



# **Efecto de productos api-sanitarios en la fisiología olfativa de *Apis mellifera***

**Andrea Carolina Sosa Labadie**

**Tesis de Maestría**

Presentada como uno de los requisitos para el título de

**Magíster**

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Marzo 2023

Montevideo, Uruguay

# **Efecto de productos api-sanitarios en la fisiología olfativa de *Apis mellifera***

## **Tribunal**

---

**Dra. Laura Fariña**

Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Química, Universidad de la República

**Dr. Ciro Invernizzi**

Sección Etología

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

**Dra. María Sol Balbuena**

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

## **Director**

---

Dr. Andrés González Ritzel

## **Co-directora**

---

Dra. Carmen Rossini Caridad

# **Efecto de productos api-sanitarios en la fisiología olfativa de *Apis mellifera***

Andrea Carolina Sosa Labadie, Mag.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2023

**Director**

---

Dr. Andrés González Ritzel

Laboratorio de Ecología Química, Departamento de Química Orgánica

Facultad de Química, Universidad de la República

**Co-directora**

---

Dra. Carmen Rossini Caridad

Laboratorio de Ecología Química, Departamento de Química Orgánica

Facultad de Química, Universidad de la República

## **RESUMEN**

---

El ácaro *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) se encuentra entre las principales causas del aumento de pérdidas de colmenas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) ocurridas en los últimos años. Hace algún tiempo, el desarrollo de formulaciones derivadas de aceites esenciales ha cobrado relevancia como alternativa a los varroacidas de síntesis tradicionalmente utilizados. Entre las

alternativas se encuentra el timol, actualmente utilizado en sanidad apícola, y los aceites esenciales (AE) de *Eupatorium buniifolium* (Asteraceae) y de *Schinus molle* (Anacardiaceae), varroacidas de potencial aplicación. Se evaluó la toxicidad en laboratorio del AE de *S. molle* sobre *A. mellifera* y *V. destructor*, obteniendo índices de seguridad que sugieren su inocuidad sobre abejas y efectividad varroacida. Para recolectar néctar y polen -proceso que media la polinización-, las abejas detectan, aprenden y recuerdan compuestos volátiles florales que utilizan como claves químicas para localizar el recurso alimenticio. En esta tesis se evaluaron los efectos subletales de los varroacidas antes mencionados sobre la olfacción periférica, y el aprendizaje y memoria olfativa de linalool, un alcohol monoterpénico común en volátiles florales, de abejas melíferas, mediante electroantenografía (EAG) y condicionamiento de la respuesta de extensión de probóscide (PER), respectivamente. En el laboratorio se estudiaron las respuestas EAG en abejas de 9/10 y 14/15 d, tras exposición crónica o temporal a timol y a AE de *E. buniifolium*; en el ensayo en colmenas se sumó como tratamiento al AE de *S. molle*, y se evaluó la respuesta EAG de abejas nodrizas (12/13 d) y abejas pecoreadoras (46/47 d). En ningún caso se observó efecto de los varroacidas sobre la olfacción periférica a linalool, al menos medida como EAG. Asimismo, la exposición crónica a timol y a AE de *E. buniifolium* en laboratorio no tuvo un efecto significativo sobre el aprendizaje o la memoria de linalool en abejas de 9/10 d. Si bien estos resultados son promisorios, se debe extender el estudio a compuestos volátiles florales de otras clases químicas. Entre estos compuestos se encuentran el nonanal, el alcohol bencílico y el 1,2,4-trimetoxibenceno, determinados mediante cromatografía gaseosa acoplada a electroantenografía (GC-EAD) como compuestos fisiológicamente relevantes de volátiles florales de cultivos como el manzano o el zapallito de tronco, ejemplos de especies dependientes de polinización entomófila.

**Palabras clave:** aceites esenciales, varroacidas, volátiles florales, electroantenografía, PER.

# Effect of api-sanitary products on the olfactory physiology of *Apis mellifera*

Andrea Carolina Sosa Labadie, Mag.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2023

**Director**

---

Dr. Andrés González Ritzel

Laboratorio de Ecología Química, Departamento de Química Orgánica

Facultad de Química, Universidad de la República

**Co-director**

---

Dra. Carmen Rossini Caridad

Laboratorio de Ecología Química, Departamento de Química Orgánica

Facultad de Química, Universidad de la República

## **ABSTRACT**

---

The ectoparasitic mite *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) is one of the main causes of the increase of losses of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) hives that have been registered in the last few years. In recent times, the development of formulations based on essential oils (EO) has gathered relevance as an alternative to the synthetic acaricides traditionally used to control this mite. Among these alternatives, thymol, currently used in bee health, and the EO from *Eupatorium buniifolium* (Asteraceae) and from *Schinus molle* (Anacardiaceae) are varroacides of

potential use. In this work we analyzed the toxicity of *S. molle* EO on *A. mellifera* and *V. destructor* in the laboratory, obtaining security indices that suggest innocuity on bees and effectiveness as varroacides. To collect nectar and pollen – process that mediates pollination – bees detect, learn, and memorize volatile floral compounds that are used as chemical keys to locate the food resource. In this thesis, the sublethal effects of the three alternative varroacides mentioned before, were evaluated on the peripheral olfaction response and on the learning and olfactive memory of linalool, a monoterpenoid alcohol common among floral volatiles. These effects were evaluated using Electroantennography (EAG) and the conditioning of the Proboscis Extension Response (PER), respectively. The EAG response was studied in the laboratory on bees of 9/10 and 14/15 days after chronic or temporal exposure to thymol and *E. buniifolium* EO; and in hives with the addition of *S. molle* EO as an additional treatment, using nurse bees (12/13 d) and forager bees (46/47d). No effect on the peripheral olfaction of linalool was observed, at least measured as EAG. In addition, the chronic exposure to thymol and *E. buniifolium* EO in the laboratory had no significant effect on the associative learning or memory of linalool on 9/10 days bees. Even though these results are promissory, the study should be extended to floral volatile compounds of other chemical classes. For instance, nonanal, benzyl alcohol and 1,2,4-trimethoxybenzene, are potential compounds to be used in future studies, as they were determined by gas chromatography coupled to electroantennography (GC-EAD) as the main physiologically-active volatile compounds emitted by flowers of apple trees and round zucchini, examples of crops with high reliance on entomophile pollination.

**Keywords:** essential oils, varroacides, flower VOCs, electroantennography, PER.

## AGRADECIMIENTOS

---

A mi familia, que me acompaña, ayuda y alienta en cada etapa de mi vida. En especial a mi madre, Mónica, quien siempre me alienta a llevar a cabo cada desafío que me propongo.

A Inés, mi amiga de la infancia, con quien compartimos los primeros años de FQ y siempre está presente.

A Bruno, por acompañarme y ayudarme diariamente.

A mis amigas, por transitar juntas el desafiante camino de dejar la ciudad de origen para estudiar.

A Andrés y Carmen, por guiarme y ayudarme a crecer académicamente.

A cada uno de los LEQuers, que siempre están para prestar una mano.

A la sub30, que además de hacer más llevaderos los largos días de ensayo en el laboratorio, se han convertido en amigos.

A Guille, por ser mi compañero “abejólogo”, proveedor de abejas y amigo.

A Ciro, Laura y Sol, por sus correcciones y aportes a esta tesis.

A cada una de las personas que me ayudaron en las actividades desarrolladas en esta tesis.

A las agencias que financiaron las becas de apoyo para mis estudios: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (beca de maestría POS\_FSA\_2019\_2\_1009135) y Comisión Académica de Posgrado (beca de finalización de maestría).

Al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por financiar un proyecto de Iniciación a la Investigación y becas de Movilidad e Intercambio Académico.

A la Sociedad Latinoamericana de Investigación en Abejas.

# TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. Abejas melíferas <i>Apis mellifera</i> .....	1
1.1. Servicio de polinización de las abejas melíferas .....	1
1.2. Biología de <i>A. mellifera</i> .....	1
2. El ácaro <i>Varroa destructor</i> .....	2
2.1. <i>Varroa destructor</i> y la pérdida de colmenas.....	2
2.2. Ciclo de vida de <i>V. destructor</i> .....	3
2.3. Control químico de la varroosis.....	4
3. Procesos olfativos en abejas melíferas .....	6
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
Objetivo general .....	11
Objetivos específicos .....	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
1. Obtención y caracterización química de AE .....	13
2. Toxicidad del AE de <i>Schinus molle</i> .....	14
3. Efecto de la exposición a varroacidas en olfacción periférica (EAG) .....	16
3.1. Exposición temporal en laboratorio .....	16
3.2. Exposición crónica en laboratorio .....	19
3.3. Exposición crónica en colmenas.....	21
4. Efecto de la exposición a varroacidas en aprendizaje y memoria olfativa (condicionamiento PER).....	23
5. Análisis de volátiles florales con actividad electrofisiológica .....	27
5.1. Colectas in vivo y caracterización química.....	27
5.2. Análisis por GC-EAD.....	29



<b>RESULTADOS y DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
1. Obtención y caracterización química de AE .....	30
2. Toxicidad del AE <i>S. molle</i> .....	34
3. Efecto de la exposición a varroacidas en olfacción periférica (EAG) .....	36
3.1. Exposición temporal en laboratorio .....	36
3.2. Exposición crónica en laboratorio .....	38
3.3. Exposición crónica en colmenas.....	41
4. Efecto de la exposición a varroacidas en aprendizaje y memoria olfativa (condicionamiento PER).....	43
5. Análisis de volátiles florales con actividad electrofisiológica .....	47
5.1. Colectas in vivo y caracterización química.....	47
5.2. Análisis por GC-EAD.....	52
<b>CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AE	Aceite esencial
AE Eb	AE de <i>Eupatorium buniifolium</i>
AE Sm	AE de <i>Schinus molle</i>
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
EAD	Detector de electroantenografía (ElectroAntennographic Detector)
EAG	Electroantenografía / Electroantenograma
EC	Estímulo condicionado
ENC	Estímulo no condicionado
FID	Detector de ionización de llama (Flame Ionization Detector)
GC	Cromatografía gaseosa (Gas Chromatography) Cromatografía gaseosa con detector de electroantenografía (Gas
GC-EAD	Chromatography - ElectroAntennographic Detector)
HR	Humedad relativa
IC <sub>95%</sub>	Intervalo de confianza (nivel de significancia de 95 %)
IRL	Índice de retención lineal
IS	Índice de seguridad
LEQ	Laboratorio de Ecología Química
MS	Espectrómetro de masas (Mass Spectrometer)
NI	No identificado
ORN	Neuronas sensoriales olfativas (Olfactory Receptor Neurons)
PA	Principio activo Respuesta de extensión de probóscide (Proboscis Extension
PER	Response)
TIC	Corriente iónica total (Total Ion Current)
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles (Volatile Organic Compounds)

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. Abejas melíferas *Apis mellifera*

### 1.1. Servicio de polinización de las abejas melíferas

Según la FAO cerca del 75% de los cultivos destinados a la alimentación mundial dependen en cierta medida de polinizadores para su producción, rendimiento y calidad [1, 2]. Entre los animales polinizadores se encuentran vertebrados, por ejemplo, murciélagos, monos, y algunas aves, entre otros; e insectos como mariposas (lepidópteros), moscas (dípteros), escarabajos (coleópteros), avispas y abejas (himenópteros) [1].

