

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 860**

51 Int. Cl.:

A01K 51/00 (2006.01)

A01N 25/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C12C 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2007 PCT/US2007/008082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2007 WO07120461**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2007 E 07754584 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2001285**

54 Título: **Composiciones y métodos para combatir un ácaro parásito de las abejas melíferas**

30 Prioridad:

31.03.2006 US 396360

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2017

73 Titular/es:

**JOHN I. HAAS, INC. (100.0%)
5185 MacArthur Blvd NW, Suite 300
Washington, DC 20016-3341, US**

72 Inventor/es:

PROBASCO, GENE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 599 860 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para combatir un ácaro parásito de las abejas melíferas

5 **Antecedentes de la invención**

Las abejas melíferas, *Apis mellifera*, son necesarias para la polinización efectiva de los cultivos y, por tanto, son fundamentales para la agricultura mundial. Las abejas melíferas producen asimismo productos de importancia económica, incluyendo miel y cera de abejas. Las abejas melíferas son susceptibles a una serie de parásitos y patógenos, incluyendo el ácaro ectoparásito, *Varroa destructor*. Los ácaros *Varroa* parasitan abejas en estadio pupal y adulto y se reproducen en las celdillas de cría para estadio pupal. Los ácaros utilizan la boca para perforar el exoesqueleto y chupar la hemolinfa de la abeja. Estas heridas en el exoesqueleto albergan infecciones bacterianas, tales como *Melissococcus pluton*, que causan loque europea. Además, con respecto a sus efectos parásitos, se sospecha que los ácaros *Varroa* actúan como vectores para una serie de patógenos de las abejas melíferas, incluyendo virus de las alas deformadas (VAD), virus de la abeja de Cachemira (VAC), virus de la parálisis aguda de las abejas (VPAA) y virus de la celda negra de la reina (VCNR), y pueden debilitar el sistema inmunitario de sus huéspedes, dejándolos vulnerables a las infecciones. Si no se tratan las infestaciones por *Varroa*, esto puede tener generalmente como resultado la mortalidad en la colonia. El mantenimiento de un suministro de colonias de abejas melíferas fuertes disponibles para la polinización es esencial para la producción sostenida de cultivos agrícolas por valor de más de 14 mil millones de dólares en la agricultura de Estados Unidos. Durante el invierno de 2004-2005, se estimó que el 40 % de las colonias de abejas melíferas de los Estados Unidos se debilitó o se colapsó debido a la infestación por *Varroa*. Los métodos actuales de tratamiento contra infestaciones por *Varroa* están demostrando ser ineficaces conforme los ácaros desarrollan resistencia a los acaricidas existentes. Además, el uso de tales acaricidas puede filtrar productos químicos perjudiciales en la miel destinada al consumo humano. Se requieren urgentemente nuevas composiciones y métodos para tratar o prevenir infestaciones por ácaros *Varroa*. De manera deseable, tales composiciones incluirán solo ingredientes naturales que no supongan riesgo alguno para la salud humana.

El documento US 2002/0051804 describe pesticidas orgánicos realizados a partir de componentes de extracto de lúpulo preparando emulsiones acuosas estables de ácidos de lúpulo y otros componentes de extracto de lúpulo.

Sumario de la invención

Como se describe a continuación, la presente invención presenta métodos y composiciones para combatir un ácaro parásito de la abeja melífera o para tratar o prevenir una infestación por un ácaro parásito en una colmena de abejas melíferas según se divulga en las reivindicaciones 1 a 14.

En general, la invención proporciona un método para combatir un ácaro parásito de la abeja melífera (por ejemplo, ácaro *Varroa*, ácaro traqueal). El método implica poner en contacto el ácaro parásito con una cantidad eficaz de una composición que comprende un derivado de lúpulo (por ejemplo, ácido alfa, ácido beta, o combinación de los mismos), para combatir de este modo un ácaro parásito de la abeja melífera. En una realización, la puesta en contacto del ácaro se produce cuando el ácaro está en contacto con una abeja melífera (por ejemplo, huevo, larva o pupa de abeja melífera).

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una infestación por un ácaro parásito de una colmena de abejas melíferas. El método implica la puesta en contacto de la colmena con una cantidad eficaz de una composición que comprende un derivado de lúpulo, para tratar o prevenir de este modo una infestación por un ácaro parásito en una colmena de abejas melíferas.

En otro aspecto, el método del presente documento incluye además aquellos en los que se identifica la colmena o el ácaro conforma la necesidad de los protocolos de tratamiento o prevención definidos en el presente documento.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición para tratar o prevenir una infestación por ácaros, la composición comprende una cantidad eficaz de un derivado de lúpulo en una forma adecuada para la administración a un ácaro. Las formas adecuadas incluyen, por ejemplo, uno cualquiera o más de un líquido, un polvo, un aceite, una emulsión, una pasta, una cápsula, un vapor, o cualquier otra forma capaz de administrar un derivado de lúpulo a un ácaro *Varroa* en contacto con una abeja melífera o una colmena de abejas melíferas. Si se desea, la composición comprende además un transportador.

En otro aspecto, la invención presenta una composición para tratar o prevenir una infestación por ácaros, la composición comprende una cantidad eficaz de un derivado de lúpulo en una forma adecuada para la administración a un ácaro. En una realización, el derivado de lúpulo es un ácido alfa, un ácido beta, o una combinación de un ácido alfa y un ácido beta. En otra realización, el derivado de lúpulo es una sal de metal alcalino o sal de metal alcalinotérreo del ácido de lúpulo. En otras realizaciones, la composición comprende al menos 2,5 %, 5 %, 7,5 %, 15 % de ácidos alfa, ácidos beta, o una combinación de ácidos alfa y beta. En otra realización, la forma se selecciona entre el grupo que consiste en un líquido, un polvo, un aceite, una emulsión, una cápsula, y un vapor. En

- otra realización, la composición comprende además un transportador (por ejemplo, uno cualquiera o más de maltodextrina, dextrina cíclica altamente ramificada, almidón de maíz, sólidos de jarabe de maíz, glucosa, ciclodextrina, goma arábica, calagina, inulina, colofonia, aceite de soja parcialmente hidrogenado, celulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, e hipomelosa). En otras realizaciones, la composición es un polvo que posee partículas de un tamaño seleccionado entre el grupo que consiste en 1 μm , 5 μm , 10 μm , 25 μm , 50 μm , 75 μm , 100 μm , 150 μm , 200 μm , 500 μm , 1 mm, 2 mm, o 5 mm, tal como un polvo preparado por secado por pulverización.
- En otra realización, la invención proporciona una composición acaricida que comprende una cantidad eficaz de una sal de metal alcalino del ácido de lúpulo o una sal de metal alcalinotérreo del ácido de lúpulo y un transportador en una forma adecuada para la administración a un ácaro. En una realización, la sal de metal alcalino del ácido de lúpulo es una sal de sodio, potasio o litio. En otra realización, la sal de metal alcalinotérreo del ácido de lúpulo es calcio o magnesio. En otra realización, el transportador se selecciona entre el grupo que consiste en maltodextrina, dextrina cíclica altamente ramificada, almidón de maíz, sólidos de jarabe de maíz, glucosa, ciclodextrina, goma arábica, calagina, inulina, colofonia, aceite de soja parcialmente hidrogenado, celulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, e hipomelosa. En otras realizaciones, la composición se seca por pulverización formando partículas de un tamaño seleccionado entre el grupo que consiste en 1 μm , 5 μm , 10 μm , 25 μm , 50 μm , 75 μm , 100 μm , 150 μm , 200 μm , 500 μm , 1 mm, 2 mm, y 5 mm de tamaño. En otras realizaciones, la relación ácido de lúpulo a transportador se selecciona entre el grupo que consiste en 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, y 1:100. En otras realizaciones, el ácido de lúpulo mantiene una actividad acaricida durante aproximadamente al menos seis meses, nueve meses, doce meses, dieciocho meses, veinticuatro meses, o treinta y seis meses. En otras realizaciones, el ácido de lúpulo mantiene una estabilidad durante aproximadamente al menos seis meses, nueve meses, doce meses, dieciocho meses, veinticuatro meses, o treinta y seis meses.
- En otro aspecto, la invención proporciona una composición de liberación controlada para tratar o prevenir una infestación por un ácaro parásito, la composición comprende una cantidad eficaz de un derivado de lúpulo en una forma adecuada para administrarse a un ácaro parásito de las abejas melíferas.
- En otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo de administración acaricida, comprendiendo el dispositivo una composición de cualquier aspecto previo. En una realización, el dispositivo se selecciona entre el grupo que consiste en una tira, (por ejemplo, membranas, tira de papel, de plástico, o polimérica), una tira de liberación controlada, un comprimido, un depósito, un disco polimérico, un dispositivo de evaporación, una fibra, un tubo, un bloque polimérico, un membrana, un gránulo, una bandeja, y un microcapilar. Si se desea, cualquiera de estos dispositivos puede formularse en forma biodegradable.
- En otro aspecto, la invención proporciona una colmena que comprende una composición de cualquier aspecto previo.
- En otro aspecto, la invención proporciona un producto de abejas melíferas producido en una colmena de cualquier aspecto previo. Los productos de abejas melíferas incluyen, entre otros, miel, panal de miel y cera de abejas.
- En otro aspecto, la invención proporciona un kit para el tratamiento o prevención de una infestación por un ácaro parásito, comprendiendo el kit una cantidad eficaz de un derivado de lúpulo en una forma adecuada para la administración a un sitio de infestación (por ejemplo, una colmena de abejas o una abeja). En una realización, el kit presenta instrucciones de uso en un método de la invención.
- En otro aspecto, la invención proporciona un método de identificación de un derivado de lúpulo que afecta a una función biológica de un ácaro parásito de la abeja melífera. El método implica el contacto del ácaro parásito con una composición de ensayo que comprende un derivado de lúpulo; y el ensayo de una función biológica del ácaro parásito. En una realización, la composición de ensayo altera una función biológica del ácaro parásito (por ejemplo, mata o incapacita al ácaro parásito o reduce la reproducción del ácaro parásito). En otra realización, el método incluye además las etapas de la puesta en contacto de una abeja melífera con la composición de ensayo; y el ensayo de una función biológica de la abeja melífera. En otra realización, el método identifica un compuesto de ensayo que afecta o no afecta a una función biológica de la abeja melífera. En otra realización, el método identifica un compuesto de ensayo que mata una abeja melífera.
- En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método de identificación de un derivado de lúpulo que no afecta a una función biológica de una abeja melífera. El método implica el contacto de la abeja melífera con una composición de ensayo que comprende un derivado de lúpulo; y el ensayo de una función biológica de la abeja melífera. En una realización, el método identifica un compuesto de ensayo que afecta o no afecta a una función biológica de la abeja melífera. En otra realización, el compuesto de ensayo mata una abeja melífera.
- En diversas realizaciones de cualquier aspecto previo, un derivado de lúpulo es un ácido alfa o un ácido beta. En otras realizaciones de un aspecto previo, una composición de la invención contiene un ácido alfa, un ácido beta, o una combinación de los mismos, en el que la cantidad de ácido alfa o beta en la composición oscila entre el 1 % y el 100 %, en el que el límite inferior del intervalo es cualquier número entero entre 1 y 99 % y el límite superior del

- intervalo es cualquier número entero entre 2 % y 100 %. Las cantidades a modo de ejemplo de un alfa, un beta, o una combinación de los mismos incluyen al menos 1 %, 2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 25 %, 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 85 %, 90 % o 95 % en una composición. En una realización particular, la composición comprende al menos 1 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 5 %, o 10 % de ácido beta y al menos 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 6 %, 7,5 %, 8 %, 9 %, 10 %, 12 %, o 15 % de ácidos alfa. En una realización de cualquiera de los aspectos previos, el contacto afecta a una función biológica de un ácaro. Funciones biológicas a modo de ejemplo incluyen uno cualquiera o más elementos de respiración, actividad neural, locomoción, reproducción, o cualquier otra actividad fisiológica requerida para la supervivencia del ácaro. En una realización, la puesta en contacto mata los ácaros.
- 10 En otras realizaciones de cualquier aspecto previo, la sal de metal alcalino del ácido de lúpulo es una sal de sodio, potasio, o litio. En otras realizaciones de cualquier aspecto previo, la sal de metal alcalinotérreo del ácido de lúpulo es calcio o magnesio. En otras realizaciones de cualquier aspecto previo, el transportador se selecciona entre el grupo que consiste en maltodextrina, dextrina cíclica altamente ramificada, almidón de maíz, sólidos de jarabe de maíz, glucosa, ciclodextrina, goma arábica, calagina, inulina, colofonia, aceite de soja parcialmente hidrogenado,
- 15 celulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, e hipomelosa. En otras realizaciones de cualquier aspecto previo, la composición se seca por pulverización formando partículas de un tamaño seleccionado entre el grupo que consiste en 1 µm, 5 µm, 10 µm, 25 µm, 50 µm, 75 µm, 100 µm, 150 µm, 200 µm, 500 µm, 1 mm, 2 mm, y 5 mm de tamaño. En otras realizaciones, la relación ácido de lúpulo a transportador se selecciona entre el grupo que consiste en 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, y 1:100. En otras realizaciones, el ácido de lúpulo mantiene una
- 20 actividad acaricida durante aproximadamente al menos seis meses, nueve meses, doce meses, dieciocho meses, veinticuatro meses, o treinta y seis meses. En otras realizaciones, el ácido de lúpulo mantiene una estabilidad durante aproximadamente al menos seis meses, nueve meses, doce meses, dieciocho meses, veinticuatro meses, o treinta y seis meses.
- 25 En otras realizaciones, la composición de la invención es una composición de liberación controlada, en la que el derivado de lúpulo se libera en el transcurso de al menos una semana a 12 meses. Por ejemplo, el derivado de lúpulo se libera durante al menos 5, 10, 14, 28, 36, 41, o 48 días; o se libera en el transcurso de 1, 2, 4, 6, 8, 10 o 12 semanas, o incluso durante hasta 5, 6, 9, o 12 meses.
- 30 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, y de las reivindicaciones.
- Definiciones**
- 35 Por "acárido" se entiende un arácnido del orden Acarina, que incluye ácaros y garrapatas.
- Por "ácido alfa" se entiende un ácido orgánico obtenido a partir de una planta de lúpulo (*Humulus lupulus*) que posee homología estructural en cuanto a una humulona, adhumulona, cohumulona, o un análogo o derivado de las mismas. La humulona, adhumulona, y cohumulona son los tres análogos de ácidos alfa más abundantes. Otros
- 40 derivados a modo de ejemplo de un ácido alfa incluyen, entre otros, ácidos iso-alfa, ácidos rho-iso-alfa, ácidos tetrahidro-iso-alfa y ácidos hexahidro-iso-alfa.
- Por "ácido beta" se entiende un ácido orgánico obtenido a partir de una planta de lúpulo (*Humulus lupulus*) que posee homología estructural en cuanto a una lupulona, adlupulona, colupulona o un análogo o derivado de las
- 45 mismas. La lupulona, adlupulona, y colupulona son los tres análogos de ácido beta más abundantes. Otros derivados a modo de ejemplo de un ácido beta incluyen, entre otros, huluponas, ácidos hexahidro-beta y hexahidro huluponas.
- Por "función biológica" se entiende cualquier actividad fisiológica o conductual de un organismo. Las funciones biológicas a modo de ejemplo incluyen reproducción, respiración, actividad neural, locomoción. La producción de miel es una función biológica específica a una abeja melífera.
- 50 En esta divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene", "que posee" y similares, pueden tener el significado atribuido a los mismos en la legislación en materia de patentes de Estados Unidos y pueden significar "incluye", "que incluye", y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente en", tienen asimismo el significado atribuido en la legislación en materia de patentes de Estados Unidos y el término es abierto, permitiendo la presencia de más de lo que se enumera siempre que las características básicas o novedosas de lo que se enumera no cambien debido a la presencia de más de lo que se enumera, aunque excluye realizaciones de la técnica anterior.
- 60 Por "ponerse en contacto" se entiende tocar, asociar con, o que posee proximidad a una composición. Por ejemplo, un derivado de lúpulo puede ponerse en contacto con una colmena, ya sea en el interior o en el exterior de la estructura de la colmena.
- 65 Por "liberación controlada" se entiende liberada en el transcurso de horas, días, semanas o meses.

