0,1399	0,2229
	18	0,20307(*)	0,01724	0,1582	0,2479
8	0	-0,14824(*)	0,01951	-0,1990	-0,0975
	12	0,03317	0,01713	-0,0114	0,0777
	18	0,05483(*)	0,01833	0,0071	0,1025
12	0	-0,18141(*)	0,01595	-0,2229	-0,1399
	8	-0,03317	0,01713	-0,0777	0,0114
	18	0,02166	0,01448	-0,0160	0,0593
18	0	-0,20307(*)	0,01724	-0,2479	-0,1582
	8	-0,05483(*)	0,01833	-0,1025	-0,0071
	12	-0,02166	0,01448	-0,0593	0,0160

* La diferencia entre las medias es significativa al 5%.

ANEXO 40 Prueba de homogeneidad de varianza para la mortalidad de larvas de tercer estadio.

Estadístico de Levene	gl1	Gl2	Sig.
4,112	2	6	0,075

ANEXO 41 Análisis de varianza para mortalidad de larvas de tercer estadio.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	21,680	2	10,840	0,108	0,899
Intra-grupos	602,59	6	100,432		
Total	624,275	8			

ANEXO 42 Estadística descriptiva para pesos de larvas de quinto estadio.

T	N	Media	Desv. típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
0	173	0,13211	0,02029	0,00154	0,1290	0,1351	0,0901	0,1694
8	175	0,12557	0,02228	0,00168	0,1222	0,1288	0,0817	0,1674
12	161	0,11927	0,02104	0,00165	0,1159	0,1225	0,0840	0,1667
18	187	0,10850	0,02287	0,00167	0,1052	0,1118	0,0700	0,1590
Total	696	0,12115	0,02338	0,00088	0,1194	0,1228	0,0700	0,1694

T: tratamientos.

ANEXO 43 Prueba de homogeneidad de varianza para el peso de larvas de quinto estadio.

Estadístico de Levene	gl1	Gl2	Sig.
1,660	3	692	0,174

ANEXO 44 Análisis de varianza para pesos de larvas de quinto estadio.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,055	3	0,018	38,744	0,000
Intra-grupos	0,326	692	0,000		
Total	0,380	695			

ANEXO 45 Test Tukey para peso de larvas de quinto estadio.

(I) CONC	(J) CONC	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	8	0,006540(*)	0,002325	0,026	0,000552	0,01252
	12	0,012837(*)	0,002375	0,000	0,006721	0,01895
	18	0,023606(*)	0,002287	0,000	0,017715	0,02949
8	0	0,006540(*)	0,002323	0,026	-0,012528	-0,00055
	12	0,006297(*)	0,002368	0,040	0,000198	0,01239
	18	0,017066(*)	0,002281	0,000	0,011192	0,02294
12	0	0,012837(*)	0,002375	0,000	-0,018954	-0,00672
	8	0,006295(*)	0,002368	0,040	-0,012397	-0,00019
	18	0,010769(*)	0,002331	0,000	0,004764	0,01677
18	0	0,023606(*)	0,002287	0,000	-0,029499	-0,01771
	8	0,017066(*)	0,002281	0,000	-0,022941	-0,01119
	12	0,010769(*)	0,002331	0,000	-0,016774	-0,00476

(*) La diferencia entre las medias es significativa al 5%.

ANEXO 46 Estadística descriptiva para tamaño de larvas de quinto estadio.

T	N	Media	Desv. Típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
0	173	10,32	1,0247	0,0779	10,167	10,474	9,00	12,00
8	175	9,759	0,8885	0,0671	9,626	9,892	8,50	11,50
12	161	9,508	0,7225	0,0569	9,396	9,621	8,50	11,00
18	187	9,063	0,7899	0,0577	8,949	9,177	8,00	11,00
Total	696	9,654	0,9781	0,0370	9,581	9,726	8,00	12,00

T: tratamientos

ANEXO 47 Prueba de homogeneidad de varianza para el tamaño de larvas de quinto estadio.