La abeja melífera occidental, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) poliniza cerca del 80 % de los cultivos alimentarios [3], por lo que posee un gran valor económico y ecológico [1, 2, 4], estimándose que su ausencia afectaría los rendimientos de algunos cultivos de importancia económica en más del 90 % [4]. A pesar de que para algunas especies de plantas las abejas melíferas no son los polinizadores más efectivos, son la principal especie manejada por el ser humano para mejorar y asegurar la polinización de muchos cultivos, debido a que su manejo es más barato y conveniente que el de abejas silvestres [4, 5]. Algunas plantaciones, como la de manzano [*Malus x domestica* Borkh (Rosaceae)] [5-8] y zapallito de tronco [*Cucurbita máxima* var. zapallito (Cucurbitaceae)] [5, 6] dependen completamente de la polinización entomófila para su producción. En Uruguay, *A. mellifera* provee el 90 y 80 % del servicio de polinización a esos cultivos, respectivamente [6]. Si bien la polinización de cultivos es la actividad económica más importante realizada por la abeja melífera [6], su valor productivo radica también en la explotación de colmenas para la producción de miel, así como para la obtención de otros productos de la colmena (jalea real, apitoxina, cera, propóleos y polen) [5, 9].

### 1.2. Biología de *A. mellifera*

En las colonias de abejas melíferas se distinguen castas reproductivas: reinas fértiles, obreras estériles y zánganos; y castas temporales dentro de la casta obrera [10]. En invierno las abejas de la casta obrera son generalistas (realizan todas las tareas) [10], pero en primavera y verano experimentan polietismo temporal, es decir que realizan distintas tareas según la edad [10-12]:

- i- Abejas limpiadoras de celdas: son abejas recientemente emergidas, con desarrollo inmaduro [10].
- ii- Nodrizas: tienen de 4 a 12 días desde la emergencia. Se mantienen sobre el nido de cría porque sus principales tareas son alimentar a las larvas y a la reina, y opercular (tapar) las celdas una vez que las larvas están próximas a cambiar a estadio de pre-pupa [10, 13].
- iii- Abejas de mediana edad: tienen de 12 a 21 días desde la emergencia y realizan tareas muy diversas, que van desde el mantenimiento de la colonia a la recepción y procesado del alimento que traen las pecoreadoras [10].
- iv- Pecoreadoras o forrajeras: son abejas de aproximadamente 21 a 35 días desde la emergencia, cuya tarea es recolectar los recursos que la colonia necesita (polen, néctar, resinas y agua) [10, 13-15].

Si bien el polietismo temporal normalmente sigue el orden descrito arriba, las edades de las transiciones de una casta temporal a otra son aproximadas, ya que se adelantan o retrasan dependiendo de las necesidades de la colmena, de factores ambientales y de la genética [10, 16-19]. Esta plasticidad también puede verse reflejada en el retorno de tareas de forrajeo a tareas internas cuando es necesario [10, 19].

## **2. El ácaro *Varroa destructor***

### **2.1. *Varroa destructor* y la pérdida de colmenas**

En los últimos años en todo el mundo han aumentado las pérdidas de colmenas de abejas melíferas [3, 20-22], las cuales han llegado a ser del 30 % en Uruguay [23, 24]. Este fenómeno se debe a interacciones entre distintos estresores; entre los principales se encuentra el ácaro ectoparásito *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) (Figura 1), que es el principal agente etiológico para *A. mellifera* en muchas regiones del mundo, en particular, en territorios de clima templado como Uruguay [3, 21]. Además de debilitar el sistema inmune de las abejas [25], entre muchos otros problemas, *V. destructor* es el principal vector de varios virus de las abejas [26, 27], los cuales transmite cuando se alimenta de sus cuerpos grasos [28]. El virus más común que transmite es el de las alas deformes, que generalmente es asintomático en ausencia del ácaro, pero causa daños graves cuando es transmitido por éste [29].



**Figura 1. (A)** *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae). **(B)** *V. destructor* parasitando abdomen de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae).

## 2.2. Ciclo de vida de *V. destructor*

El ciclo de vida de *V. destructor* se separa en dos fases: reproducción y diseminación, en las cuales parasita estadios inmaduros y abejas adultas, respectivamente [26, 30-32]. La primera, que puede darse dos o tres veces en la vida de un individuo, sucede dentro de las celdas de cría de obreras o zánganos, en la cual la hembra fundadora y su progenie femenina se alimentan de los estadios inmaduros de la abeja. Esta etapa comienza cuando una hembra fundadora (o más de una) entra a una celda de larva en las horas previas a su operculado. Aproximadamente 65 horas después de invadir la celda, la hembra fundadora ovipone un huevo haploide que dará origen a un macho, y luego cada 30 horas deposita un huevo de hembra. Las hembras que maduraron sexualmente se aparean con su hermano, el cual muere dentro de la celda. Cuando la abeja adulta emerge de su celda, la hembra fundadora y sus hijas salen de ésta, dando comienzo a la etapa de diseminación, en la cual se alimentan de abejas adultas, que además usan para transportarse hacia celdas de larvas en las cuales comenzarán nuevas fases de reproducción [26, 30-32]. Usualmente a esta etapa se le denomina “forética”, término no del todo correcto, ya que éste implica una interacción corta en la cual el huésped utiliza al hospedero únicamente con fines de diseminación y no se alimenta de éste. Sin embargo, varroa no solamente se alimenta de abejas adultas, sino que esta etapa puede durar un promedio de 7 días, lo que significa que la diseminación no es el principal objetivo de esta fase [26, 28]. Hecha la aclaración y

con el fin de simplificar la lectura, en el resto del texto la fase de diseminación será mencionada como forética.

En regiones de clima templado se deben aplicar varroacidas regularmente para evitar la muerte de colmenas [3, 32, 33], con alguna excepción en apiarios con poblaciones de abejas resistentes a *V. destructor*, como es el caso de apiarios en los departamentos del este de Uruguay [33].

### **2.3. Control químico de la varroosis**

#### 2.3.1. Acaricidas sintéticos

Debido a su conveniencia económica y facilidad de uso, los acaricidas que más se han utilizado en el mundo son los sintéticos; entre éstos se encuentran el tau-fluvalinato y la flumetrina (piretroides), el cumafós (organofosforado) y el amitraz (formamidina) [32, 34, 35]. Sin embargo, como resultado del uso intensivo [3] y sin rotación [36], y la acumulación de estos productos en la cera (debido a su lipofilidad y persistencia) [34, 35], han surgido poblaciones de ácaros resistentes [3, 37-43]. Además, el uso abusivo y la acumulación de acaricidas en la cera provocan intoxicación de las abejas [3]. Actualmente en Uruguay los productos sintéticos habilitados por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca son Flumevar® (flumetrina) y Amivar® (amitraz) [44].

#### 2.3.2. Acaricidas alternativos

La aparición de resistencia a los acaricidas sintéticos [37-43, 45] y los residuos que dejan en los productos de la colmena [46-49], entre otras razones, han generado la necesidad de encontrar alternativas a los varroacidas convencionales [35, 49, 50]. Entre estas alternativas (también conocidas como orgánicas) se encuentran productos de origen natural como los aceites esenciales (AE), y productos obtenidos por síntesis química pero derivados de productos naturales como son los compuestos individuales de los AE (por ejemplo, el timol, compuesto mayoritario del AE de tomillo [*Thymus vulgaris* (Lamiaceae)] y presente también en otros AE [49, 51], así como ácidos orgánicos como el ácido fórmico [52], ácido láctico [53] y ácido oxálico [54, 55].

Los AE son productos tecnológicos, mezclas complejas de compuestos volátiles, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, y en menor medida fenilpropanos [56-58], producidos como metabolitos secundarios de plantas aromáticas. Entre otras

funciones, estos metabolitos son producidos por las plantas como defensa contra bacterias, virus, hongos, insectos y otros herbívoros [56, 59]. Dada su naturaleza, la composición de un AE depende del órgano del cual se extrae, del estado de desarrollo de la planta, de la composición del suelo, de factores climáticos y de factores genéticos, así como también del método de extracción [49, 56, 59]. Por este motivo, para obtener AE con composiciones químicas homogéneas y asegurar su actividad biológica, es comúnmente necesario estandarizar los parámetros de cultivo de las plantas aromáticas utilizadas con estos fines [56, 58]. Entre sus ventajas respecto a los varroacidas sintéticos se encuentra la menor residualidad en los productos de la colmena, ya que los compuestos volátiles que los forman tienen una vida media corta [57, 60]. A su vez, al ser una mezcla de compuestos, las probabilidades del desarrollo de resistencia por aplicaciones repetidas es baja [32].