Por "combatir un ácaro parásito" se entiende inhibir la supervivencia de un ácaro o reducir, ralentizar, o estabilizar el crecimiento de una población de ácaros.

5 Por "panal" se entiende secciones de celdillas para la cera hexagonales de abejas que se utilizan para criar ("incubar") la progenie de la abeja melífera y almacenar la miel y el polen.

Por "cantidad eficaz de un acaricida" se entiende una cantidad eficaz que afecta a una función biológica de un ácaro.

10 Por "colmena" se entiende una estructura que contiene una colonia de abejas. Un cajón melario moderno incluye generalmente un soporte inferior, una cubierta, y uno o más cajones, apilados unos encima de otros. En el interior, cada cajón contiene una serie de cuadros móviles de panal o base mantenidos en posición vertical para separar las abejas.

15 Por "abeja melífera" se entiende un insecto himenóptero del género *Apis*. El término "abeja melífera" no se limita a la forma adulta del insecto, sino que abarca todos los estadios de desarrollo de las abejas melíferas, incluyendo, entre otros huevo, larva, y pupa. Especies de abejas melíferas a modo de ejemplo incluyen *Apis mellifera* y *Apis cerana*.

20 Por "colonia de abejas melíferas" se entiende una comunidad de abejas. Las colonias de abejas melíferas pueden desarrollarse en la naturaleza o pueden mantenerse por los apicultores.

Por "ácaro parásito de la abeja melífera" se entiende cualquier ácaro que parasita una abeja melífera o infesta una colmena de abejas melíferas. Ácaros parásitos de la abeja melífera a modo de ejemplo incluyen los ácaros *Varroa* y

25 Por "derivado de lúpulo" se entiende cualquier molécula que se produce de forma natural en el lúpulo (*Humulus lupulus*) y derivados químicos del mismo. Derivados de lúpulo (por ejemplo, ácidos alfa, ácidos beta) pueden purificarse a partir del lúpulo o pueden sintetizarse químicamente.

Por "infestación" se entiende la colonización de un sitio o el parasitismo de un organismo por una plaga.

30 Por "acaricida" se entiende un agente que inhibe una función biológica de un ácaro.

Por "actividad acaricida" se entiende cualquier actividad que inhibe el crecimiento, reproducción o supervivencia de un ácaro u otros acáridos.

35 Por "prevenir una infestación por un ácaro" se entiende reducir el éxito de una infestación por un ácaro que se establecerá en una colonia *Apis*.

40 Por "tratar una infestación por un ácaro" se entiende reducir, estabilizar o ralentizar el crecimiento de una población de ácaros en una colonia *Apis*.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 es un gráfico que muestra la mortalidad del ácaro *Varroa* y de las abejas melíferas a las cuatro horas y a las veintidós horas, respectivamente, en respuesta a la exposición del producto de lúpulo en las concentraciones indicadas.

50 La Figura 2 es un gráfico que muestra la mortalidad del ácaro *Varroa* y de las abejas melíferas a las cuatro horas y a las veinticuatro horas, respectivamente, en respuesta a la exposición del producto de lúpulo en las concentraciones indicadas.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la mortalidad del ácaro *Varroa* y de las abejas melíferas a la hora y a las veinticuatro horas, respectivamente, en respuesta a la exposición del producto de lúpulo en las concentraciones indicadas.

55 La Figura 4 es un gráfico que muestra la mortalidad del ácaro *Varroa* a las cinco horas y la mortalidad de las abejas melíferas a las veinticuatro horas en respuesta a la exposición del producto de lúpulo en las concentraciones indicadas. MgBeta indica sales de magnesio de ácidos beta. ARIA indica ácidos rho-iso-alfa.

60 La Figura 5 es un gráfico que muestra la mortalidad del ácaro *Varroa* y de las abejas melíferas a las veinticuatro horas en respuesta a la exposición del producto de lúpulo en las concentraciones indicadas.

Descripción detallada de la invención

65 La presente invención se dirige a métodos y composiciones para combatir ácaros y otras especies relacionadas de la familia *Varroidae*. La invención se basa, en parte, en el descubrimiento en que los componentes de origen natural de lúpulo son útiles para la prevención o el tratamiento de una infestación por un ácaro *Varroa*.

Apis

Las abejas melíferas son insectos que pasan por cuatro estadios en su desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. Las abejas adultas pertenecen a una de estas tres castas: reina, obrera, o zángano. La abeja reina es la única hembra en la colonia capaz de reproducirse y es responsable de toda la producción de huevos. Las obreras son hembras no reproductoras que recolectan la miel y cuidan o "crian" la progenie de la reina. Los zánganos son abejas macho que se aparean con la reina. El ciclo de vida, desde el huevo a abeja adulta, es de veintiún días para las obreras y veinticuatro días para los zánganos. La abeja reina pone cada huevo en una única celdilla del panal. El huevo eclosiona en general al cuarto día, dando una larva que continúa su desarrollo en la celdilla. En el noveno día, la celdilla en la que se está desarrollando la larva es cerrada con un opérculo de cera y la larva experimenta una metamorfosis que da lugar a la pupa. En el día veintiuno, emerge una nueva obrera adulta.

Acáridos

Los acáridos son pequeños arácnidos parásitos que actúan como parásitos en diversas plantas y animales, incluyendo abejas melíferas. Los ácaros parásitos que se alimentan de las abejas melíferas incluyen los ácaros *Varroa* (por ejemplo, *Varroa destructor*, *Varroa jacobsoni*) y ácaros traqueales (por ejemplo, *Acarapis woodi*). Los ácaros traqueales son ácaros microscópicos que habitan en los tubos respiratorios de las abejas. Los ácaros *Varroa* son ectoparásitos que chupan la hemolinfa de la abeja, e infestan las colonias salvajes y domésticas de abejas melíferas. La reproducción del ácaro *Varroa* comienza cuando el ácaro hembra adulto penetra en una celdilla de cría poco antes de que se opercule. La cría de zánganos, que se produce en las celdillas más grandes que la cría de obreras, es objeto preferentemente de la infestación por ácaros. El ácaro hembra chupa la hemolinfa de las larvas antes de depositar sus huevos. Los huevos de la *Varroa* se encierran en la celdilla sellada, y los ácaros en proceso de desarrollo chupan la pupa de abeja. El primer huevo puesto por la hembra de la *Varroa* se desarrolla dando un macho. Los huevos posteriores se desarrollan dando hembras que se aparean con su hermano. Los ácaros hembra apareados con su madre se liberan de la celdilla operculada cuando emerge la abeja. Los ácaros hembra se adhieren normalmente a las abejas adultas entre los segmentos abdominales o entre las regiones corporales, en las que chupan la hemolinfa de las abejas. Las abejas adultas sirven como huéspedes intermedios y como medio de transporte a nuevos sitios de infestación.

De manera deseable, los acaricidas utilizados en el control de acáridos deben abordar las siguientes cuatro necesidades: i) han de afectar a una función fisiológica requerida para la supervivencia de un ácaro; ii) no han de causar mortalidad alguna en las abejas adultas; iii) no han de tener efectos adversos en apicultores o en la miel destinada al consumo humano; y iv) han de ser capaces de administrarse en la colmena.

Control de ácaros

Los productos utilizados para combatir la infestación por un ácaro parásito de la abeja melífera reducen, estabilizan o ralentizan el crecimiento de una población de ácaros en una colmena o inhiben el crecimiento, supervivencia, reproducción u otra función biológica de un ácaro parásito de la abeja melífera. Preferentemente, el acaricida mata el ácaro. Los métodos para medir la infestación por ácaros parásitos son conocidos en la materia. Un número de parámetros puede ser indicativo del nivel de infestación presente en una colonia de abejas: el número de ácaros presentes en una muestra de abejas de una colmena infestada puede ser utilizado como una medida del nivel de infestación presente en la colmena; las abejas criadas en una colmena con una infestación activa son en promedio más pequeñas que las abejas criadas en una colmena sin infestación; por consiguiente, el tamaño o peso de la abeja puede utilizarse como otra medida de infestación; la cantidad de miel producida en una colmena infectada puede ser menor que la producida en una colmena sana; en consecuencia, la producción de miel podría servir como otra medida del nivel de infestación; y, finalmente, las infestaciones graves originan la pérdida completa de colonias. En consecuencia, la pérdida de las colonias puede ser una medida del nivel de infestación presente en la colmena. En una realización, un acaricida de la invención reduce el nivel de infestación de una colmena en al menos 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o incluso 100 %. En otra realización, un acaricida de la invención induce al menos 50 %, 60 %, o 70 % de letalidad en los ácaros. Preferentemente, el acaricida induce 75 %, 80 %, 90 %, o incluso 95 % o 100 % de letalidad en los ácaros. Se utilizan métodos de cribado para identificar las concentraciones de los derivados de lúpulo que serán letales en un ácaro (por ejemplo, inducir al menos 70 % de letalidad en los ácaros), minimizando al mismo tiempo los efectos letales en las abejas adultas.

Alternativamente, un acaricida de la invención inhibe la reproducción del ácaro. Preferentemente, el acaricida reduce la reproducción de ácaros en al menos 25 %, 50 %, 75 % o 100 %. En otro enfoque, el acaricida afecta a una función biológica requerida para la locomoción del acárido; dicho tratamiento permite que el ácaro sea atrapado, ahogado, aislado o de otra forma eliminado de un área.

Cribado acaricida

Los productos comerciales que se están utilizando actualmente para combatir la infestación por ácaros pueden ser letales para las abejas adultas cuando se administran en altas concentraciones, pueden tener efectos adversos en los apicultores y pueden contaminar la miel destinada al consumo humano. Los acaricidas convencionales incluyen

tau-fluvalinato (un compuesto sintético-piretroide utilizado como contacto selectivo y veneno estomacal) y coumafós (un fosfato orgánico sistémico) utilizado en animales para combatir piojos, garrapatas y ácaros. En contraposición con acaricidas convencionales, las composiciones de la invención contienen productos naturales seguros obtenidos a partir del lúpulo. El lúpulo se ha utilizado durante siglos para dar sabor a la cerveza; por consiguiente, las formulaciones que comprenden derivados de lúpulo son generalmente seguras. Las composiciones acaricidas de la invención no afectarán negativamente a los apicultores o a la miel destinada al consumo humano.

Los acaricidas de la invención contienen concentraciones de derivados de lúpulo que tienen pocos efectos o ningún efecto adverso en las abejas melíferas en cualquiera de sus estadios, pero son eficaces en matar o afectar al funcionamiento biológico de un ácaro. Como se describe en el presente documento, los ácidos beta, un derivado del lúpulo, administrados a una concentración del 4 % mataron el 87 % de los ácaros expuestos al cabo de cuatro horas, causando 0 % de letalidad en las abejas adultas. En un enfoque, los ácaros se exponen a diferentes concentraciones de derivados del lúpulo para identificar aquellas concentraciones que matan entre el 50 % y el 100 % del ácaro expuesto. Las abejas melíferas adultas se exponen entonces a concentraciones de derivados del lúpulo con actividad acaricida para identificar aquellos que poseen un efecto mínimo en la supervivencia de las abejas melíferas. Preferentemente, al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % de las abejas adultas sobrevivirá tras la exposición a una composición acaricida. En un enfoque similar, se evaluó el efecto de los derivados del lúpulo en la reproducción de ácaros y abejas melíferas. Los ensayos de cribado se utilizan para determinar la concentración de un acaricida que reduce el número de huevos puestos por el ácaro hembra, reduce el número de huevos que eclosionan, o reduce el número de ácaros que crecen hasta la madurez reproductiva; preferentemente, la reducción es de al menos 25 %, 50 %, 75 %, 85 %, 95 % o 100 %.