Estadístico de Levene	gl1	Gl2	Sig.
23,247	3	692	0,000

ANEXO 48 Análisis de varianza para el tamaño de larvas de quinto estadio.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	147,441	3	49,147	65,711	0,000
Intra-grupos	517,568	692	0,748		
Total	665,009	695			

ANEXO 49 Test Dunnett`C para el tamaño de larvas de quinto estadio.

(I) CONC	(J) CONC	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
0	8	0,56138(*)	0,10287	0,2945	0,8282
	12	0,81211(*)	0,09650	0,5617	1,0625
	18	1,25717(*)	0,09699	1,0056	1,5087
8	0	-0,56138(*)	0,10287	-0,8282	-0,2945
	12	0,25073(*)	0,08806	0,0222	0,4792
	18	0,69579(*)	0,08859	0,4660	0,9255
12	0	-0,81211(*)	0,09650	-1,0625	-0,5617
	8	-0,25073(*)	0,08806	-0,4792	-0,0222
	18	0,44506(*)	0,08111	0,2346	0,6555
18	0	-1,25717(*)	0,09699	-1,5087	-1,0056
	8	-0,69579(*)	0,08859	-0,9255	-0,4660
	12	-0,44506(*)	0,08111	-0,6555	-0,2346

La diferencia entre las medias es significativa al 5%.

ANEXO 50 Prueba de homogeneidad de varianza para la mortalidad de larvas de quinto estadio.

Estadístico de Levene	gl1	Gl2	Sig.
0,331	2	6	0,530

ANEXO 51 Análisis de varianza para mortalidad de larvas de quinto estadio.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	71,722	2	35,861	2,487	0,163
Intra-grupos	86,500	6	14,417		
Total	158,222	8			

ANEXO 52 Prueba de muestras relacionadas (t-student), para el tratamiento 8 ppm.

Diferencias relacionadas								
	Error de							
	Media	Desv. típ.	la media	95% de confianza		t	gl	Sig.
				Inferior	Sup.			
Conc Ini 8	7,731	0,105	0,04294	7,6212	7,8420	180	5	0,00
Conc Fin 8								

ANEXO 53 Prueba de muestras relacionadas (t-student), para el tratamiento 12 ppm.

Diferencias relacionadas								
	Error de							
	Media	Desv. típ.	la media	95% de confianza		t	gl	Sig.
				Inferior	Sup.			
Conc Ini 12	11,8	0,116	0,04767	11,6891	11,9342	247	5	0,00
Conc Fin 12								

ANEXO 54 Prueba de muestras relacionadas (t-student), para el tratamiento 18 ppm.

Diferencias relacionadas								
Error de								
Desv. la								
Media	típ.	media	95% de confianza		t	gl	Sig.	
			Inferior	Sup.				
Conc Ini 18								
Conc Fin 18	17,6	0,261	0,1066	17,3631	71,9113	165	5	0,00

ANEXO 55 Cálculo de la dilución de fluvalinato en la cera.

Una lámina de cera estampada pesa 77 g, sus medidas son 19 cm x 39 cm. En el ensayo se ocupó un trozo de panal de 14 cm x 4 cm, con un peso de 5,8 g, según RIVERA (2006) la cera estampada al ser estirada aumenta tres veces su peso por lo que el trozo de 14 cm x 4 cm estirado pesa 17,4 g, por lo tanto, la concentración de fluvalinato en la cera después de ser estirada, según el tratamiento, es de:

Tratamiento 8 ppm:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$5,8 \text{ g} \times 8 \text{ ppm} = 17,4 \text{ g} \times X \text{ ppm}$$

$$X = 2,6 \text{ ppm}$$

Tratamiento 12 ppm:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$5,8 \text{ g} \times 12 \text{ ppm} = 17,4 \text{ g} \times X \text{ ppm}$$

$$X = 4 \text{ ppm}$$

Tratamiento 18 ppm:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$5,8 \text{ g} \times 18 \text{ ppm} = 17,4 \text{ g} \times X \text{ ppm}$$

$$X = 6 \text{ ppm}$$