A lo largo de los años se ha evaluado a nivel de laboratorio el efecto de numerosos AE sobre *A. mellifera* y *V. destructor*, donde se evidenció que algunos de ellos son inocuos para abejas mientras que resultan tóxicos para los ácaros [59, 61, 62]. Entre éstos se encuentran los de dos plantas nativas de nuestra región [63, 64]: *Eupatorium buniifolium* (Asteraceae) -chirca- (Figura 2 A) [50, 65], identificado como un varroacida prometedor en trabajos previos del Laboratorio de Ecología Química (LEQ) de Facultad de Química, donde radica el trabajo aquí presentado [50], y el de *Schinus molle* (Anacardiaceae) -anacahuita- [50, 65-69] (Figura 2 B).



**Figura 2. (A)** *Eupatorium buniifolium* (Asteraceae) (Foto de María Laura Umpiérrez). **(B)** *Schinus molle* (Anacardiaceae) (Foto de Andrés González).

El timol, comúnmente utilizado en colmenas productivas [49, 70, 71], presenta una eficacia varroacida de entre el 70 y 95 % [71]. A pesar de que en Uruguay no hay

formulaciones de timol habilitadas, muchos pequeños y medianos productores uruguayos utilizan preparaciones caseras de timol en cristales, logrando una efectividad acaricida del 98 % [72]. Actualmente, en Uruguay las formulaciones derivadas de productos naturales habilitadas por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca se basan en ácido oxálico: Aluén CAP® [73] y Varroxxan [74]; ambas formulaciones logran un control efectivo de la varroosis [23].

Los AE y sus derivados no están exentos de efectos negativos sobre las abejas [75-78]. Entre éstos se encuentra el efecto que la exposición crónica a timol y a carvacrol tienen sobre el sistema nervioso central, en particular sobre la acetilcolinesterasa (AChE), enzima involucrada en el control de la neurotransmisión [75]. Rossini et al. [76] mostraron que el consumo de AE de *E. buniifolium* provoca cambios en el perfil de hidrocarburos cuticulares, compuestos involucrados en el reconocimiento social de los miembros de la colonia. En una revisión publicada por Tihelka en 2018 se pueden encontrar efectos del timol y otros varroocidas orgánicos en las abejas, así como de algunos varroocidas sintéticos [77].

A pesar de que los AE y sus componentes han sido los productos naturales más estudiados como varroocidas alternativos, las formulaciones que los incluyen son limitadas, y los estudios sobre sus potenciales efectos subletales son escasos.

### **3. Procesos olfativos en abejas melíferas**

Para localizar los recursos florales de los cuales colectan néctar y polen -proceso que media la polinización-, las abejas detectan, aprenden y recuerdan claves químicas volátiles emitidas por las flores, así como también claves visuales como los colores de flores que ofrecen recompensa, y puntos de referencia geográficos [14, 79-81]. La principal función de los volátiles emitidos por las flores es la atracción de polinizadores [82], y su aroma está constituido por el conjunto de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) sintetizados por sus diferentes órganos: pétalos, anteras (órganos sexuales masculinos, contienen el polen) y estigmas (órganos sexuales femeninos) [83]. Entre los compuestos más comúnmente presentes en volátiles florales se encuentran los monoterpenos linalool, D-limoneno, (*E*)-ocimeno, mirceno y  $\alpha$ -pineno, así como también compuestos aromáticos como el alcohol bencílico, salicilato de metilo, benzaldehído y 2-fenil etanol [82].



En abejas, como en el resto de los insectos, el proceso de olfacción comienza por la detección periférica de compuestos volátiles en neuronas sensoriales olfativas (ORN, por su sigla en inglés) cuyas dendritas están ubicadas en sensilios, estructuras sensoriales cuticulares presentes en las antenas [84-86]. Luego de que las moléculas odorantes entran al sensilio, se unen a una proteína transportadora, y el complejo odorante-transportador difunde a través de la hemolinfa de la antena hasta la dendrita de una ORN [87]. La interacción del odorante con el receptor olfativo (proteína de membrana) de la ORN provoca un impulso nervioso conducido por el axón de la ORN, que lleva la información olfativa desde la periferia hasta el lóbulo antenal, centro de procesamiento primario de la información olfativa en el cerebro de los insectos. A partir de éste, las neuronas de proyección transmiten la información a los centros olfativos superiores del cerebro, donde se dan los procesos de aprendizaje y memoria olfativa [88-90].

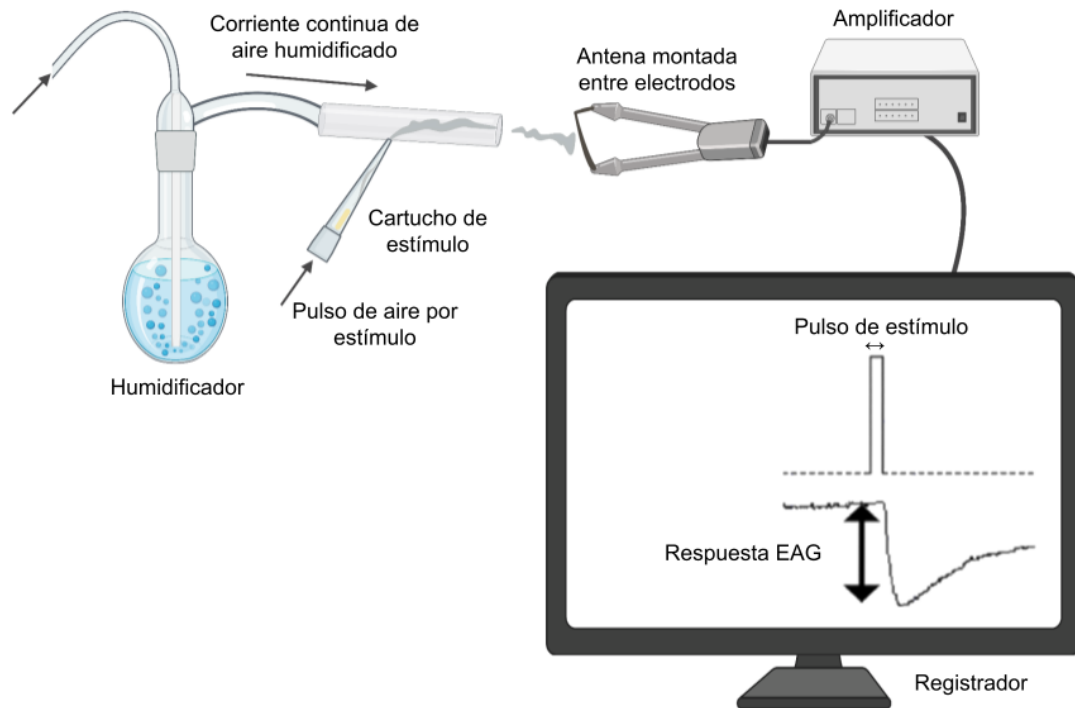
El proceso de olfacción periférica puede medirse mediante la técnica de electroantenografía (EAG) (Figura 3). En ésta se miden las variaciones de potencial entre la base y la punta de la antena de un insecto cuando es expuesta a un estímulo volátil para el cual el insecto posee receptores olfativos [84]. La amplitud de la respuesta electroantenográfica es consecuencia de la suma de despolarizaciones eléctricas de todos los ORN estimulados [84, 91]. Además, la electroantenografía puede ser acoplada a la cromatografía gaseosa (GC) (Figura 4). El GC separa químicamente una mezcla de compuestos volátiles en sus componentes individuales. Al final de la columna capilar del GC se encuentra un divisor de vidrio en forma de “Y” que divide la corriente saliente del cromatógrafo hacia los dos detectores: el detector químico usualmente es un detector de ionización de llama (FID, por su sigla en inglés), y el detector biológico es la antena del insecto, usualmente extirpada. Los compuestos separados en el GC llegan de forma simultánea a los detectores a medida que eluyen de la columna, permitiendo así individualizar qué compuestos de una mezcla son fisiológicamente activos [84, 91, 92].

Los procesos de aprendizaje y memoria olfativa de las abejas pueden ser estudiados mediante condicionamiento olfativo clásico de la respuesta de extensión de la probóscide (PER, por su sigla en inglés), en el que se simula la interacción entre una abeja y una flor en la cual se alimenta. La respuesta de extensión de probóscide es una respuesta innata de una abeja hambrienta, en la cual extiende su probóscide para

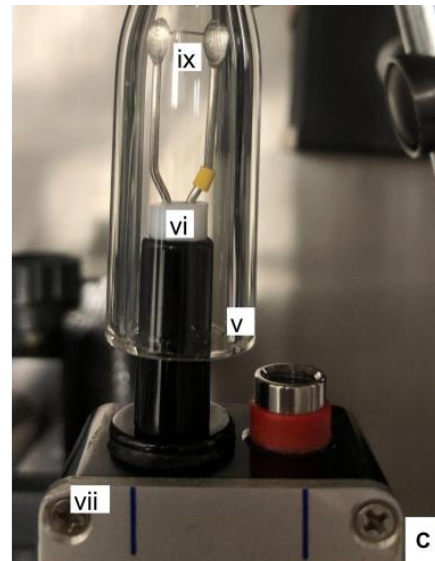
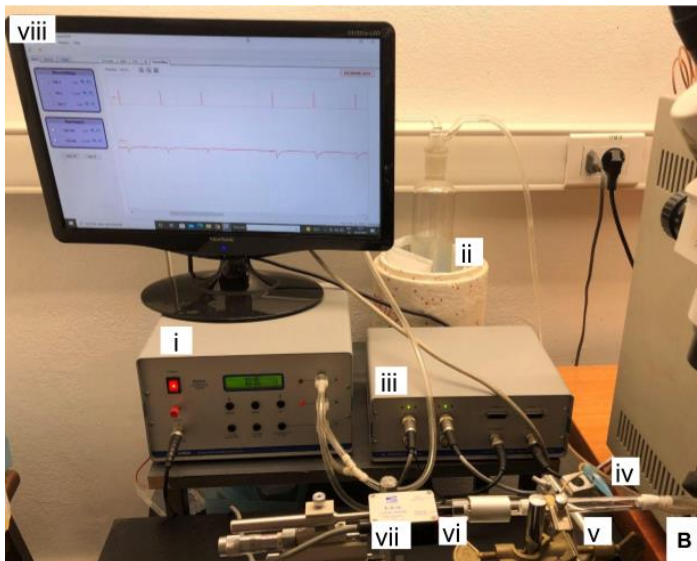
alimentarse cuando sus antenas (u otras partes del cuerpo con receptores gustativos) son estimuladas con una solución azucarada, respuesta que se aprovecha en esta metodología. En este condicionamiento la abeja aprende a asociar un estímulo neutro (estímulo condicionado -EC-), que originalmente no provoca PER, por ejemplo, un aroma floral, con una solución azucarada (estímulo no condicionado -ENC-, biológicamente significativo); por lo que luego, si está hambrienta, al ser estimulada solo con el estímulo condicionado, extenderá su probóscide [93-96].