Derivados del lúpulo

Un derivado de lúpulo es un compuesto que se presenta de manera natural en una planta de lúpulo (*Humulus lupulus*) o se obtiene químicamente (bien a través de procesos biosintéticos naturales (por ejemplo, metabolismo del organismo vivo (por ejemplo, mamífero, planta, bacteria)) o bien por procesos sintéticos con intervención humana (por ejemplo, síntesis química). Las composiciones de la invención incluyen uno o más compuestos obtenidos a partir del lúpulo. De particular interés son los ácidos de lúpulo. El lúpulo contiene dos clases principales de ácidos orgánicos, ácidos alfa y ácidos beta. Los ácidos de lúpulo son los componentes del ácido amargo del lúpulo que se utilizan en la fabricación de cerveza. Hay tres análogos principales de ácidos alfa, humulona, cohumulona, y adhumulona, y tres análogos principales de ácidos beta, lupulona, colupulona, y adlupulona. Los porcentajes de los análogos presentes en los ácidos alfa y ácidos beta son dependientes de la variedad. Por consiguiente, los derivados del lúpulo y los productos del lúpulo contienen generalmente uno o una mezcla de estos análogos. El porcentaje del presente análogo depende de la variedad de lúpulo utilizado para producir el derivado o producto. Los ácidos alfa y ácidos beta pueden prepararse por purificación a partir del lúpulo natural y también por síntesis química de acuerdo con los métodos tradicionales. Derivados de lúpulo a modo de ejemplo incluyen ácidos beta, ácidos hexahidro-beta, ácidos rho-iso-alfa, ácidos iso-alfa, ácidos tetrahidro-iso-alfa, ácidos hexahidro-iso-alfa, sales de magnesio de ácidos rho-iso-alfa y sales de magnesio de ácidos beta. Las composiciones que comprenden derivados de lúpulo también se disponen comercialmente. John I. Haas, Inc. Los productos que contienen derivados de lúpulo incluyen Betacide, Redihop®, Isohop®, Tetrahop Gold®, Hexahop Gold®, MgARIA y MgBeta. Los principios activos en estos productos son ácidos beta, ácidos rho-iso-alfa (ARIA), ácidos iso-alfa (AIA), ácidos tetrahidro-iso-alfa (ATHIA), ácidos hexahidro-iso-alfa (AHHIA), sales de magnesio de ácidos rho-iso-alfa (MgARIA) y sales de magnesio de ácidos beta (MgBeta), respectivamente. Para mayor comodidad, las identidades de estos productos también se listan en la Tabla 1. Estos productos y/o derivados del lúpulo se diluyen generalmente en una concentración deseada para su uso en los métodos de la invención.

Los extractos vegetales se utilizan a menudo para la purificación de compuestos procedentes de plantas (por ejemplo, lúpulo). Un extracto puede prepararse por secado y, posteriormente, cortando o moliendo el material secado. El término "extracto" se refiere a una preparación concentrada de los constituyentes esenciales de una planta, tal como lúpulo. En general, un extracto se prepara secando y pulverizando la planta. Opcionalmente, la planta, la planta secada o la planta pulverizada puede hervirse en una solución. El extracto puede utilizarse en forma líquida, o puede mezclarse con otros extractos herbales líquidos o sólidos. Alternativamente, el extracto puede obtenerse por precipitación adicional de extractos sólidos procedentes de la forma líquida. El proceso de extracción puede llevarse a cabo entonces con ayuda de una elección apropiada de disolvente, generalmente mezcla de etanol/agua, metanol, butanol, isobutanol, acetona, hexano, éter de petróleo u otros disolventes orgánicos por medio de maceración, percolación, repercolación, extracción en contracorriente, turbo-extracción, o por extracción de dióxido de carbono supercrítico (temperatura/presión). El extracto puede entonces evaporarse adicionalmente y por consiguiente concentrarse para producir por secado al aire, secado por pulverización, secado en horno de vacío, secado en lecho fluido, o liofilización, el producto extracto.

Los extractos crudos se ensayan para la actividad acaricida según se describe en el presente documento. El fraccionamiento adicional de un extracto de plomo positivo con actividad acaricida es necesario para aislar los constituyentes químicos responsables del efecto observado. Por consiguiente, el objetivo del proceso de extracción, fraccionamiento, y purificación es la caracterización e identificación cuidadosas de una entidad química en el extracto crudo que afecta a una función biológica de un ácaro. Los métodos de fraccionamiento y purificación de

dichos extractos heterogéneos son conocidos en la materia. Si se desea, los compuestos mostrados para ser útiles como acaricidas se modifican químicamente de acuerdo con métodos conocidos en la materia.

5 Existen numerosos métodos disponibles para la síntesis química de los compuestos candidatos. Tales compuestos pueden sintetizarse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles utilizando técnicas de síntesis convencionales y metodologías conocidas por los expertos en la materia. Las transformaciones de química sintética y metodologías de grupo protector (protección y desprotección) útiles en la síntesis de los compuestos identificados por los métodos descritos en el presente documento se conocen en la materia e incluyen, por ejemplo, los descritos en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª ed., John Wiley and Sons (1991).; L. Fieser y M. Fieser, *Fieser y Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); L. Paquette, ed, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995).; y M. Verzele y D. De Keukeleire, *Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids*, Elsevier: Amsterdam (1991). Los ácidos alfa y beta químicamente sintetizados pueden separarse de una mezcla de reacción y purificarse adicionalmente por un método, tal como cromatografía en columna, cromatografía líquida de alta presión, o recristalización. Como el experto puede apreciar, otros métodos de síntesis de compuestos en el presente documento resultarán evidentes para el experto en la materia. Adicionalmente, las diversas etapas de síntesis pueden llevarse a cabo en una secuencia u orden alternativo para dar los compuestos deseados.

20 Los compuestos de esta invención pueden contener uno o más centros asimétricos y por consiguiente presentarse como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros únicos, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas estas formas isoméricas de estos compuestos se incluyen expresamente en la presente invención. Los compuestos de esta invención también pueden representarse en múltiples formas tautoméricas, en tales casos, la invención incluye expresamente todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos en el presente documento. Todas estas formas isoméricas de dichos compuestos se incluyen expresamente en la presente invención. Todas las formas cristalinas de los compuestos descritos en el presente documento se incluyen expresamente en la presente invención. Como se utiliza en el presente documento, los compuestos de esta invención, incluyendo los compuestos de las fórmulas descritas en el presente documento, se definen para incluir derivados. Los derivados incluyen compuestos de la invención que se modifican anexionando funcionalidades apropiadas para mejorar las propiedades deseadas.

35 Las sales aceptables de los compuestos de esta invención incluyen las obtenidas a partir de ácidos y bases inorgánicas y orgánicas aceptables. Ejemplos de sales de ácidos adecuados incluyen acetato, adípato, alginato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptanoato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clohidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxiitanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Otros ácidos, tales como ácido oxálico, se pueden emplear en la preparación de sales útiles como intermedios para obtener los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido aceptables. Las sales obtenidas a partir de bases apropiadas incluyen sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio), metal alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio), amonio y N-(alquilo)₄⁺. Esta invención también prevé la cuaternización de cualquier grupo que contiene nitrógeno básico de los compuestos divulgados en el presente documento. Los productos acuosos o solubles en aceite o dispersables pueden obtenerse por dicha cuaternización.

45 En algunas realizaciones, las composiciones acaricidas de la invención incluyen sales de metales alcalinos del ácido de lúpulo solubles en agua (por ejemplo, sales de sodio, potasio, litio) y sales de metales alcalinotérreos del ácido de lúpulo insolubles en agua (por ejemplo, calcio, magnesio) que aumentan la estabilidad. Estas composiciones con sal de metal alcalino del ácido de lúpulo (por ejemplo, sal de sodio, potasio, litio) y sal de metal alcalinotérreo del ácido de lúpulo insoluble en agua (por ejemplo, calcio, magnesio) son ventajosamente estables con respecto a los ácidos de lúpulo producidos por métodos convencionales, que son susceptibles a la degradación debido al calor, luz y catálisis ácida. Las composiciones de la invención permanecen estables en condiciones que inducen la degradación de otros ácidos de lúpulo convencionales. En particular, tras transcurrir 6 meses a 1 año de almacenamiento, se espera que las composiciones de la invención retengan aproximadamente al menos 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, o de manera preferente aproximadamente al menos 90 %, 95 % o incluso el 100 % de los ácidos de lúpulo presentes en el momento de la aplicación. Sorprendentemente, los cristales de ácido B del lúpulo también son resistentes a la degradación y exhiben una mayor estabilidad. Por consiguiente, los cristales de ácido B del lúpulo también son útiles en las composiciones y métodos de la invención.

60 Las sales de metales alcalinos del ácido de lúpulo solubles en agua (por ejemplo, sales de sodio, potasio, litio) y sales de metales alcalinotérreos del ácido de lúpulo insolubles en agua (por ejemplo, calcio, magnesio) están presentes generalmente en un diluyente o transportador a niveles que varían de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 95 %. Los métodos del presente documento contemplan la administración de una cantidad eficaz del compuesto o composición del compuesto para lograr el efecto acaricida deseado o indicado. Preferentemente, la cantidad de principio activo (por ejemplo, sales de metales alcalinos del ácido de lúpulo, sales de metales alcalinotérreos del ácido de lúpulo o combinaciones de los mismos) se combinan con materiales transportadores

(por ejemplo, maltodextrina, dextrina cíclica altamente ramificada, almidón de maíz, sólidos de jarabe de maíz, glucosa, ciclodextrina, goma arábica, calagina, inulina, aceite de soja parcialmente hidrogenado, celulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, colofonia, hipomelosa) para formar un polvo adecuado para la administración. Para algunas aplicaciones, los acaricidas de la invención se formulan como líquidos al utilizar diluyentes (por ejemplo, soluciones de sacarosa o glucosa, agua, zumos, otras soluciones acuosas, disolventes miscibles en agua (etanol, Cremophor, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), isopropanol (IPA) o glicerol, y otros disolventes)) para formar una solución o suspensión.

Una preparación acaricida típica contendrá aproximadamente 1 % a aproximadamente 95 % de ácido de lúpulo, en el que la parte inferior del intervalo es cualquier número entero entre 5 y 94 y la parte superior del intervalo es cualquier número entero entre 6 y 95, en el que los ácidos de lúpulo se proporcionan en un transportador (por ejemplo, maltodextrina, dextrina cíclica altamente ramificada, almidón de maíz, sólidos de jarabe de maíz, glucosa, ciclodextrina, goma arábica, calagina, inulina, colofonia, aceite parcialmente hidrogenado de soja, celulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hipomelosa) que es adecuado para su uso en métodos de producción de un producto que posee actividad acaricida. Cuando se desean composiciones acaricidas no acuosas, el acaricida de la invención se formula preferentemente con rosina o aceite de soja parcialmente hidrogenado. Dichas composiciones pueden utilizarse para la liberación paulatina de la composición acaricida activa, por ejemplo, en una suspensión acuosa. En otras realizaciones, las composiciones acaricidas de la invención se dispersan en polvo de celulosa. En cada una de las realizaciones mencionadas anteriormente, las sales de metal alcalino del ácido de lúpulo (por ejemplo, sodio, potasio, litio), las sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio, magnesio), u otras sales del ácido de lúpulo se dispersan o se disuelven en agua, etanol, u otro diluyente junto con uno cualquiera o más de maltodextrina, dextrina cíclica altamente ramificada, almidón de maíz, sólidos de jarabe de maíz, glucosa, ciclodextrina, goma arábica, calagina, inulina, colofonia, aceite de soja parcialmente hidrogenado, celulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, e hipomelosa. La composición se seca entonces por pulverización para facilitar la formación de partículas inferiores a 1 mm de tamaño. Preferentemente, las condiciones utilizadas para el secado por pulverización se ajustan de manera tal que las partículas poseen aproximadamente al menos 1 µm, 5 µm, 10 µm, 25 µm, 50 µm, 75 µm, 100 µm, 150 µm, 200 µm, 500 µm, 1 mm, 2 mm, o 5 mm de tamaño. La relación de los ácidos de lúpulo a transportador oscila entre aproximadamente 1:2 y 1:100. Las relaciones preferentes incluyen 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:75, y 1:100. Alternativamente, las composiciones de la invención incluyen aproximadamente al menos 1 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 90 %, o 95 % de sales de metal alcalino del ácido de lúpulo (por ejemplo, sodio, potasio, litio) o sales de metales alcalinotérreos del ácido de lúpulo (por ejemplo, calcio, magnesio) en un diluyente o transportador. No todos los ácidos de lúpulo necesitan encontrarse en forma metálica. En cualquier punto entre 5 % y 100 %, los ácidos de lúpulo presentes en la composición se encuentran en forma metálica en un momento dado, y entre 95 % y 0 % están presentes como ácidos libres. En diversas realizaciones, una composición de la invención contiene ácidos de lúpulo, en el que el 90 % se encuentra en forma metálica y el 10 % se encuentra en forma ácida; el 50 % se encuentra en forma metálica y el 50 % en forma ácida; y el 10 % se encuentra en forma metálica y el 90 % en forma ácida.

En realizaciones preferentes, la preparación incluye entre 1 y 95 % (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %) de ácidos de lúpulo en un transportador o diluyente. Alternativamente, tales preparaciones contienen aproximadamente 20 % a aproximadamente 80 % de ácidos de lúpulo. Las composiciones que contienen ácidos alfa o beta se fabrican por métodos ordinarios. Los ácidos de lúpulo adecuados para la adición a los productos pueden formularse como comprimidos, cápsulas, sólidos, líquidos, emulsiones, suspensiones, gránulos finos o polvos ordinarios, que son adecuados para la administración a los productos durante su preparación, tras la preparación, pero antes del almacenamiento, o en cualquier momento antes de su venta a un vendedor o consumidor. Se pueden requerir cantidades inferiores o superiores a las mencionadas anteriormente. Las composiciones definidas en el presente documento incluyen los compuestos de las fórmulas definidas en el presente documento, así como agentes acaricidas adicionales si están presentes, en cantidades eficaces para inhibir el crecimiento o la supervivencia de ácaros. Las composiciones acaricidas de la invención pueden utilizarse prácticamente en cualquier aplicación en la que se desea la inhibición de un ácaro. Por ejemplo, las composiciones de la invención se utilizan para prevenir, reducir, inhibir, ralentizar o estabilizar el crecimiento, la proliferación o la supervivencia de un ácaro.