Varios estudios han demostrado que las funciones cognitivas de las abejas melíferas se ven afectadas por exposición a dosis subletales de pesticidas agrícolas [97-103], e incluso a productos apisanitarios [101, 104-108]. Entre éstos se encuentran el tau-fluvalinato, que tras exposición tópica provoca disminución de la detección olfativa periférica en abejas [107], y el cumafós, que en combinación con el imidacloprid afecta el aprendizaje y la memoria olfativa [101]. En un trabajo en el cual se comparó el efecto de distintos acaricidas sobre la memoria olfativa de abejas melíferas, el timol no provocó pérdidas de memoria, a diferencia del ácido fórmico, tau-fluvalinato, amitraz y cumafós [105].

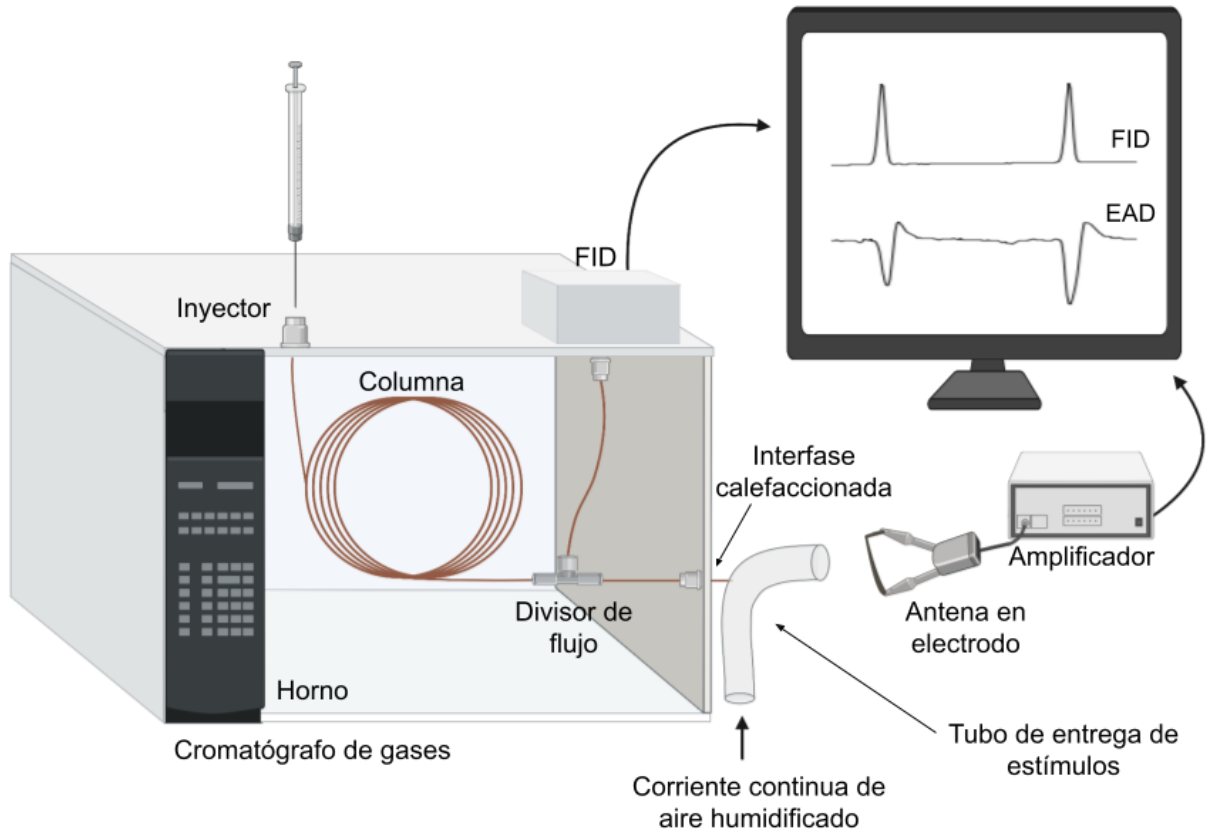
Mientras que el condicionamiento PER es una técnica ampliamente utilizada para evaluar efectos subletales de agroquímicos en el aprendizaje y la memoria de abejas [96, 109, 110], el uso de EAG para evaluar el efecto de éstos sobre la detección periférica es aún incipiente.



A



**Figura 3.** Sistema de técnica Electroantenografía (EAG). **(A)** Esquema de sistema EAG. **(B)** Sistema EAG utilizado. (i) Controlador de estímulos de aire (CS-55, Syntech). (ii) Sistema de humidificación de la corriente continua de aire. (iii) Amplificador de la señal (IDAC 2, Syntech). (iv) Cartucho de estímulo. (v) Tubo de vidrio dentro del cual se encuentra la antena y por donde se conduce la corriente de aire que arrastra el estímulo. (vi) Electrodo sonda metálicos de dos puntas. (vii) Sonda pre-amplificadora (ganancia interna x10, Syntech). (viii) Interfaz del software GC-EAD 2014 (Syntech, v. 1.2.5) en el cual se visualizan, registran y analizan las señales EAG. **(C)** (ix) Antena de *A. mellifera* extirpada y montada entre electrodos (vi).



**Figura 4.** Esquema de Cromatógrafo de Gases (GC) con detector de ionización de llama (FID) acoplado a detector de electroantenografía (EAD).

## OBJETIVOS

---

En los últimos años el uso de AE y sus componentes para controlar al ácaro *Varroa destructor* ha cobrado relevancia como una alternativa a los varroacidas de síntesis. La necesidad de buscar alternativas surgió, entre otros motivos, por la aparición de poblaciones de ácaros resistentes a estos últimos, causada por su uso intensivo y abusivo, y por sus efectos subletales sobre las abejas.

En este marco, en esta tesis se evaluaron los efectos subletales de timol, producto utilizado en sanidad apícola, y los AE de *Eupatorium buniifolium* (Asteraceae) y de *Schinus molle* (Anacardiaceae), varroacidas de potencial aplicación, sobre la detección periférica de volátiles florales como primer paso del proceso de olfacción; y sobre el aprendizaje y memoria de estos volátiles, mediante electroantenografía (EAG) y condicionamiento de la respuesta de extensión de probóscide (PER), respectivamente. Estos procesos sensoriales y cognitivos son complementarios y están implicados en la localización de fuentes alimenticias a través de claves volátiles emitidas por las flores.

### Objetivo general

Evaluar efectos subletales de varroacidas derivados de productos naturales sobre capacidades olfativas y cognitivas de *Apis mellifera*.

### Objetivos específicos

1. Obtener y tipificar químicamente aceites esenciales de conocida actividad contra *V. destructor*.
2. Estudiar la actividad del AE de *S. molle* contra *A. mellifera* y *V. destructor* en laboratorio.
3. Estudiar mediante EAG el efecto de la exposición a varroacidas derivados de productos naturales sobre la respuesta periférica a compuestos presentes en volátiles florales.
4. Evaluar mediante condicionamiento PER el efecto de la exposición a varroacidas derivados de productos naturales sobre la capacidad de aprendizaje y memoria olfativa de la abeja a compuestos presentes en volátiles florales.

5. Colectar y tipificar químicamente volátiles florales de *Malus x domestica* (manzano) y *Cucurbita maxima* var. zapallito (zapallito de tronco) para ser utilizados en experimentos de GC-EAD con la finalidad de identificar compuestos de distintas clases químicas que generan actividad electrofisiológica en antenas de abejas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. Obtención y caracterización química de AE

Para el ensayo de toxicidad en laboratorio y de exposición en campo se colectó material vegetal de *Eupatorium buniifolium* y *Schinus molle* en el área metropolitana de Montevideo en noviembre de 2021 y marzo de 2022. Luego de obtener los AE, y previo a la caracterización química, se combinaron los AE obtenidos en las dos fechas para cada especie. Para los ensayos de laboratorio se utilizó una partida de AE de *E. buniifolium* disponible en el LEQ, destilada en 2016.

Todos los AE fueron obtenidos mediante destilación por arrastre con vapor de agua (destilador EYSSERIC, conformado por un alambique de 200 L conectado a un contenedor de material vegetal de 50 L) [111] en el Laboratorio de Fitoquímica y Productos Bioactivos de INIA Las Brujas.

Los análisis se llevaron a cabo usando un cromatógrafo de gases (GC) Shimadzu 2010 acoplado a un espectrómetro de masas (MS) Shimadzu QP2010 Plus con potencial de ionización de 70 eV y un rango de escaneo de 30 a 350 m/z, utilizando Helio como gas portador a 1 mL/min. Para todas las caracterizaciones químicas se inyectó 1 µL de una solución 10 mg/mL del AE en hexano, en modalidad *split* (30:1). Los análisis se realizaron utilizando dos columnas capilares de diferente polaridad [una columna no polar semi-estándar (Rtx-5MS de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Restek) y una columna polar (Stabilwax de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Restek)]. En la primera columna el programa de temperatura utilizado comenzó en 40 °C (1 min), aumentó hasta 240 °C a 5 °C/min, y luego a 10 °C/min hasta 280 °C (5 min). Las temperaturas del inyector e interfase fueron 250 y 300 °C, respectivamente. Para la columna polar el programa de temperatura se mantuvo durante 2 minutos a 40 °C, y luego se incrementó a 5 °C /min hasta 240 °C, temperatura en la cual se mantuvo durante 5 min, la temperatura del inyector y de la interfase fueron de 250 °C.