Las dosis superiores o inferiores a las mencionadas en el presente documento pueden requerirse para matar los ácaros eficazmente sin afectar negativamente a las abejas melíferas. Los regímenes de dosificación y tratamiento específicos se determinan empíricamente como se describe en el presente documento. Las composiciones de la invención también son útiles para prevenir el establecimiento de una infestación por ácaros, para tratar una infestación por ácaros establecida, y para mantener la salud de una colmena tratada previamente por una infestación por ácaros.

Formulaciones

Los derivados de lúpulo pueden ser proporcionados a las abejas o a las colmenas de abejas en una serie de formulaciones convenientes. En general, las estrategias para dispersar un agente terapéutico o profiláctico en la colmena se basan en i) proporcionar el agente en una fuente alimentaria (por ejemplo, un alimento sólido o líquido);

ii) proporcionar el agente en una composición que inducirá el comportamiento higiénico concebido para eliminar la composición de la colonia (un paquete concebido para ser destruido por las abejas); o iii) proporcionar el agente en forma en que las abejas lo distribuirán por la colonia (por ejemplo, un polvo de rastreo proporcionado a la entrada de la colmena). Las formulaciones de la invención se utilizan para orientar los ácaros al cuerpo de las abejas adultas, en la celdilla de cría, o en la colmena. Deseablemente, la composición de la invención está activa en la colmena durante al menos cuarenta y un días. Esto proporciona la presencia del acaricida durante el ciclo total de vida de un ácaro, que normalmente se completa en el transcurso de veintiuno a treinta días. Cuando la actividad se mantiene durante un periodo más breve (por ejemplo, siete, catorce, veintiuno, o treinta días), la administración repetida de una composición de la invención puede ser deseada o necesaria. También se prevén composiciones que están activas durante periodos prolongados (por ejemplo, dos, tres, seis, nueve o doce meses). Dichas composiciones pueden utilizarse para el tratamiento a largo plazo o para la prevención de una infestación por ácaros.

Formulaciones en polvo

Los acaricidas actuales se introducen en la colmena en tiras de plástico no biodegradables de aproximadamente 1 pulgada de ancho, 9 pulgadas de largo y ¼ pulgada de grosor. Se podrían utilizar medios similares para la administración de los derivados de lúpulo. Otras composiciones de tira incluyen, entre otros, membranas, tiras de papel, plástico, y poliméricas. En una realización, una composición que comprende un derivado de lúpulo se proporciona en una formulación en polvo. Un material de sustrato se recubre con una formulación en polvo de ácidos de lúpulo, y el revestimiento se recubre posteriormente en una capa de una sustancia que es atractiva para las abejas, tales como azúcar en polvo. Esta tira se coloca dentro de la colmena, en la que las abejas adultas mastican el azúcar en polvo y se exponen a los ácidos de lúpulo en polvo. Los ácidos de lúpulo en polvo se quedan en el cuerpo de las abejas adultas, contactando de este modo con los ácaros presentes en las abejas adultas y provocando su muerte. Alternativamente, las abejas consumen los ácidos de lúpulo y estos se introducen en su hemolinfa, que es consumida posteriormente por los ácaros, provocando así su muerte.

En otro enfoque, la mezcla en polvo se administra a la colmena en un envase flexible semipermeable que se asemeja a una "bolsita de té". Para que la colmena se deshaga de este objeto extraño, las abejas rompen el envase flexible, liberando de esta manera el producto en polvo. Los ácidos de lúpulo en polvo permanecen en el cuerpo de las abejas adultas y se distribuyen por toda la colmena, matando así (o de otra manera se interfiere con la proliferación o la supervivencia) los ácaros presentes en las abejas e inhibiendo la infestación por ácaros.

Formulaciones encapsuladas

En un enfoque, un derivado de lúpulo se proporciona en una formulación encapsulada (líquida o polvo). Preferentemente, un derivado de lúpulo en forma líquida o en polvo se encapsula en un revestimiento que se descompone lentamente en el interior de la colmena. El revestimiento proporciona la liberación a largo plazo del derivado de lúpulo. Preferentemente, la composición se libera en el transcurso de dos a seis semanas (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis semanas). Materiales específicos adecuados para su uso en materiales de cápsula incluyen, entre otros, partículas porosas o sustratos, tales como sílice, perlita, talco, arcilla, pirofilita, tierra de diatomeas, gelatina y geles, polímeros (por ejemplo, poliurea, poliuretano, poliamida, poliéster, etc.), partículas poliméricas, o celulosa. Estos incluyen, por ejemplo, fibras huecas, tubos huecos o tubos que liberan un derivado de lúpulo u otro compuesto especificado anteriormente a través de las paredes, tubos capilares que liberan el compuesto hacia una abertura en el tubo, bloques poliméricos con diferentes formas, por ejemplo, tiras, bloques, comprimidos, discos, que liberan el compuesto fuera de la matriz polimérica, sistemas membranales que contienen el compuesto dentro de un recipiente impermeable y lo liberan a través de una membrana permeable medida, y combinaciones de los anteriores. Ejemplos de tales composiciones de dispensación son laminados poliméricos, gránulos de cloruro de polivinilo, y microcapilares. Se describen métodos de encapsulación adecuados para su uso en apicultura, por ejemplo, en Rieth *et al.*, *Journal of Apiculture Research* 25 (2): 78-84 (1986).

Los procesos de encapsulación se clasifican normalmente como químicos o mecánicos. Ejemplos de procesos químicos para la encapsulación incluyen, entre otros, coacervación compleja, incompatibilidad polímero-polímero, polimerización interfacial en medios líquidos, polimerización *in situ*, secado en líquido, gelificación térmica e iónica en medios líquidos, desolvatación en medios líquidos, procesos químicos a base de almidón, captura en ciclodextrinas, y formación liposomal. Ejemplos de procesos mecánicos para la encapsulación incluyen, entre otros, secado por pulverización, refrigeración por pulverización, lecho fluidizado, deposición electrostática, extrusión centrífuga, separación por disco giratorio o por suspensión rotativa, encapsulación por chorro anular, polimerización en interfase líquido-gas o sólido-gas, evaporación del disolvente, extrusión o pulverización de presión en un baño de extracción de disolvente.

Las microcápsulas son asimismo adecuadas para la liberación a largo plazo de acaricidas. Las microcápsulas son pequeñas partículas que contienen un material principal o principio activo rodeado por un recubrimiento o envoltura. El tamaño de la microcápsula varía generalmente de 1 a 1.000 micrómetros con cápsulas inferiores a 1 micrómetro clasificadas como nanocápsulas y cápsulas superiores a 1.000 micrómetros como macrocápsulas. La carga útil del núcleo varía normalmente de 0,1 a 98 por ciento en peso. Las microcápsulas pueden poseer diversas estructuras (núcleo/envoltura continuo, multinuclear, o monolítica) y poseen formas irregulares o geométricas.

En otro enfoque, el derivado de lúpulo se proporciona en un sistema de suministro a base de aceite. La mezcla del derivado de aceite-lúpulo se deposita en un sustrato sólido y el sustrato que contiene el derivado de lúpulo se coloca dentro de la colmena, en la que posteriormente se pone en contacto y mata los ácaros. Los sustratos de liberación de petróleo incluyen aceites vegetales y/o minerales. En una realización, el sustrato también contiene un agente activo de superficie que hace que la composición se disperse rápidamente en agua; tales agentes incluyen agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, y similares.

Los acaricidas de la invención también pueden proporcionarse como emulsiones. Las formulaciones de emulsión se pueden encontrar como agua en aceite (a/a) o aceite en agua (a/a). El tamaño de gota puede variar desde la escala nanométrica (dispersión coloidal) hasta varios cientos de micrómetros. Diversos tensioactivos y espesantes se incorporan normalmente en la formulación para modificar el tamaño de las gotas, estabilizar la emulsión, y modificar la liberación.

Alternativamente, los acaricidas de la invención pueden formularse igualmente en un comprimido sólido y comprender (y preferentemente consistir esencialmente de) un aceite, un material de proteína/carbohidratos (preferentemente de origen vegetal), un edulcorante y un principio activo útil en la prevención o tratamiento de una infección parasitaria en una abeja melífera. Los métodos para preparar tales composiciones se conocen en la materia y se describen, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20060008492. En una realización, la invención proporciona un comprimido sólido y comprende (y preferentemente consiste esencialmente en) un aceite, un material de proteína/carbohidratos (preferentemente de origen vegetal), un edulcorante y un principio activo (por ejemplo, ácido α y/o β del lúpulo, o combinaciones o derivados de los mismos) útiles en la prevención o el tratamiento de una infestación por ácaros. En general, los comprimidos contienen aproximadamente 4-40 % (por ejemplo, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %) en peso de un aceite (por ejemplo, aceite vegetal, tal como aceite de maíz, girasol, cacahuete, oliva, semilla de uva, tung, nabo, soja, semillas de algodón, nuez, palma, ricino, almendra de tierra, avellana, aguacate, sésamo, croton tiglium, cacao, semillas de lino, colza, y canola y sus derivados hidrogenados; aceites derivados del petróleo (por ejemplo, parafinas y vaselina), y otros hidrocarburos inmiscibles en agua (por ejemplo, parafinas). Los comprimidos contienen además aproximadamente 5-40 % (por ejemplo, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %) en peso de un material de proteína/carbohidratos a base de vegetales. El material contiene tanto una porción de carbohidratos (por ejemplo, obtenidos a partir de granos de cereales, tales como trigo, centeno, cebada, avena, maíz, arroz, mijo, sorgo, alpiste, alforfón, alfalfa, mielga, harina de maíz, harina de soja, harina de grano, harinillas de trigo, salvado de trigo, harina de gluten de maíz, harina de algas, levadura seca, judías, arroz) y una porción proteica. Aunque la fracción relativa de cada porción que compone el material puede variar, el material ha de incluir al menos una porción de carbohidratos y proteínas.

Los comprimidos también contienen aproximadamente entre 10-75 % (10, 15, 20, 25, 50, 75 %) en peso de un edulcorante. Como se utiliza en el presente documento, el término "edulcorante" se refiere generalmente a edulcorantes naturales y artificiales. Preferentemente, el edulcorante es un azúcar, tal como glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, lactosa, y azúcar invertido. El azúcar se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en azúcar granulada (azúcar blanco), azúcar marrón, azúcar de confitería, azúcar impalpable, azúcar glasé, y combinaciones de los mismos. Alcoholes, tales como glicerina y carbohidratos complejos, tales como almidones también pueden utilizarse como el ingrediente "edulcorante". El edulcorante se utiliza principalmente como un atrayente para los insectos, sin embargo, el edulcorante también ayuda a impartir una estructura granular a los comprimidos, en especial cuando el edulcorante es un azúcar. Como se ha discutido previamente, esta estructura granular permite al comprimido desmenuzarse con el tiempo hasta la presión de una fuerza suficiente.

Opcionalmente, diversos excipientes y aglutinantes pueden utilizarse con el fin de ayudar en la administración del principio activo o proporcionar la estructura adecuada al comprimido. Excipientes y aglutinantes preferentes incluyen lactosa anhidra, celulosa microcristalina, almidón de maíz, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y mezclas de los mismos.

Los comprimidos de acuerdo con la presente invención se fabrican mezclando todos los ingredientes entre sí y comprimiendo la mezcla después en un comprimido con forma y tamaño deseados para una aplicación particular. Preferentemente, el comprimido es discoide en forma con un diámetro de aproximadamente 2-5 pulgadas y un grosor de aproximadamente 0,5-2 pulgadas. El prensado puede realizarse por un dispositivo de prensado manual o automático. La presión ejercida sobre la mezcla ha de ser suficiente a fin de conformar el comprimido en un cuerpo autosostenible.

Los métodos de administración de un principio activo a un insecto de acuerdo con la presente invención comprenden las etapas de proporcionar un comprimido sólido que contiene el principio activo como se ha descrito anteriormente y colocar el comprimido en un lugar en el que el insecto puede ponerse en contacto directo con él. En el tratamiento de las abejas melíferas que por lo general están colonizadas en una colmena de abejas fabricada, el comprimido se coloca preferentemente dentro de la colmena.

Durante las próximas semanas tras haber colocado el comprimido en la colmena, las abejas mastican y desmenuzan el comprimido exponiendo el principio activo a las otras abejas. Los restos caen a través de la cámara de cría alejados de las alzas melíferas. Preferentemente, todo el comprimido se deshace en unos 30-45 días.

Los acaricidas de la invención pueden también administrarse en forma de jarabes que son atractivos para las abejas e inducen el comportamiento de alimentación. Los jarabes para su uso en la invención comprenden preferentemente azúcar y agua. Son particularmente preferentes las soluciones de sacarosa al 50 % p/v. Una composición líquida se forma por dispersión de ácidos de lúpulo en un jarabe de azúcar que comprende sacarosa en agua al 50 %. La composición se utiliza como complemento alimentario para las abejas y puede colocarse en un lugar adecuado en una colmena o cerca de una colmena.

Los acaricidas de la invención también pueden administrarse en paquetes adecuados para la inducción del comportamiento higiénico en las abejas. Dichos paquetes se preparan encerrando un polvo fino de ácidos de lúpulo y azúcar en un material poroso capaz de ser destrozado por las abejas. Preferentemente, el material poroso está hecho de papel encerado o papel de filtro. Papeles de filtro adecuados incluyen aquellos que comprenden fibras de abacá, pasta de madera y fibras de rayón y celulosa. Si se desea, el papel se reviste con polietileno mezclado con copolímeros, polipropileno mezclado con copolímeros o polipropileno al 100 %.

En otras realizaciones, los acaricidas se preparan en una composición para espolvoreo o como un producto en polvo. Las composiciones para espolvoreo se preparan generalmente mediante la molienda de azúcar a un polvo fino y mezclándolas en los ácidos de lúpulo en polvo. Alternativamente, las composiciones para espolvoreo se preparan como se describe en el Ejemplo 3 para maltodextrina, en el que el producto en polvo se obtiene mediante secado por pulverización. El experto ajusta las condiciones utilizadas en el proceso de secado por pulverización para conseguir partículas o gránulos de un tamaño que facilita la administración a las abejas. Deseablemente, el producto en polvo comprende partículas finas que cubren la abeja y todas las partes de su cuerpo (por ejemplo, articulaciones, orificios, pelos). La composición para espolvoreo puede aplicarse directamente a la parte superior de los marcos de las abejas, a los panales dentro de la colmena, o a las superficies internas de la colmena, o pueden aplicarse directamente a un grupo de abejas.