Los compuestos individuales se identificaron por comparación de sus patrones de fragmentación con los disponibles en bases de datos de espectros de masas [NIST 08, NIST 17 [112] y Adams 2205 [113]] y por comparación de sus índices de retención lineales (IRL) con los disponibles en las bibliotecas NIST 17 [112] y Adams 2205 [113]. Para esto, se inyectó en las mismas condiciones que las muestras y en el mismo

equipo una solución de una serie de n-alcenos incluyendo alcanos pares (de 8 a 32 carbonos) y n-nonadecano. Para calcular los IRL se utilizó la fórmula planteada por Van den Dool y Kratz [114]:

$$IRL_{\text{calc}x} = 100 * N + 100 * n * \left( \frac{tR(x) - tR(N)}{tR(N+n) - tR(N)} \right)$$

**$IRL_{\text{calc}x}$** : índice de retención calculado para el compuesto x

**$N$** : número de átomos de carbono del hidrocarburo con tiempo de retención  $tR(N)$  inmediatamente anterior al tiempo de retención de x

**$n$** : diferencia en números de átomos de carbono de los hidrocarburos entre los que eluye el compuesto x

**$tR(x)$** : tiempo de retención del compuesto x

**$tR(N)$ ,  $tR(N+n)$** : tiempos de retención de los hidrocarburos inmediatos entre los que eluye x

Para cada AE se identificaron los compuestos cuya área consistió en al menos 0.1 % de la corriente iónica total (TIC).

## 2. Toxicidad del AE de *Schinus molle*

Se estudió la toxicidad del AE de *S. molle* por exposición completa (tópica, oral y fumigante) [115] en placas de Petri de vidrio sobre abejas nodrizas y varroas foréticas (en ambos casos de edad desconocida) provenientes de un apiario experimental de la Estación Experimental “Dr. Alberto Boerger”, INIA La Estanzuela (34.20 ° S, 57.41 ° O). Para obtener las varroas se sacudieron cuadros cubiertos de abejas sobre un embudo especial cuya punta se encontraba en un frasco de plástico de boca ancha (Figura 5 A) al que se agregó azúcar impalpable y se tapó con una tapa de malla. Luego se sacudió el frasco durante 5 minutos para provocar que las varroas se desprendieran de las abejas que estaban parasitando, y el azúcar conteniéndolas se separó de las abejas adjuntando otro frasco de plástico e invirtiendo el primero (Figura 5 B). Las varroas se transportaron al laboratorio sin azúcar. Entre las tareas que realizan las abejas nodrizas se encuentra la alimentación de las larvas [10], por lo que dichas abejas se obtuvieron al sacudir cuadros de “cría abierta” (larvas) cubiertos de abejas sobre una lona (Figura 5 C).



En la base de una placa de Petri de vidrio (9 cm de diámetro x 1.5 cm de altura) se colocó 1 mL de hexano (disolvente) o de la solución de AE (1.7, 2.8, 5.6 y 11.3  $\mu\text{L/mL}$ ; densidad del AE: 0.879 g/mL). Se dejó evaporar el solvente durante 5 minutos, obteniendo de esta manera 4 dosis de AE: 16, 26, 52 y 104  $\mu\text{g/cm}^3$  expresadas en masa de AE por volumen de la placa de Petri. A continuación, en cada placa se colocaron 6 varroas, 10 abejas y un trozo de caramelo (Apiarios Martínez SRL) de aproximadamente 3 g, envuelto inferior y lateralmente en papel aluminio de forma de disminuir la superficie de contacto y el esparcimiento de caramelo humedecido, el cual puede atrapar a las varroas (Figura 5 D). Las placas se sellaron con silicona y se conservaron en incubadora a 32 °C, 60 % de humedad relativa (HR) y oscuridad. Se controló la mortalidad a las 24 y 48 horas, calculando así las dosis letales 50 ( $\text{DL}_{50}$ ) utilizando Análisis de Probit en el software estadístico Minitab (v. 20.4).



**Figura 5.** Ensayo de toxicidad. **(A)** y **(B)** Obtención de varroas foréticas. **(A)** Sacudido de un cuadro con abejas sobre un embudo para obtener abejas adultas parasitadas por varroas en un frasco. **(B)** Método del frasco con azúcar impalpable para desprender varroas de las abejas. En el compartimiento superior se encuentran las abejas y en el de abajo, el azúcar impalpable y las varroas, que cayeron a través de la malla luego de invertir el frasco. **(C)** Sacudido de cuadro de cría abierta para obtener abejas nodrizas. **(D)** Sistema de exposición completa para evaluar la toxicidad del AE de *S. malleus*.

### 3. Efecto de la exposición a varroacidas en olfacción periférica (EAG)

#### 3.1. Exposición temporal en laboratorio

Se llevaron al laboratorio cuadros con abejas próximas a emerger, provenientes de un apiario comercial ubicado en Sauce-Canelones (34.67 ° S, 56.04 ° O) y se mantuvieron en incubadora a  $30 \pm 1$  °C,  $55 \pm 5$  % humedad relativa (HR) y oscuridad total. Al día siguiente, se hizo un pool con las abejas recientemente emergidas y se pusieron 120 individuos en cajas de plástico (11 x 8 x 9.5 cm) con pequeños orificios en dos de sus caras para permitir ventilación (Figura 6). Se les suministró *ad libitum* jarabe 16 % m/m (azúcar de mesa en agua destilada) y polen corbicular (Apiarios Martínez SRL) pulverizado y humectado (9:1, polen-agua destilada). Las cajas de confinamiento y los sistemas de exposición a los tratamientos se mantuvieron en iguales condiciones que los cuadros con cría.



**Figura 6.** Cajas de confinamiento de abejas, en las cuales se les brinda polen como fuente de proteínas y jarabe de azúcar de mesa como fuente de carbohidratos.

Se aplicaron 3 tratamientos: control (vehículo), timol y AE de *E. buniifolium* (obtenido en 2016). El vehículo para aplicar los tratamientos fue una emulsión agua - aceite de Ricino 5 % m/m. Se prepararon tiras de cartón de 3 x 8 x 0.15 cm colocando 2.2 mL de la emulsión correspondiente, de forma de aplicar una dosis de 25 mg de principio activo (PA) por cartón. Se dejaron reposar a temperatura ambiente, y

aproximadamente 18 horas después, se armaron los sistemas de exposición a los vapores [115] utilizando dos bases de placa de Petri de plástico (9 cm de diámetro x 1 cm de altura), separadas por una tapa con pequeñas perforaciones que permitió el intercambio gaseoso entre ambos compartimentos. En el compartimento superior se colocaron 15 abejas y un fragmento de caramelo sólido, y en el inferior una tira de tratamiento (Figura 7).

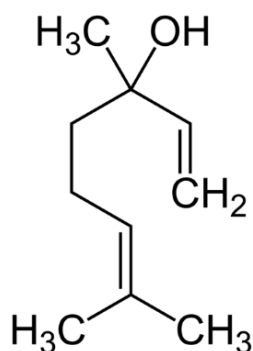


**Figura 7.** Sistema de dos compartimentos para exposición temporal (24 h) de *A. mellifera* a vapores los tratamientos.

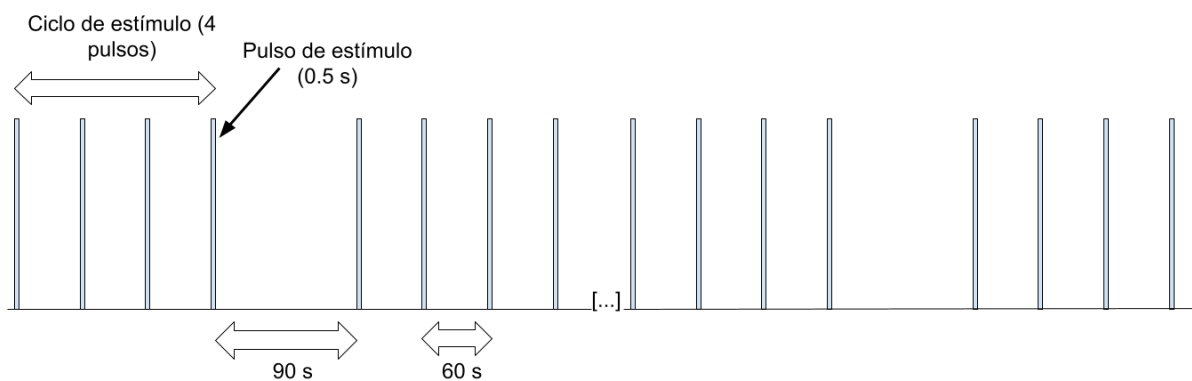
El sistema utilizado en la técnica de electroantenografía (EAG) se muestra en la Figura 3 B. A la abeja anestesiada en baño de hielo se le cortó una porción del último flagelómero de la antena derecha, la cual se extirpó en la base del escapo usando tijeras microquirúrgicas. La antena se colocó entre dos electrodos sonda metálicos (Figura 3 C) mediante uso de gel de electrocardiograma inoloro (Electro-gel, Telic SA) que logra la conducción y prolonga la viabilidad de la antena [84, 116]. Para evitar la desecación de la antena durante todo el tiempo de registro se suministró una corriente continua de aire (450 mL/min) humidificado mediante barboteo en agua destilada [84]. Como estímulo se utilizó un estándar de linalool (Katyani Exports, calidad GC $\geq$  99.5 %), un alcohol monoterpénico común en volátiles florales (Figura 8) [82, 85] (producido por flores del 70 % de las familias de plantas con semilla [82]) y con conocida actividad electroantenográfica en abejas [79, 107, 117-119]. Los cartuchos utilizados para la liberación del estímulo sobre las antenas se prepararon inmediatamente antes del registro EAG en cada antena. Los mismos constaron de un papel de filtro de 1 x 1 cm

embebido en solución de prueba, contenido en un tip de plástico de pipeta automática de 1000  $\mu\text{L}$ . Para su preparación se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de solución (0.1, 1, 5, 10 y 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en el papel. Luego de permitir la evaporación del solvente (hexano) durante 30 s, se cerró el tip con parafilm hasta su uso.