Alternativamente, los acaricidas se preparan en una composición de pulverización líquida que se forma dispersando ácidos de lúpulo en cualquier líquido adecuado. Preferentemente, los ácidos de lúpulo se dispersan en agua. Si se desea, la composición de pulverización también incluye un tensioactivo que permite que el pulverizador se disperse de manera eficiente sin obstruir el aparato de pulverización. La composición puede utilizarse para pulverizar el interior de la colmena, o el panal, o puede utilizarse para pulverizar directamente grupos de abejas.

En otro enfoque, los acaricidas de la invención se administran en forma de un vapor. Se describen métodos para la administración de estos vapores a una colmena, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20020151249.

Administración del acaricida

Se conocen en la materia dispositivos para la administración de agentes de control de plagas para las abejas o para una colmena de abejas. Dichos dispositivos de administración incluyen tiras, tiras de liberación controlada, comprimidos, depósitos, discos poliméricos, bandejas, y dispositivos de evaporación. Si se desea, el dispositivo de administración se proporciona en forma biodegradable. En particular, se describen dispositivos adecuados para la administración de una composición de la invención a un ácaro parásito, a una abeja melífera, o a una colmena de abejas melíferas, por ejemplo, en las publicaciones de las patentes de Estados Unidos n.º 20070059333; 20070026765; 20060141904; 20060009122; 20060008492; 20050095954; 20050090560; 20050048093; 20040229542; 20040077291; 20030190860; 20030044443; 20030027490; 20020182977; 20020151249; 20020094756; 20010014346 y 20020151249. Los medios de dispensación y las composiciones adecuadas para la liberación controlada se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 6.843.985; 5.750.129; 4.775.534; 5.849.317; 5.348.511; 6.037.374; 7.137.864; 6.837.770; 6.820.773; 6.702.645; 6.646.014; 6.620.025; 6.595.828; 6.585.557; 6.475.061; 6.468.129; 6.277.371; 6.221.375; 6.204.283; 6.096.350; 6.037.374; 6.010.390; 5.312.622; 5.230.894; 5.227.162; 5.135.758; 5.070.091; 5.069.651; 5.023.359; 4.876.265; 4.867.731; 4.837.216; 4.682.380; y 4.299.816.

Kits

La invención proporciona kits para el tratamiento o prevención de una infestación por ácaros. En una realización, el kit incluye una composición que contiene una cantidad eficaz de un derivado de lúpulo en una forma adecuada para la administración a un sitio de infestación (por ejemplo, colmena de abejas). En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente que contiene un acaricida; estos recipientes pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, envases flexibles, envases ampollas, u otras formas de recipientes adecuados conocidos en la materia. Dichos recipientes pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel laminado, lámina metálica, u otros materiales adecuados para la contención de acaricidas.

Si se desea, el acaricida de la invención se proporciona junto con instrucciones para su administración a un sitio de infestación. Las instrucciones incluirán generalmente información sobre el uso de la composición para el tratamiento o prevención de una infestación por ácaros. En otras realizaciones, las instrucciones incluyen al menos una de las siguientes: descripción del acaricida; pauta de dosificación y administración para el tratamiento o prevención de una

infestación acaricida; precauciones; advertencias; descripción de los estudios de investigación; y/o referencias. Las instrucciones pueden estar impresas directamente en el recipiente (cuando está presente), o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como una hoja separada, folleto, tarjeta, o carpeta suministrada en el recipiente o con el recipiente.

5

Ejemplos

Ejemplo 1: ácidos beta y alfa del lúpulo utilizados en el cribado acaricida

10 Los ácidos beta, ácidos alfa, y una combinación de ácidos beta y alfa se cribaron para su eficacia como acaricidas. Los productos de ensayo líquidos que contienen ácidos beta se proporcionaron en una formulación de Betastab 10A® (ácidos beta al 10 %) en lo sucesivo denominado "Betacide". Los productos de ensayo líquidos que contienen ácidos alfa se proporcionaron en una formulación de Redihop® (ácidos rho-iso-alfa al 30 %), formulación de Isohop® (ácidos iso-alfa al 30 %), formulación de Tetrahop Gold® (ácidos tetrahidro-iso-alfa al 9 %), formulación de Hexahop Gold® (ácidos hexahidro-iso-alfa al 5 % y ácidos tetrahidro-iso-alfa al 5 %). Una combinación de ácidos alfa y beta se preparó mezclando partes iguales de Redihop® y Betacide. Los productos de ensayo en polvo que contienen ácidos beta se proporcionaron por una formulación de sal de magnesio de ácidos beta. Los productos de ensayo en polvo que contienen ácidos alfa se proporcionaron por formulaciones de sal de magnesio de Redihop®, Tetrahop Gold® y Hexahop Gold®.

20

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando las concentraciones de ácido beta, alfa, o combinaciones de ácido beta y alfa indicados en la Tabla 1.

25

En concreto, en los Ensayos 1-4: se utilizaron ácidos beta al 5 % como solución de ensayo de Betacide, ácidos rho-iso-alfa al 15 % como solución de ensayo de Redihop®, y una combinación de ácidos beta al 2,5 %/ácidos rho-iso-alfa al 7,5 %.

30

En los ensayos 5-8, se utilizaron ácidos beta al 4 % como solución de ensayo de Betacide, una concentración de ácidos rho-iso-alfa al 30 % como solución de ensayo de Redihop®, y una combinación de ácidos beta al 2 %/ácidos rho-iso-alfa al 15 %.

35

En los ensayos 9-12, se utilizaron ácidos beta al 4 % como solución de ensayo de Betacide, una concentración de ácidos rho-iso-alfa al 30 % como solución de ensayo de Redihop®, y una combinación de ácidos beta al 2 %/ácidos rho-iso-alfa al 15 %.

40

En los ensayos 13-15, se utilizaron ácidos iso-alfa al 30 % como Isohop®, ácidos tetrahidro-iso-alfa al 9 % como Tetrahop Gold®, y una combinación de ácidos tetrahidro-iso-alfa al 5 % y ácidos hexahidro-iso-alfa al 5 % de Hexahop Gold®.

45

En los ensayos 16-19, se utilizaron ácidos beta al 4,3 % y al 8,5 % como sal de magnesio, ácidos rho-iso-alfa al 65,5 % como sal de magnesio de Redihop®.

En los ensayos 20-22, se utilizaron ácidos tetrahidro-iso-alfa al 25,3 % como sal de magnesio de Tetrahop Gold®, y una combinación de ácidos tetrahidro-iso-alfa y ácidos hexadro-iso-alfa al 12,2 % de sales de magnesio de Hexahop Gold®.

Ensayos de cribado acaricida

50

Los ensayos que utilizan productos de lúpulo líquido se llevaron a cabo mediante la absorción de un mililitro de solución de ensayo sobre un papel de filtro en una placa de Petri. Los ensayos que utilizan los productos de lúpulo en polvo (sales de magnesio) se llevaron a cabo mediante la difusión de 0,5 g de polvo de ensayo de manera uniforme sobre un papel de filtro en una placa de Petri. Se colocaron a continuación entre cinco a diez ácaros *Varroa* en el papel de filtro tratado y se determinó la supervivencia de los ácaros en los intervalos de tiempo de una hora, cuatro o cinco y veinticuatro horas. Métodos similares se utilizaron para evaluar el efecto de los compuestos de ensayo en la supervivencia de la abeja melífera adulta. La supervivencia de la abeja melífera adulta se obtuvo tras veintidós horas de exposición al producto de ensayo. Cinco a diez abejas melíferas adultas se colocaron en placas de Petri que contenían papel de filtro tratado. El papel de filtro tratado con agua (para soluciones de ensayo líquidas) o almidón de maíz (para soluciones de ensayo en polvo) se utilizó como control negativo para los ensayos con los ácaros y las abejas melíferas adultas. Todos los ensayos se repitieron cuatro veces.

60

La Tabla 1 resume los ensayos y los resultados de los ensayos de varios productos de lúpulo para la actividad acaricida.

Tabla 1. Eficacia de los derivados de lúpulo frente a ácaros *Vairroa* de las abejas melíferas

Número de ensayo	Figura	Producto	Principio activo (pa)	% del ácido del ensayo del producto				% de mortalidad/tiempo de exposición			
				Conc. %	Alfa	Beta	Diluyente	Ácaros	Horas	Abejas	Horas
1	1	agua desionizada	ninguno	NA	NA	NA	ninguno	7	4	0	22
2	1	Betacide	ácidos beta	10	NA	5	agua desionizada	73	4	20	22
3	1	Redihop	ácidos rho-iso-alfa	30	15	NA	agua desionizada	21	4	0	22
4	1	Redihop + Betacide	conforme el ensayo 2 + ensayo 3	30 + 10	7,5	2,5	agua desionizada	43	4	7	22
5	2	agua desionizada	ninguno	NA	NA	NA	ninguno	7	4	0	24
6	2	Betacide	ácidos beta	10	NA	4	agua desionizada	87	4	0	24
7	2	Redihop	ácidos rho-iso-alfa	30	30	NA	agua desionizada	68	4	0	24
8	2	Redihop + Betacide	conforme el ensayo 2 + ensayo 3	30 + 10	15	2	agua desionizada	80	4	0	24
9	3	agua desionizada	ninguno	NA	NA	NA	ninguno	0	1	0	24
10	3	Betacide	ácidos beta	10	NA	4	agua desionizada	20	1	SD	24
11	3	Redihop	ácidos rho-iso-alfa	30	30	NA	agua desionizada	13	1	SD	24
12	3	Redihop + Betacide	conforme el ensayo 2 + ensayo 3	30 + 10	15	2	agua desionizada	13	1	SD	24
13	3	Isohop	ácidos iso-alfa	30	30	NA	agua desionizada	70	1	33	24
14	3	Tetrahop Gold	ácidos tetrahidro-iso-alfa	9	9	NA	agua desionizada	81	1	0	24
15	3	Hexahop Gold	ácidos hexahidro-alfa más ácidos tetrahidro-iso-alfa	5	5	NA	agua desionizada	100	1	7	24
16	4	almidón de maíz	ninguno	NA	NA	NA	ninguno	13	5	SD	SD
17	4	MgBeta	sal de magnesio de ácidos beta	59,5	NA	4,3	almidón de maíz	38	5	SD	SD
18	4	MgBeta	sal de magnesio de ácidos beta	59,5	NA	8,5	almidón de maíz	67	5	0	24
19	4	MgARIA	sal de magnesio de ácidos rho-iso-alfa	65,5	65,5	NA	almidón de maíz	7	5	SD	SD
20	5	almidón de maíz	ninguno	NA	NA	NA	ninguno	17	24	0	24
21	5	Mg de Tetrahop Gold	sal de mg de ácidos tetrahidro-iso-alfa	75,8	25,3	NA	almidón de maíz	50	24	0	24

22	5	Mg de Hexahop Gold	sal de mg de ácidos hexahidro- iso-alfa más sal de mg de ácidos	36,7 36,7	12,2 12,2	NA NA	almidón de maiz	50	24	0	24
----	---	-----------------------	--	--------------	--------------	----------	-----------------	----	----	---	----

Notas: NA significa no aplicable
SD significa sin datos

Los resultados de los ensayos descritos en la Tabla 1 se muestran en las Figuras 1-5.

5 En los ensayos 1-4 después de haber transcurrido cinco horas de exposición, los ácidos beta al 5 % mataron el 73 % de los ácaros *Varroa*; los ácidos rho-iso-alfa al 15 % mataron el 21 % de los ácaros *Varroa*; y una combinación de ácidos beta al 2,5 %/ácidos rho-iso-alfa al 7,5 % produjo una mortalidad del 43 % en los ácaros. En condiciones de control solo se observó una mortalidad en ácaros del 7 %. La mayoría de las abejas adultas sobrevivió a la exposición en estas mismas concentraciones de ácidos alfa y beta. En concreto, el 100 % de las abejas adultas sobrevivió a la exposición a los ácidos rho-iso-alfa; el 80 % de las abejas adultas sobrevivió a la exposición a los ácidos beta al 5 %; y el 93 % de las abejas adultas sobrevivió a la exposición a la combinación de ácidos beta al 2,5 %/ácidos alfa al 7,5 %. Estos resultados se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 1.

15 En los ensayos 5-8 después de haber transcurrido cuatro horas de exposición, los ácidos beta al 4 % mataron el 87 % de los ácaros *Varroa*; los ácidos rho-iso-alfa al 30 % mataron el 68 % de los ácaros; y la combinación de ácidos rho-iso-alfa al 15 % y ácidos beta al 2 % mató el 80 % de los ácaros. En condiciones de control se observó una mortalidad en ácaros del 7 %. Las abejas adultas expuestas a estas concentraciones de producto idéntico durante 24 horas mostraron una supervivencia del 100 %. Estos resultados se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 2.

20 En los ensayos 9-15 después de haber transcurrido una hora de exposición, los ácidos beta al 4 % mataron el 20 % de los ácaros *Varroa*; los ácidos rho-iso-alfa al 30 % mataron el 13 % de los ácaros; la combinación de ácidos rho-iso-alfa al 15 % y ácidos beta al 2 % mató el 13 % de los ácaros, los ácidos tetrahidro-iso-alfa al 9 % mataron el 81 % de los ácaros; la combinación de ácidos tetrahidro-iso-alfa al 5 % y ácidos hexahidro-iso-alfa al 5 % mató el 100 % de los ácaros. En condiciones de control no se observó mortalidad alguna de ácaros. Las abejas adultas expuestas a estas concentraciones del producto durante 24 horas mostraron una supervivencia del 67 % tras la exposición a ácidos iso-alfa, una supervivencia del 93 % tras la exposición a la combinación de ácidos tetrahidro-iso-alfa al 5 % y ácidos hexahidro-iso-alfa al 5 %, una supervivencia del 100 % tras la exposición a ácidos tetrahidro-iso-alfa al 9 %, y una supervivencia del 100 % tras la exposición a condiciones de control. Estos resultados se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 3.