Se realizaron los estudios en individuos de 9/10 y 14/15 días de edad, expuestos a los vapores de los acaricidas durante al menos 24 horas previo al registro EAG. Se hicieron curvas dosis-respuesta de la respuesta EAG para determinar el posible efecto en la detección de diferentes dosis del estímulo. Las dosis estudiadas fueron suministradas en nivel creciente sobre la misma antena para evitar la saturación de los receptores olfativos. Para cada nivel de la curva se hicieron ciclos de 4 pulsos de 0.5 s, con 60 s entre pulsos; entre cada ciclo transcurrieron 90 s (Figura 9). Antes y después de la serie del estímulo se presentó un cartucho control (solvente aplicado en el papel). Los pulsos de aire (275 mL/min) pasados por los cartuchos de estímulo y la corriente continua de aire se suministraron y controlaron mediante un controlador de estímulos de aire CS-55 (Syntech). Los registros y análisis se realizaron en el Software GC-EAD 2014 (Syntech, v. 1.2.5). La respuesta EAG normalizada se calculó como el promedio de las señales 2 a 4 de un ciclo, restando el promedio de la respuesta al control que se registró al inicio y al final de la serie de medidas. Para considerar la disminución de la sensibilidad de la antena en el tiempo y descartar antenas en malas condiciones, en el análisis estadístico solo se incluyeron antenas cuyas respuestas al control no disminuyeron más que un 50 % entre el inicio y el final de las medidas. El efecto del tratamiento sobre las señales electroantenográficas se estudió utilizando ANOVA Split plot en SPSS Statistics (IBM, v. 27.0) siendo el tratamiento el factor inter-sujeto y la dosis de estímulo el factor intra-sujeto; cada antena constituyó una réplica.



**Figura 8.** Estructura química del alcohol monoterpénico linalool.



**Figura 9.** Diseño de la serie de estímulos brindada a una antena en el estudio del efecto de la exposición temporal (24 horas) de abejas al AE de *E. buniifolium* y a timol, sobre la detección periférica a linalool. Para cada nivel de la curva se hicieron ciclos de 4 pulsos de 0.5 s, con 60 s entre pulsos; entre cada ciclo transcurrieron 90 s.

### 3.2. Exposición crónica en laboratorio

Se llevaron al laboratorio cuadros de distintas colmenas provenientes de un apiario comercial ubicado en Santa Rosa, Canelones (34.32 ° S, 55.57 ° O). Las abejas estaban próximas a la emergencia y se dejaron en incubadora a  $32 \pm 1$  °C,  $60 \pm 5$  % HR y oscuridad total. Al día siguiente se pusieron 150 a 180 abejas en las cajas de confinamiento descritas en 3.1 (Figura 6). Se les suministró *ad libitum* jarabe 30 % m/m y polen corbicular (Apiarios Martínez SRL) pulverizado, humectado (9:1, polen-agua destilada) y expuesto a lámpara UV a 254 nm durante 1 h para disminuir la carga patogénica. Las cajas se mantuvieron en iguales condiciones que los cuadros con cría.

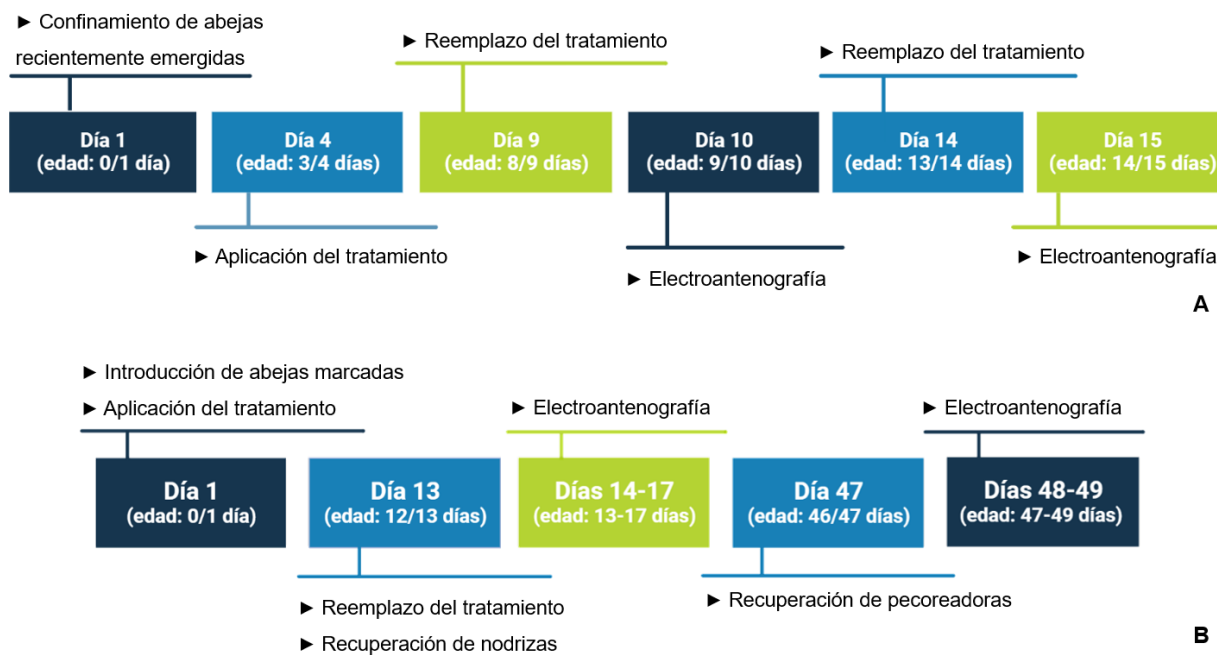
El experimento se realizó por exposición completa en las cajas de confinamiento antes mencionadas, aplicando los tratamientos: AE de *E. buniifolium* (destilado en 2016), timol o control, embebidos en tiras de cartón que se colocaron en el piso de éstas (Figura 10). Esta forma de aplicación permitió que las abejas además de estar expuestas a los vapores varroacidas liberados, pudiesen tener exposición tópica al entrar en contacto con las tiras u oral en caso de roerlas. En cada caja se colocaron dos tiras de 7 x 3 x 0.15 cm, que media hora antes de la introducción se embebieron con 1.5 mL de emulsión tratante (vehículo descrito en 3.1). De esta forma, en cada caja se logró una concentración de 0.08 y 0.07 mg/cm<sup>3</sup> (volumen de la caja de confinamiento: 836 cm<sup>3</sup>) para AE y timol, respectivamente. La primera aplicación se realizó cuando las abejas tenían 3/4 días de edad, y se reemplazaron las tiras a los

8/9 y 13/14 días de edad. La cronología del ensayo se esquematiza en la figura 11 A. Dado que las cajas de confinamiento permiten el intercambio de aire con el ambiente y los principios activos son volátiles, se colocaron las cajas de cada tratamiento en distintos estantes de la incubadora, de forma de disminuir la posible contaminación cruzada de los componentes volátiles; posicionado el control (C2) en el estante inferior. Además, se realizó otro control (C1) en una incubadora separada, de manera de verificar si el control interno (C2) podía ser afectado por los vapores varroacidas.

Cuando las abejas alcanzaron 9/10 y 14/15 días de edad se estudió la respuesta EAG a 3 dosis de linalool: 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}$ , brindadas en orden creciente. La preparación y montado de las antenas para EAG, así como la preparación de los cartuchos de estímulo y control fueron realizadas de igual manera que en el punto anterior (3.1), con la excepción de que el solvente utilizado fue etanol, el cual se dejó evaporar durante 2 minutos. Para disminuir el tiempo de registro en cada antena respecto al ensayo 3.1, tanto los controles como los estímulos se aplicaron en ciclos de 3 pulsos de 0.5 segundos separados por 60 segundos, con 75 segundos entre los ciclos. El descarte de antenas en malas condiciones y la normalización de la respuesta EAG a una dosis de estímulo se realizó utilizando el mismo criterio que en 3.1, con la salvedad de que la respuesta al estímulo se calculó como el promedio de las señales al segundo y tercer pulso del ciclo.



**Figura 10.** Sistema de exposición crónica en laboratorio. Cajas de confinamiento de abejas con tiras embebidas en la emulsión de tratamiento en el piso.