30 En los ensayos 16-19, después de haber transcurrido cinco horas de exposición, los ácidos beta al 8,5 % en forma de una sal de magnesio mataron el 67 % de los ácaros *Varroa*; los ácidos rho-iso-alfa al 65,45 % en forma de una sal de magnesio mataron el 7 % de los ácaros *Varroa*. El 13 % de los ácaros murió en condiciones de control. El 100 % de las abejas sobrevivió tras 24 horas de exposición a los ácidos beta al 8,5 % como sal de magnesio. Estos resultados se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 4.

35 En los ensayos 20-22, después de haber transcurrido 24 horas de exposición, los ácidos tetrahidro-iso-alfa al 25,27 % en forma de una sal de magnesio mataron el 50 % de los ácaros *Varroa*; y una combinación de ácidos tetrahidro-iso-alfa al 12,23 % y ácidos hexahidro-iso-alfa al 12,23 % en forma de una sal de magnesio mató el 50 % de los ácaros *Varroa*. El 17 % de los ácaros murió en condiciones de control. El 100 % de las abejas melíferas adultas sobrevivió tras 24 horas en las mismas condiciones. Estos resultados se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 5.

Ejemplo 2: Efecto acaricida de los ácidos de lúpulo en ensayos apícolas simulados

45 En el apiario, se utilizó un cepillo de abejas para barrer suavemente abejas en ½ taza medidora. Para evitar que vuelen, el lateral del cepillo de abejas se utilizó como una tapa en la taza. La ½ taza de abejas se transfirió a ½ pinta o un tarro tipo pinta con una tapa protegida (es decir, un tarro agitador de azúcar). Se utilizó un tarro que contiene ½ vaso de abejas por recipiente de tratamiento.

50 Los recipientes se prepararon insertando una pantalla en la abertura del recipiente y colocando una pieza cortada de tablero adherente en la tapa del recipiente. Las tapas se unieron a los recipientes y los recipientes se invirtieron para que así hubiese desde la parte inferior hacia la parte superior una tapa, un tablero adherente, y una pantalla. Un tapón de goma n.º 5 se colocó en uno de los dos orificios de suministro. Un tarro de abejas se colocó brevemente en el congelador a -20 °C. Las abejas se mantuvieron en el congelador hasta que el movimiento de las abejas se redujo considerablemente (3 a 5 minutos). En este punto, las abejas estaban listas para pintarse con pintura para abejas - Testors® u otra marca similar. Las abejas se retiraron del congelador y se dejaron en una bandeja metálica. Un pequeño punto de pintura se marcó en el tórax de cada abeja utilizando un pequeño pincel. Las abejas pintadas se colocaron en el recipiente dejándolas caer a través del orificio de suministro hasta que todas las abejas del tarro se pintaron.

60 La cantidad de tratamiento deseado se preparó y se administró mediante la colocación de forma rápida de las abejas en el tarro junto con una mezcla que contiene 2 gramos de una mezcla 1:1 de sal de magnesio al 52 % de ácidos beta del lúpulo (Mgbeta) y almidón de maíz o un control de almidón de maíz. Las abejas en el tarro se hicieron rodar en continuación en el producto en polvo hasta estar completamente cubiertas de este. Las abejas se transfirieron entonces a un nuevo recipiente en el que se ensayó la actividad acaricida. Durante el ensayo, las abejas se alimentaron con una solución 1:1 de sacarosa con agua caliente y se mantuvieron en una incubadora a 32,5 °C y

60 % de humedad. La mortalidad de las abejas se controló diariamente. Los alimentadores se repusieron extrayendo/recargando los viales y reemplazando temporalmente los tapones de goma.

5 Las abejas tratadas se agitaron en el agitador de azúcar para determinar cuántos ácaros permanecían en las abejas después de una semana. Este método consiste en mezclar ½ vaso de abejas con unas cucharadas de azúcar en polvo y agitando enérgicamente las abejas. El azúcar se desprende, se recogen los ácaros, y los ácaros se cuentan. El número de ácaros presentes después de la sacudida de azúcar se combina con el número de ácaros muertos que se encontraron en los tableros adherentes para determinar el número total de ácaros por recipiente (T1-T4). Los porcentajes de mortalidad se calcularon dividiendo el número de ácaros muertos en los tableros adherentes por el número total de ácaros.

Grupo de tratamiento	Mortalidad de ácaros
T1	92,86 % de mortalidad de ácaros
T2	83,33 %
T3	90,9 %
T4 (control)	42,86 % de mortalidad de ácaros

El número total de ácaros en cada grupo de tratamiento, que incluía aproximadamente 80 abejas, varió de 7 a 14.

15 **Ejemplo 3: las sales de sodio y magnesio de ácidos de lúpulo matan los ácaros**

Los ensayos que utilizan los productos de lúpulo en polvo (sales de magnesio) se llevaron a cabo mediante la difusión de polvo de ensayo de manera uniforme sobre papel de filtro en una placa de Petri. El polvo de ensayo MgBeta contenía una mezcla 1:1 de 0,25 g de sal de magnesio de ácidos beta (sales de magnesio beta al 52 % de ácidos de lúpulo) y almidón de maíz; por consiguiente, se utilizó sal de magnesio al 26 % de ácidos beta en el ensayo. El polvo de ensayo NaBeta contenía una mezcla 1:1 de 0,25 g de sal de sodio de los ácidos beta (sal de sodio al 6,4 % de los ácidos beta); por consiguiente, se utilizó sal de magnesio al 3,2 % de los ácidos beta. Los ácaros *Varroa* se colocaron en el papel de filtro tratado y se determinó la supervivencia de los ácaros tras haber transcurrido una, dos, tres, cuatro o cinco horas después de la exposición. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

25

Tabla 2: BIOENSAYO DE ÁCAROS - 0,25 g de tratamiento

Fecha	n.º de horas de exposición	Tratamiento	% de mortalidad
28/3/07	1	MgBeta	4,8
		NaBeta	15,1
		Almidón de maíz	0
		Control	0
	2	MgBeta	9,5
		NaBeta	45,2
		Almidón de maíz	0
		Control	11,1
	3	MgBeta	14,3
		NaBeta	45,2
		Almidón de maíz	0
		Control	11,1
	4	MgBeta	28,6
		NaBeta	75,4
		Almidón de maíz	0
		Control	16,7
	5	MgBeta	57,1
		NaBeta	89,7
		Almidón de maíz	0
		Control	39,2

Ejemplo 4: Preparación de sales de sodio del ácido beta solubles en agua

30 Etapa 1: El extracto de CO₂ de lúpulo comercialmente disponible (55 %: ácidos alfa, 30 % ácidos beta, 10 % residuo no caracterizado) (10 kg) se coloca en el Tanque 1. Los extractos de CO₂ se producen por la extracción de dióxido de carbono natural del lúpulo. El dióxido de carbono es un disolvente natural que elimina disolventes residuales que se encuentran presentes generalmente en extractos de lúpulo producidos utilizando disolventes de hexano o de cloruro de etileno. KOH de calidad alimentaria (100 g) se disuelve en agua desionizada (20 l). Se añade la solución de KOH al Tanque 1 y la mezcla se agita a 55-65 °C durante 1 hora y después se detiene la agitación para formar dos capas.

35

Etapa 2: La capa acuosa inferior (15 l) se transfiere al Tanque 2. Las sales de potasio de ácido beta crudo se enfrían a temperatura ambiente durante dos horas y después se añade Celite® (tierra de diatomeas) (mezcla al 0,5 % en p/p) durante 20-30 minutos. La mezcla resultante se filtró a través de un aparato de filtración tipo Buchner al vacío.

5 Etapa 3: El filtrado (10 l) se transfiere al Tanque 3 y se calienta a 70 °C con agitación y después se acidifica con 30 % de H₂SO₄ acuoso hasta que la mezcla alcanza pH 2-3. Se detiene la agitación y se deja que la mezcla forme dos capas. La capa superior (5 l), que está retenida, contiene aproximadamente ácidos beta al 70 %.

10 Etapa 4: La solución acuosa de NaOH (aproximadamente 9 l) se añade a la capa superior (3 l) y el pH se ajusta a pH 10-10,5 a 65 °C con agitación y luego se añade carbón activo (malla 200 de Norit A ®) (mezcla al 2 % p/p) a la solución, que se agita suavemente durante treinta minutos. La mezcla se incubó durante la noche y luego se filtra. El filtrado se diluye con agua desionizada para lograr sales de sodio de ácido beta al 10 % en una composición acuosa. Alternativamente, las mezclas se pasan sobre una columna que contiene una malla 60 de carbón activo.

15 **Ejemplo 5: Preparación del polvo de las sales de sodio del ácido beta del lúpulo**

Los ácidos beta del lúpulo se preparan como se describe en el Ejemplo 4 con la siguiente modificación. En la etapa 4 del Ejemplo 4, la solución de maltodextrina acuosa se preparó en pH 10 mezclando una solución acuosa de sales de sodio de ácido beta con maltodextrina, de manera tal que la relación de ácidos de lúpulo a maltodextrina es una relación de 5:1 a 10:1 tras la filtración. La solución se seca mediante secado por pulverización para obtener un polvo de color amarillo pálido que contiene sales de sodio de ácido beta al 5-10 %.

Ejemplo 6: Preparación de las sales de sodio del ácido beta del lúpulo en solución de EtOH al 67 %

25 Los ácidos beta se prepararon como se describe en el Ejemplo 4 con la siguiente modificación. En la etapa 4 del Ejemplo 4, 500 ml de la solución acuosa, que contiene sales de sodio de ácido beta al 30 % se mezclan con 1.000 ml de EtOH al 100 % con agitación para formar una solución de etanol de color amarillo pálido al 67 % que contiene sales de sodio de ácido beta al 10 %.

30 **Ejemplo 7: Preparación de sales de sodio del ácido beta en solución de EtOH al 90 %**

500 ml de una solución acuosa que contiene sales de sodio de ácido beta al 30 % se neutralizan con 0,1 N H₂SO₄. La fracción rica en ácido beta se precipita en pH 7-9. El sólido se separa y se lava con agua tres veces. El sólido (200 g) se disuelve en 1.700 ml de EtOH al 100 % con agitación. 100 ml de solución acuosa de NaOH (16 g de NaOH y 84 ml de agua) se añaden a la solución de EtOH con agitación para formar una solución de etanol transparente de color amarillo pálido al 90 % que contiene sal de sodio del ácido beta al 10 %.

Ejemplo 8: Estudio de la estabilidad de los ácidos de lúpulo.

40 Las siguientes muestras que contienen ácidos de lúpulo se incubaron en condiciones aerobias a 75 °C durante 0-6 días. Las muestras líquidas se disolvieron en un volumen de 0,1 ml

Muestras

- 45 1. Extracto de lúpulo rico en ácidos beta (10 %) en agua (pH = 5,0)
2. Polvo de ácidos beta al 10 % y maltodextrina al 90 %
3. Polvo de sales de Na de ácido beta al 5 % y maltodextrina al 95 %
4. Polvo de sales de Na de ácido beta al 10 % y maltodextrina al 90 %
5. Sales de Na de ácido beta al 10 % en agua (pH = 10)
- 50 6. Extracto de lúpulo con sales de Mg de ácido beta de lúpulo al 10 %

Tras producirse esta incubación, se ensayó la presencia de ácidos de lúpulo. Después de la incubación de 20 mg de cada muestra a 75 °C en condiciones aerobias, la muestra se disolvió en 1 ml de EtOH acuoso al 70 %. La solución se diluyó 50 veces con metanol y a continuación se inyectaron 20 µl de la muestra diluida en una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para el análisis. Las condiciones de HPLC utilizadas fueron:

Temperatura: 35 °C

Eluyente A: 10 mM de acetato de trietilamonio/agua

Eluyente B: 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo

60 Gradiente: Eluyente B = de 30 % a 90 % en 20 minutos, luego mantener B = 90 % durante 5 minutos

Detección: 370 nm para los ácidos beta, 254 nm para otros picos de degradación

Determinación: Área bajo la curva de tres picos (15-17min) a 370 nm

Muestra auténtica: Extracto de calibración Internacional 2 de la Sociedad Americana de Químicos de la Cerveza

Tipo de HPLC: Serie Agilent HP1100 con un detector de matriz de diodos.

65

Las muestras referidas en la Tabla 3 se describen anteriormente como muestras 1-6. Como se muestra en la Tabla 3, las sales alcalinas de ácidos beta (muestra 3,4, y 5) eran más estables que la forma neutra de los ácidos beta en condiciones neutras o ácidas (1, 2 y 6). Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 3.

5 **Tabla 3: Estudio de la estabilidad de los ácidos beta del lúpulo en condiciones de fuerza**

Muestra	Ácidos beta mantenidos (%)		
	Periodo (día)		
	1	3	6
1	52	20	0
2	40	15	0
3	100	100	98
4	100	100	100
5	100	90	90
6	60	25	0

Este método proporciona la rápida evaluación de la estabilidad química de las sales del ácido de lúpulo relativa a la degradación observada en los ácidos de lúpulo. La degradación observada después de seis días a 75 °C es equivalente a la degradación que se esperaría si los ácidos de lúpulo y las sales se almacenaran durante 6 meses a temperatura ambiente.

Ejemplo 9. Preparación de sales del ácido rho-iso-alfa

Una sal inorgánica de ácidos rho-iso-alfa se produce utilizando cualquier método convencional conocido en la materia. En una realización, un ácido rho-iso-alfa se produce de acuerdo con el siguiente método.

Un tambor vacío se coloca en una balanza y se tara. Al tambor se añadieron 80 kg de una mezcla de ácidos rho-iso-alfa (30 %) en agua desionizada (75 l) a temperatura ambiente. La mezcla se sometió a agitación suave para formar una suspensión acuosa. Se añadió MgSO₄ (45 kg) a la suspensión en una sola vez y la agitación se continuó durante 5-10 minutos hasta que MgSO₄ se distribuyó homogéneamente. Tras 10 minutos, se retiró una pequeña muestra para determinar si la reacción había alcanzado su compleción. Esto se determinó utilizando un HPLC para ensayar la presencia de sal de magnesio de ácidos rho-iso-alfa. Cuando la reacción se completó, la mezcla se eliminó y se añadió agua desionizada para ajustar la concentración de sal de magnesio de ácidos rho-iso-alfa a 15-17 % con un contenido de agua al 83-85 %. Después, la mezcla se secó utilizando métodos convencionales. Cuando se completó el secado, los productos en forma de escamas se empaquetaron en aluminio revestido con bolsas de polietileno, el calor se selló y se almacenó a temperatura ambiente antes del análisis.