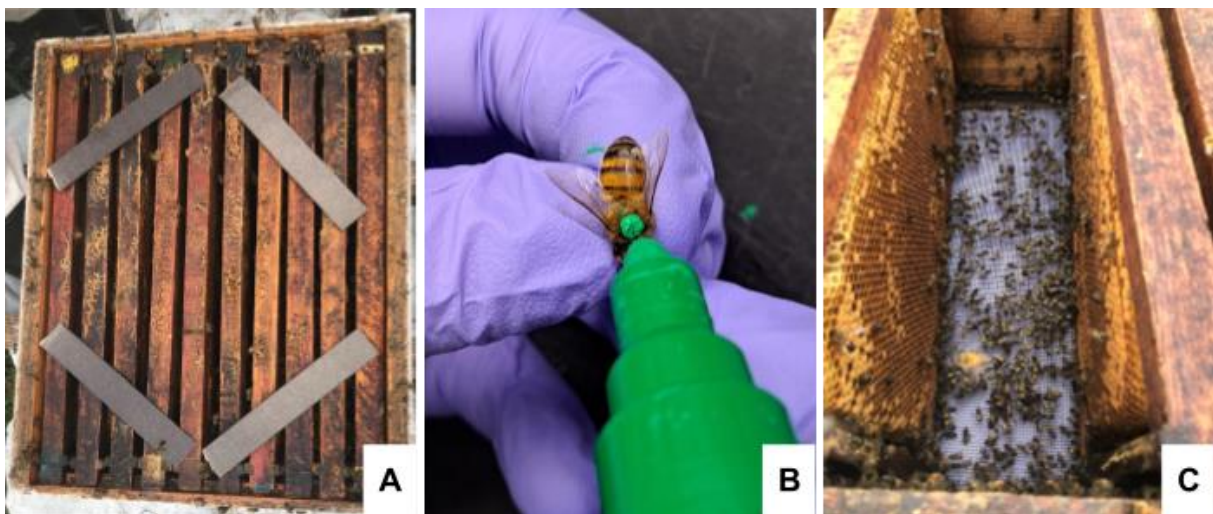
**Figura 11.** Cronología de ensayos de exposición crónica a varroacidas en laboratorio **(A)** y en colmenas **(B)**.

### 3.3. Exposición crónica en colmenas

Siguiendo la cronología de la figura 11 B, se estudió el efecto de 4 tratamientos: AE de *E. buniifolium*, AE de *S. molle*, timol y control de vehículo. Los tratamientos se aplicaron en cuatro tiras de cartón de 20 x 3.3 x 0.15 cm, embebidas en emulsión de principio activo (PA) (PA/aceite comestible de soja/alcohol etílico 3.6:3:1), las cuales se colocaron sobre los cabezales de la cámara de cría en disposición romboidal (Figura 12 A). La dosis para los tres principios activos se eligió para asemejar la aplicación de timol realizada por apicultores uruguayos [72]. Para preparar las tiras se mezcló el PA correspondiente con aceite de soja, agitando y calentando (75 °C, 15 minutos). Luego de apagar el calentamiento se agregó alcohol etílico, agitando durante 30 minutos. Las tiras se dejaron embeber en la emulsión durante 24 h y se conservaron a -20 °C hasta su uso. En las colmenas control se colocaron tiras de control de vehículo, que se prepararon de igual forma que las anteriores sin agregado de PA.

Se utilizaron ocho colmenas Langstroth (2 por tratamiento) de un apiario experimental de la Estación Experimental “Dr. Alberto Boerger”, INIA La Estanzuela. Abejas recientemente emergidas (0/1 día de edad), obtenidas de múltiples colmenas del apiario, se pintaron utilizando marcadores POSCA (Uni Mitsubishi Pencil, UK) (Figura

12 B). En el día denominado como 1 se introdujeron aproximadamente 250 abejas marcadas en cada colmena, y se introdujeron las tiras de tratamiento las cuales se reemplazaron en el día 12. Por colmena se suministraron 7.7 g de AE en cada aplicación, y de timol se aplicaron 7.4 g en la primera aplicación y 7.9 g en la segunda. En los días 13 y 47, se recuperaron abejas marcadas dentro de las colmenas (Figura 12 C), las cuales se colocaron en grupos de aproximadamente 120 individuos en las cajas mencionadas en el apartado 3.1 (Figura 6). Éstas se transportaron en incubadora portátil, proporcionando caramelo sólido. Una vez en el laboratorio, se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación y alimentación que en 3.2.



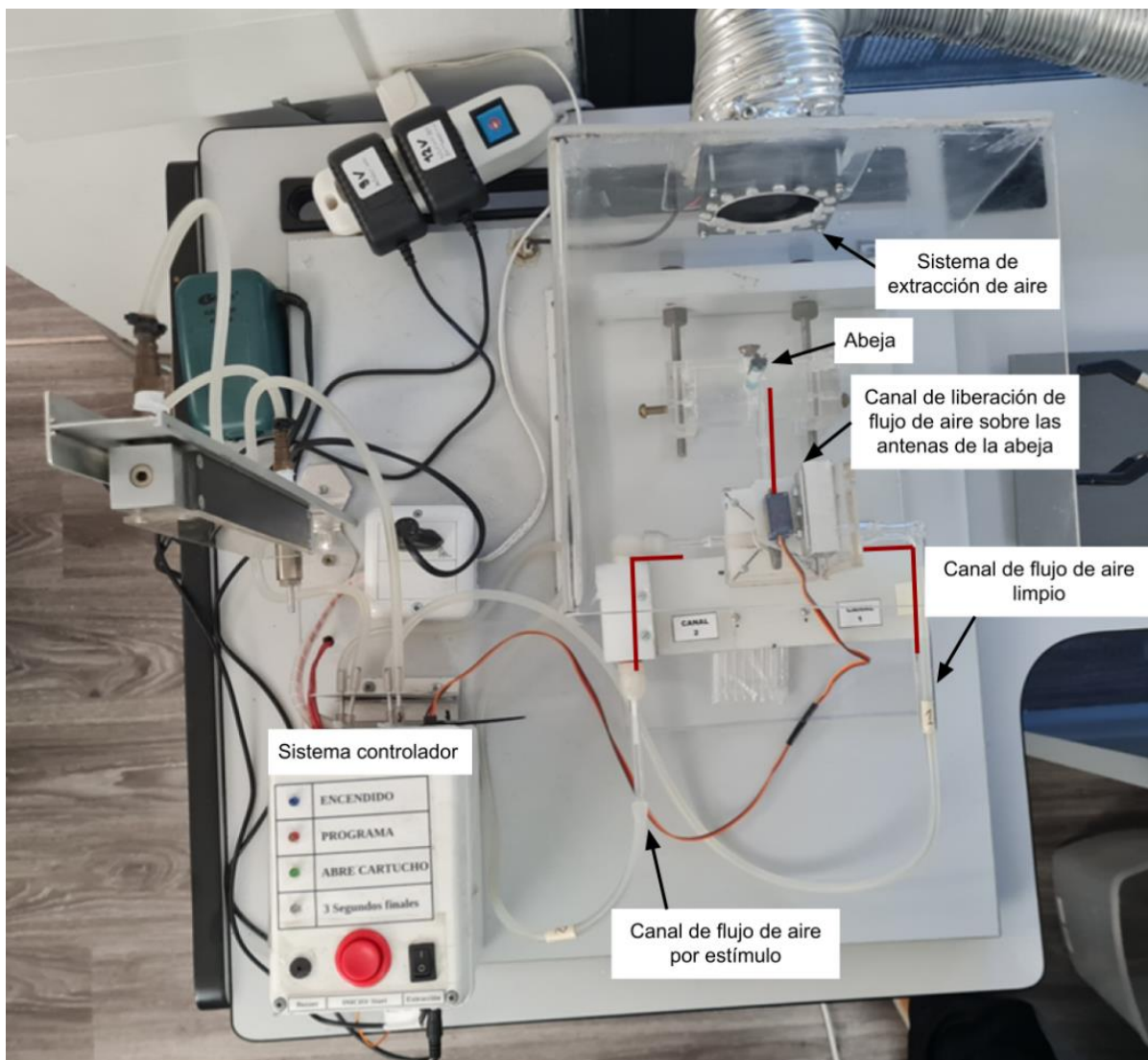
**Figura 12.** Ensayo de exposición en colmenas. **(A)** Tiras de tratamiento sobre los cabezales de la cámara de cría. **(B)** Marcado de tórax de abeja con marcador. **(C)** Recuperación de abejas marcadas dentro de la colmena.

La respuesta EAG se estudió en abejas nodrizas y en forrajeras, en los días siguientes a las recuperaciones. Se suministraron como estímulo 10, 50, 100 y 1000  $\mu\text{g}$  de linalool. La preparación de las antenas y de los cartuchos de estímulo, así como el descarte de antenas en malas condiciones, se hizo de igual forma que en 3.1. La exposición al estímulo y el cálculo de la respuesta normalizada se realizó de igual forma que en 3.2.



#### 4. Efecto de la exposición a varroacidas en aprendizaje y memoria olfativa (condicionamiento PER)

Se evaluó mediante la técnica de condicionamiento de la respuesta de extensión de probóscide (PER) la capacidad de aprendizaje y memoria de abejas de 9/10 días expuestas de forma crónica a timol o AE de *E. buniifolium*, utilizando un dispositivo de liberación automatizada del estímulo volátil (EC) (Figura 13). La optimización de la técnica se llevó a cabo en el marco del posgrado de Guillermo Bragunde, otro estudiante del LEQ.



**Figura 13.** Dispositivo de liberación automatizada del estímulo volátil para realizar condicionamiento PER (foto cedida por Guillermo Bragunde).