Ejemplo 10: Preparación de sales de calcio de ácidos rho-iso-alfa

Para preparar la sal de calcio del ácido rho-iso-alfa, 300 gramos de una solución acuosa de ácido rho-iso-alfa al 30 % que tiene un pH de 11, se mezclaron con 37 gramos de CaCl₂·2H₂O, que habían sido mezclados previamente con 200 ml de agua desionizada. Esta suspensión se mezcló hasta la homogeneidad. Después, la suspensión se vertió directamente sobre una bandeja de secado y se secó.

Ejemplo 11: Preparación de sales de litio de ácidos rho-iso-alfa

Para preparar la sal de litio del ácido rho-iso-alfa, 300 gramos de una solución acuosa del ácido rho-iso-alfa al 30 % que tiene un pH de 9, se mezclaron con 21 gramos de LiOH·H₂O, que se habían mezclado previamente con 300 ml de agua desionizada. Esta suspensión se mezcló hasta la homogeneidad. Después, la suspensión se filtró a través de un embudo de Buchner para eliminar el exceso de agua, se colocó en una bandeja de secado y se secó.

Ejemplo 12: Preparación de sales de calcio de ácidos rho-iso-alfa

Para preparar la sal de calcio del ácido rho-iso-alfa, 300 gramos de una solución acuosa del ácido rho-iso-alfa al 30 % que tiene un pH de 11, se mezclaron con 37 gramos de CaCl₂·2H₂O, que habían sido mezclados previamente con 200 ml de agua desionizada. Esta suspensión se mezcló hasta la homogeneidad. Después, la suspensión se vertió directamente sobre una bandeja de secado y se secó.

Ejemplo 13: Preparación de sales de potasio de ácidos rho-iso-alfa

5 Para preparar la sal de potasio del ácido rho-iso-alfa, 300 gramos de una solución acuosa del ácido rho-iso-alfa al 30 % que tiene un pH de 10, se mezclaron con 35 gramos de K_2CO_3 que habían sido mezclados previamente con 300 ml de agua desionizada. Esta suspensión se mezcló hasta la homogeneidad. Después, la suspensión se vertió directamente sobre una bandeja de secado y se secó.

Ejemplo 14: Preparación de sales de calcio del ácido tetrahidro-iso-alfa

10 Para preparar la sal de calcio del ácido tetrahidro-iso-alfa, 1.000 gramos de una solución acuosa de ácido tetrahidro-iso-alfa al 9 % que tiene un pH de 10,5, se mezclaron con 42 gramos de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, que habían sido mezclados previamente con 100 ml de agua desionizada. Esta suspensión se mezcló hasta la homogeneidad. Después, la suspensión se filtró a través de un embudo de Buchner para eliminar el exceso de agua, se colocó en una bandeja de secado y se secó.

15 Prácticamente cualquier sal alcalina del ácido de lúpulo (por ejemplo, sodio, potasio, litio), sal de metal alcalinotérreo del ácido de lúpulo (por ejemplo, sales de magnesio, calcio), u otras sales del ácido de lúpulo se pueden utilizar en el proceso expuesto anteriormente. Como se expone en los ejemplos anteriores, la invención proporciona procesos para la producción de sales alcalinas solubles en agua o sales de metales alcalinotérreos insolubles en agua de los ácidos alfa o ácidos beta. Prácticamente cualquier ácido iso-alfa, ácido rho-iso-alfa, ácido tetrahidro-iso-alfa, ácido hexahidro-iso-alfa, ácido beta, ácido hexahidro-beta, ácido tetrahidro-beta, lupulona, colupulona, adlupulona, o derivados o combinaciones de los mismos pueden utilizarse en los procesos de la invención. En una realización, la concentración de ácidos de lúpulo presente en la solución acuosa oscila entre el 5 % y el 50 %, inclusive. En otras realizaciones, la concentración oscila entre 5-45 % (por ejemplo, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % y 20 45 %), inclusive. En otras realizaciones, el extremo inferior del intervalo es cualquier número entre 9 y 49 %; y el extremo superior del intervalo es cualquier número entre 10 y 50 %. Los ácidos de lúpulo de la etapa 4 pueden secarse para obtener sales de cualquier método convencional o combinación de métodos, incluyendo, entre otros, secado por pulverización, secado al vacío, secado en tambor, secado en molino, secado en ventana y liofilización. Preferentemente, se utiliza el secado por pulverización.

30 Los compuestos de la invención se preparan esencialmente de manera como se ha descrito previamente y en los esquemas generales. La lectura de un listado de grupos químicos en cualquier definición de una variable en el presente documento incluye las definiciones de dicha variable como cualquier grupo único o combinación de grupos enumerados. La lectura de una realización para una variable en el presente documento incluye esa realización como cualquier realización única o en combinación con cualquier otra realización o partes de la misma. Otra realización es un compuesto de cualquiera de las fórmulas en el presente documento realizadas por un proceso definido en el presente documento, incluyendo los procesos ejemplificados en los esquemas y ejemplos del presente documento. Otro aspecto de la invención es un compuesto de cualquiera de las fórmulas del presente documento para su uso como acaricida según se define en el presente documento.

Otras realizaciones

45 A partir de la descripción anterior, resultará evidente que pueden realizarse variaciones y modificaciones en la invención descrita en el presente documento para adaptarla a diversos usos y condiciones. Dichas realizaciones están asimismo dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

50 La lectura de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en el presente documento incluye las definiciones de dicha variable como cualquier elemento único o combinación (o subcombinación) de elementos enumerados. La lectura de una realización en el presente documento incluye esa realización como cualquier realización única o en combinación con cualquier otra realización o partes de la misma.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para combatir un ácaro parásito de la abeja melífera, en donde el ácaro parásito es un ácaro *Varroa*, comprendiendo el método la puesta en contacto del ácaro *Varroa* con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un 2,5 % de ácidos beta obtenidos a partir de lúpulo, controlando de este modo al ácaro *Varroa*.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la puesta en contacto con el ácaro se produce cuando el ácaro *Varroa* está en contacto con una abeja melífera.
- 15 3. Un método para tratar o prevenir una infestación por un ácaro parásito de una colmena de abejas melíferas, en el que el ácaro parásito es un ácaro *Varroa*, comprendiendo el método la puesta en contacto de la colmena con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un 2,5 % de ácidos beta obtenidos a partir de lúpulo, tratando o previniendo de este modo una infestación por un ácaro *Varroa* en una colmena de abejas melíferas.
- 20 4. El método de las reivindicaciones 1 o 3, en el que la puesta en contacto mata a los ácaros.
- 25 5. Una composición que comprende al menos un 2,5 % de ácidos beta obtenidos a partir de lúpulo, para su uso en el método de la reivindicación 1.
- 30 6. La composición para su uso de la reivindicación 5, en la que la forma se selecciona entre el grupo que consiste en un líquido, un polvo, un aceite, una emulsión, una cápsula y un vapor.
- 35 7. La composición para su uso de la reivindicación 5, en donde la composición es una composición de liberación controlada.
- 40 8. La composición para su uso de la reivindicación 7, en la que el ácido beta se libera en el transcurso de al menos 14 días, o al menos 41 días.
- 45 9. La composición para su uso de la reivindicación 7, en la que el ácido beta mantiene actividad acaricida o estabilidad durante aproximadamente al menos seis meses, nueve meses, doce meses, dieciocho meses, veinticuatro meses o treinta y seis meses.
10. Un dispositivo de administración acaricida, comprendiendo el dispositivo una composición de la reivindicación 7.
11. El dispositivo de administración acaricida de la reivindicación 10, en donde el dispositivo se selecciona entre el grupo que consiste en una tira, una tira de liberación controlada, un comprimido, un depósito, un disco polimérico, un dispositivo de evaporación, una fibra, un tubo, un bloque polimérico, una membrana, un gránulo y un microcapilar.
12. Un polvo para espolvoreo que comprende la composición de la reivindicación 7, adecuada para su administración a una colmena.
13. Una colmena que comprende la composición de la reivindicación 7.
14. Un kit para el tratamiento o la prevención de una infestación por un ácaro parásito, comprendiendo el kit una cantidad eficaz de una composición de la reivindicación 7 en una forma adecuada para su administración a un sitio de infestación.

Eficacia de los derivados de lúpulo frente a ácaros Varroa de las abejas melíferas

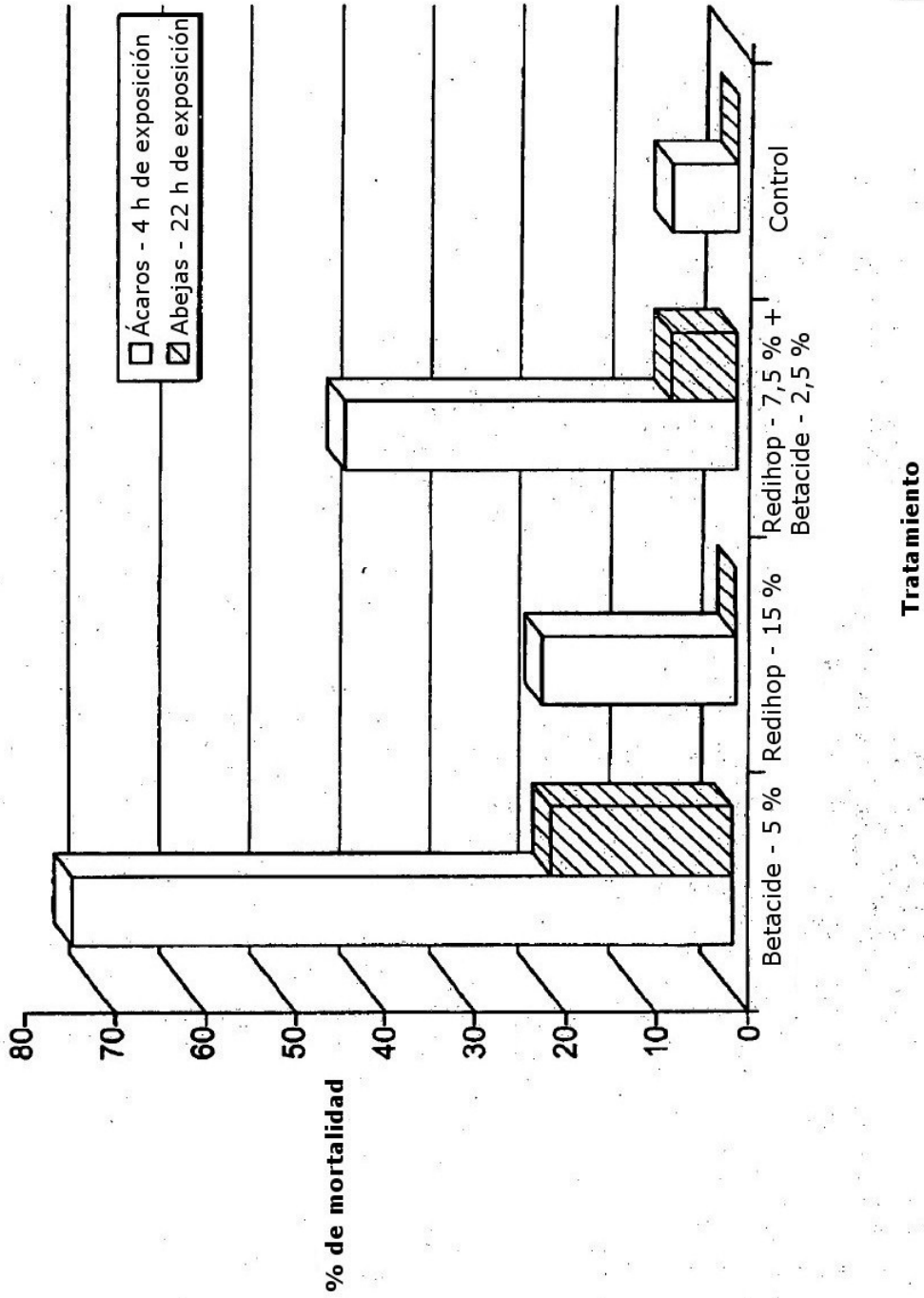


FIG. 1

Eficacia de los derivados de lúpulo frente a ácaros Varroa de las abejas melíferas

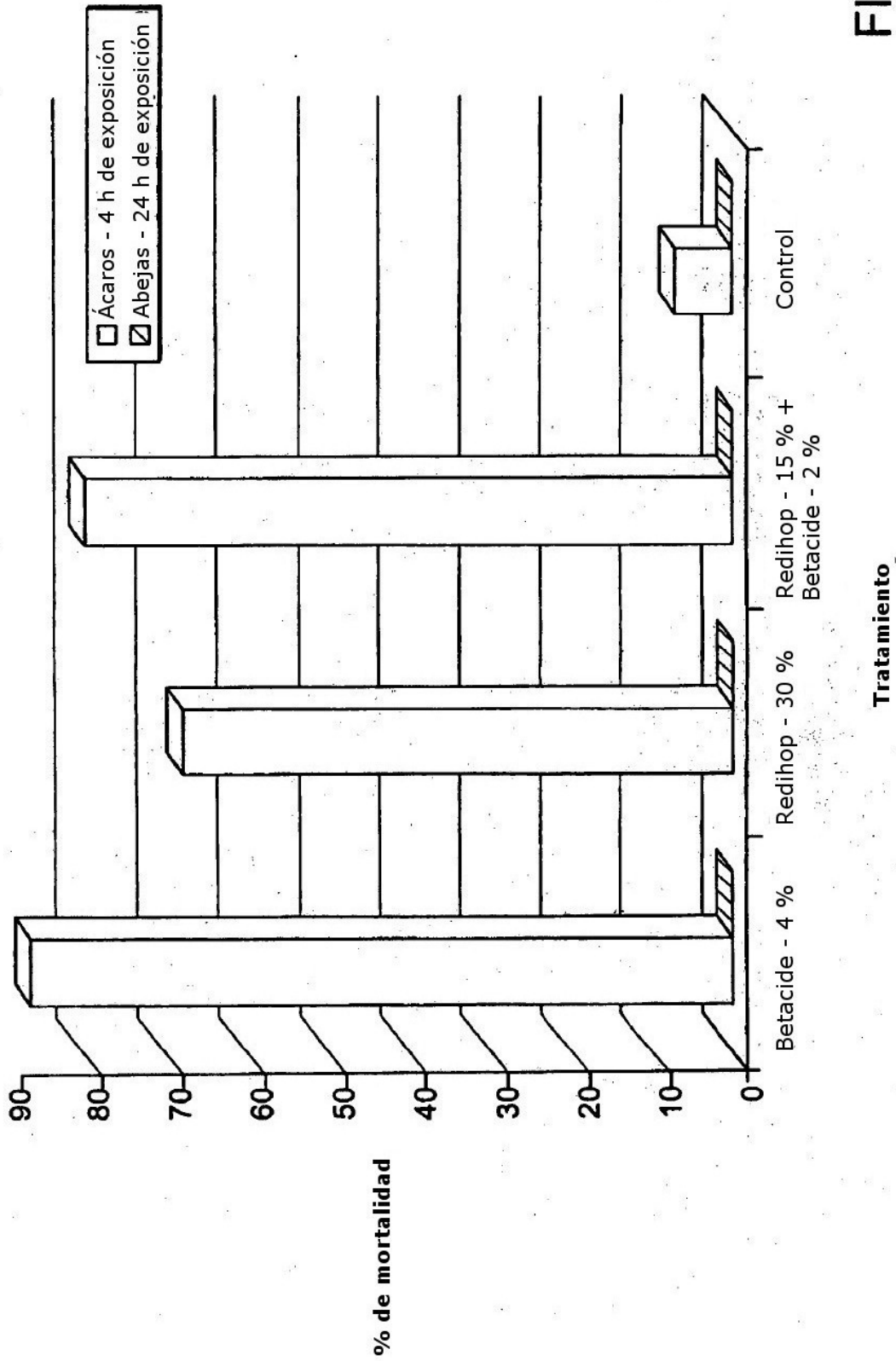


FIG. 2

Eficacia de los derivados de lúpulo frente a ácaros Varroa de las abejas melíferas

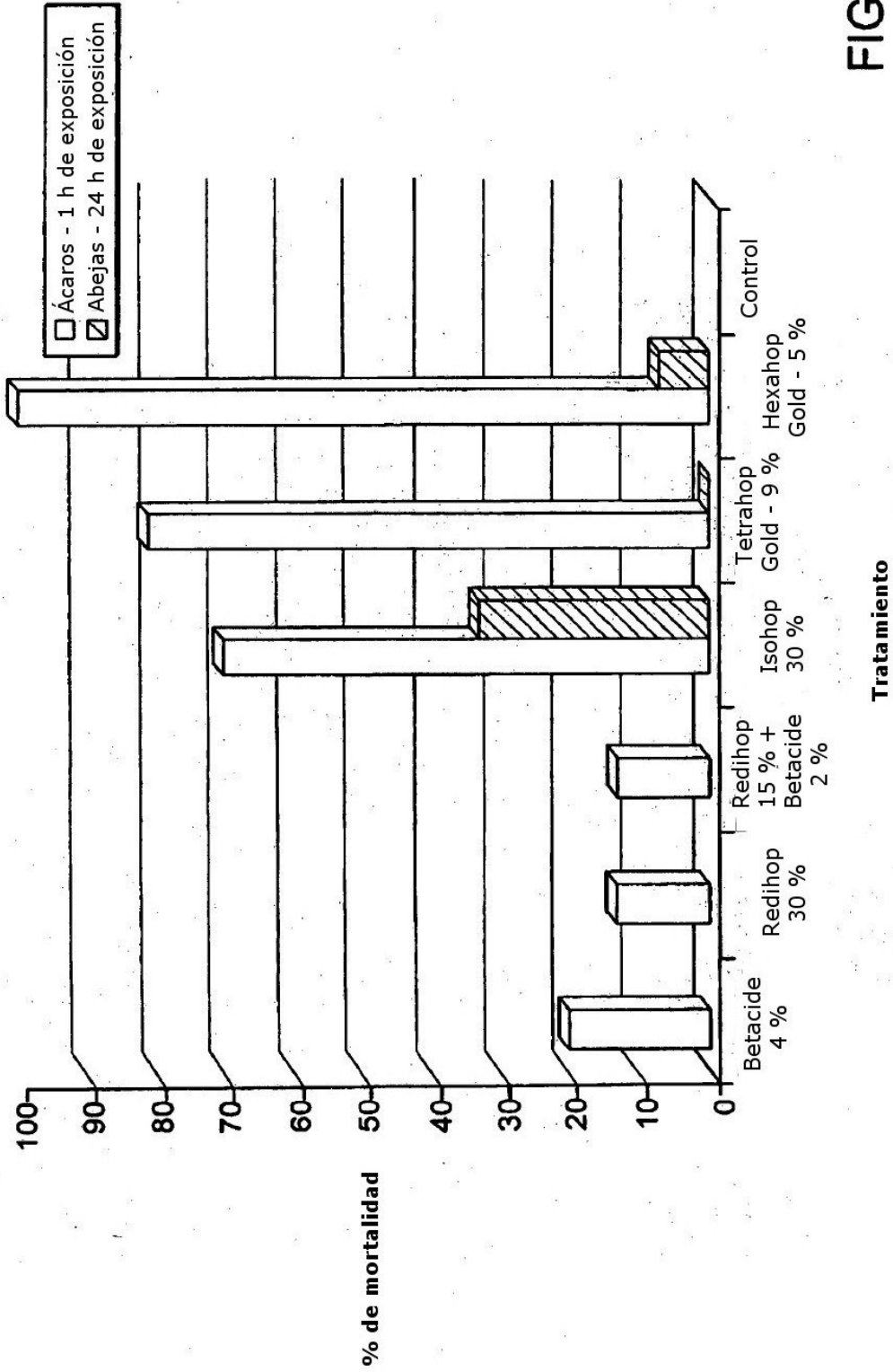


FIG. 3

Eficacia de los derivados de lúpulo frente a ácaros Varroa de las abejas melíferas

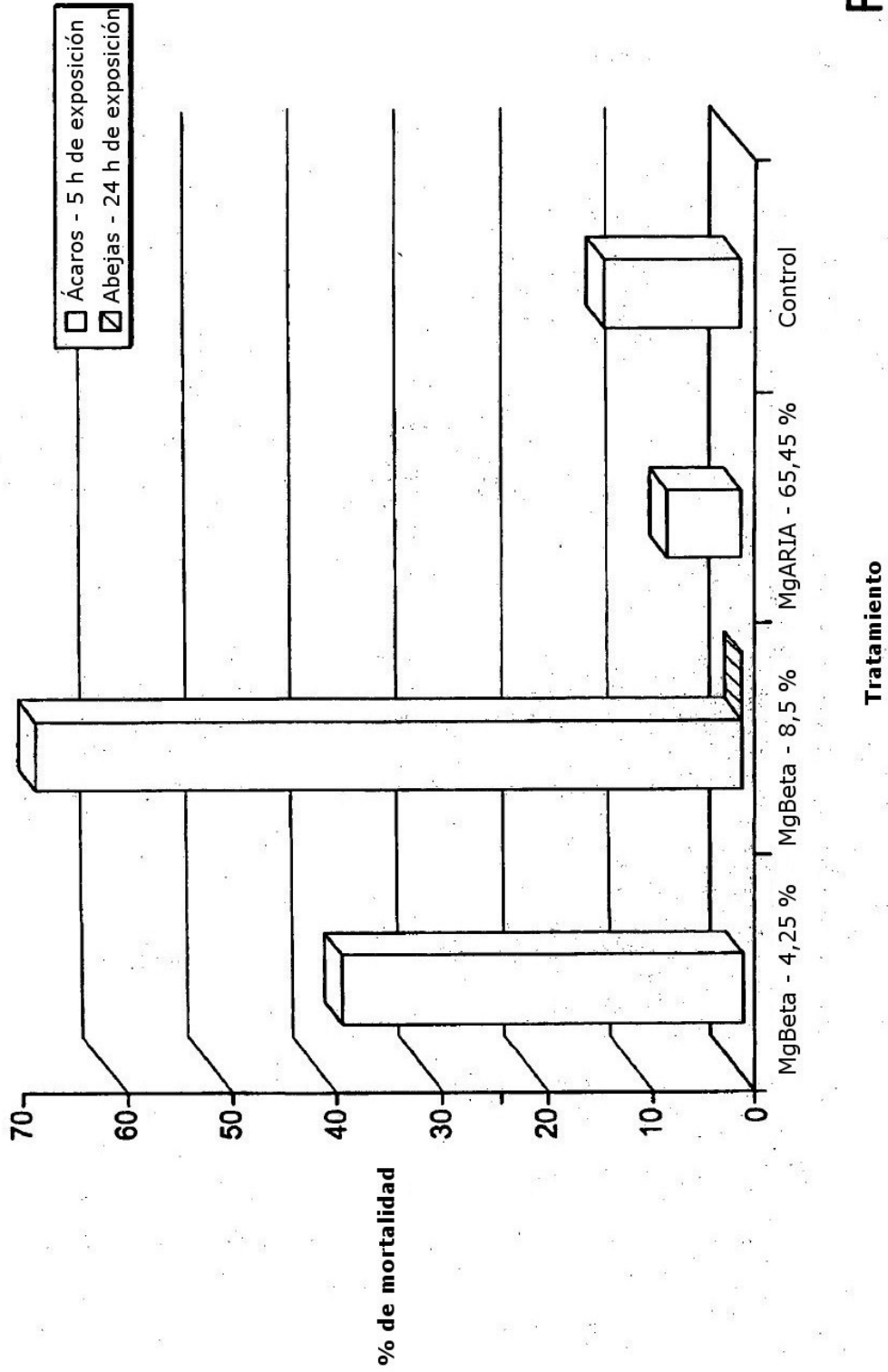


FIG. 4

Eficacia de los derivados de lúpulo frente a ácaros Varroa de las abejas melíferas

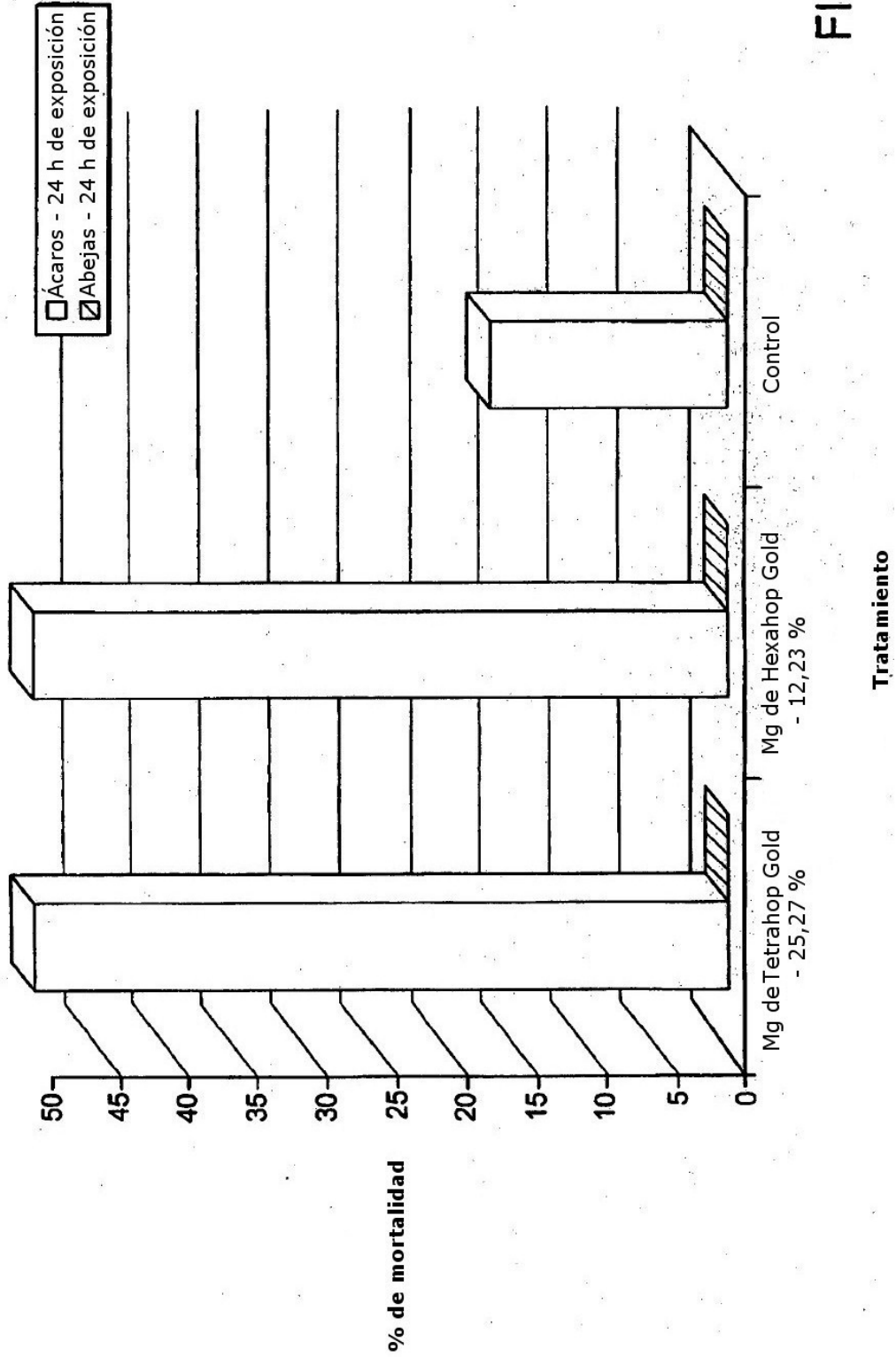


FIG. 5