Se armaron cajas de confinamiento con aproximadamente 200 abejas de igual manera que en las secciones anteriores. A los individuos se les alimentó *ad libitum* con jarabe 30 % m/m y polen ensilado en forma de pasta. El polen provino de las mismas

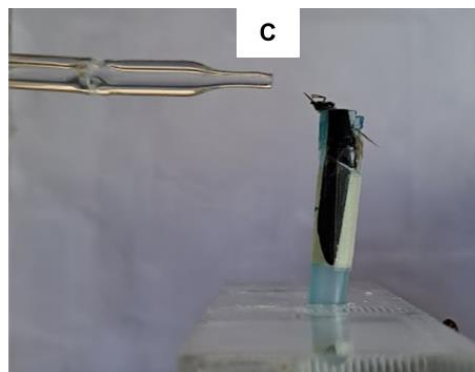
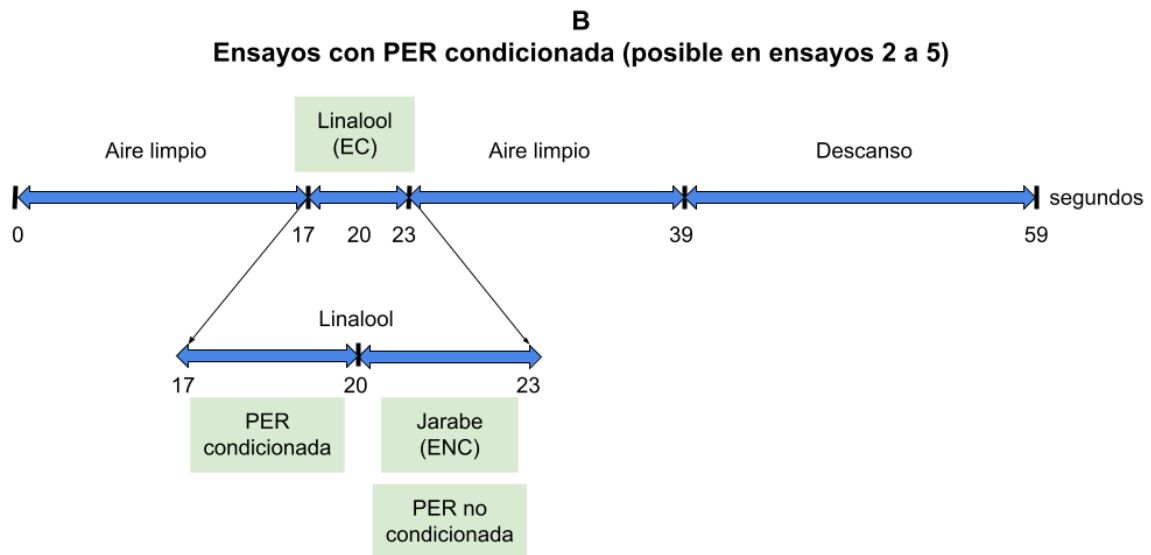
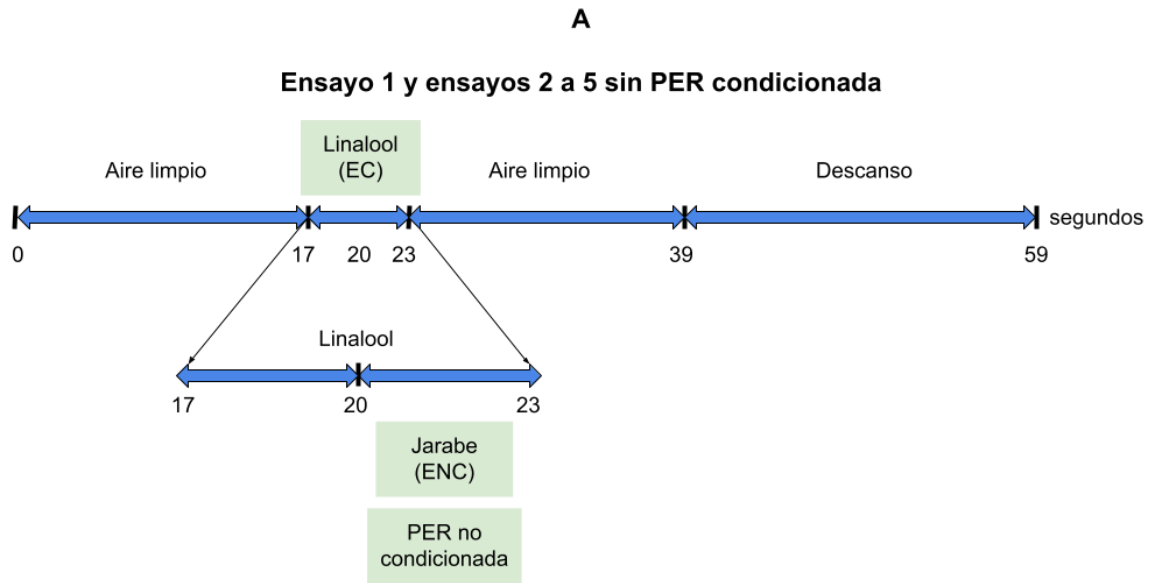
colmenas de las cuales se obtuvieron los cuadros y fue irradiado durante 2 h con luz UV a 254 nm para disminuir la carga patogénica. Los tratamientos fueron aplicados desde el armado de las cajas de confinamiento, en tiras preparadas como en el ensayo de campo (3.3), administrando 449 mg de AE de *E. buniifolium* y 112 mg de timol por caja de confinamiento (0.54 y 0.13 mg/cm<sup>3</sup>, respectivamente). Las cajas se mantuvieron en incubadora a 30 ± 2 °C, 65 ± 5 % HR y oscuridad total. Diariamente se contaron y retiraron las abejas muertas de cada caja para estudiar supervivencia mediante el método de Kaplan–Meier (test de Mantel-Cox para diferencias entre curvas de supervivencia de abejas expuestas a control - varroacida) utilizando Rstudio (v. 2023.03.0).

Las abejas anestesiadas (en un baño de agua-hielo) se inmovilizaron en un tip de 1000 µL de pipeta automática adaptado, de forma que pudiesen mover libremente el aparato bucal y las antenas, pero no el resto el cuerpo, y se mantuvieron en la incubadora hasta la fase de entrenamiento, en la cual se enseñó a las abejas a asociar el linalool (EC) con el jarabe (ENC) o se reforzó el asociamiento en caso de que ya se hubiese dado. Previo a esta fase, se evaluó la motivación de alimentarse (sin permitir la alimentación), descartando abejas que no extendieron la probóscide ante la estimulación de las antenas con una solución de sacarosa 50 % m/m [109].

Durante las pruebas de condicionamiento, la abeja inmovilizada se colocó entre el liberador de estímulo con un flujo de aire de 2.5 mL/s y un extractor para remover el estímulo volátil, con las antenas a la altura del primero, a 2 cm de distancia y apuntando hacia el mismo. Las abejas que respondieron a la corriente de aire (estímulo mecánico) fueron descartadas. La fase de entrenamiento (Figura 14 A y B) se realizó en bloques de 12 abejas, aproximadamente 3 h después de culminar la inmovilización de éstas, y constó de 5 ensayos separados por 15 min. En cada ensayo (59 s) se permitió primero la aclimatación de la abeja, suministrando una corriente de aire limpia durante 16 s; luego se liberó el linalool (EC) durante 6 s, en los cuales en los últimos 3 s se tocaron las antenas con la solución de sacarosa 50 % m/m (ENC) para provocar la respuesta de extensión de probóscide y se alimentó a la abeja de forma de permitir la asociación entre el estímulo volátil y la recompensa. Se suministró seguidamente una corriente de aire limpio durante otros 16 s, y por último se dejó reposar a la abeja durante 20 s para facilitar el inicio de la formación de la memoria. El estímulo no condicionado se suministró al activar una válvula eléctrica que dirige el

flujo de aire por el cartucho (tubo de vidrio) conteniendo un papel de filtro de 3 x 30 mm embebido en 4  $\mu$ L de linalool. Para la fase de entrenamiento de cada bloque se utilizó un cartucho nuevo. Se consideró que hubo una respuesta condicionada cuando la abeja extendió su probóscide en los 3 primeros segundos de liberación del estímulo volátil (Figura 14 C); las abejas que presentaron extensión de probóscide espontánea en el primer ensayo se descartaron [109]. Luego de la fase de entrenamiento, las abejas se alimentaron hasta saciedad con jarabe de sacarosa 50% m/m y se incubaron hasta realizar el estudio de memoria 24 h después (mediano plazo). La evaluación de la memoria se realizó brindando el estímulo condicionado pero sin ofrecer recompensa. Después de esta prueba se estimularon las antenas de las abejas con jarabe 50 % m/m para verificar que estuviesen hambrientas, y se descartaron del análisis de memoria las abejas que no presentaron PER [120].

El efecto de los tratamientos en la fase de entrenamiento se evaluó mediante ANOVA para medidas repetidas (cada abeja se evaluó 5 veces) y en la fase de memoria mediante un test exacto de Fisher. Ambos análisis se hicieron en SPSS Statistics (IBM, v. 27.0).



**Figura 14.** Esquema de la fase de entrenamiento del condicionamiento de la respuesta de extensión de la probóscide (PER). **(A)** Primer ensayo de la fase de entrenamiento. La cronología de este ensayo también aplica en los casos en los que la abeja no exhibió una PER condicionada a linalool en los ensayos 2 a 5. **(B)** Refuerzo del asociamiento entre EC y ENC, que se puede dar en los ensayos 2 a 5 de la fase de entrenamiento. **(C)** Abeja extendiendo la probóscide (PER) al ser estimulada con el EC.

## 5. Análisis de volátiles florales con actividad electrofisiológica

### 5.1. Colectas *in vivo* y caracterización química

Se realizaron colectas *in vivo* de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de flores de *Malus x domestica* variedad Granny Smith y Gala en una quinta comercial en la localidad de Las Piedras-Canelones (34.39 ° S, 56.17 ° O) y de la variedad Red Chief en una quinta en Melilla-Montevideo (34.45 ° S, 56.18 ° O). Además, se cultivó *Cucurbita máxima* var. zapallito redondo de tronco Clarissimo (semillas hortícolas marca CAPS) en una quinta familiar en Santa Rosa-Canelones (34.32 ° S, 55.57 ° O) para coleccionar los VOCs florales *in vivo*. El muestreo de los VOCs florales de manzano se realizó colocando una inflorescencia (ramillete de 4 a 8 flores) con hojas en una bolsa inerte (Figura 15 A y B), y de esta misma forma se coleccionaron los volátiles de las hojas; en el caso de las flores hembra y macho de zapallito de tronco se colocó una flor por bolsa (Figura 15 C). Los VOCs se coleccionaron durante 8 horas, adsorbiéndose en columnas de HaySep-Q 80/100 mesh mediante arrastre por un flujo de aire (1 L/min) logrado con una bomba succionadora (bomba de muestreo personal Apex2, Casella). Un extremo de cada bolsa fue cortado -mínimamente- para evitar su colapso debido a la succión del aire. En ambos cultivos se realizaron blancos de aire (muestras de aire de bolsas vacías). Todos los días luego de los muestreos los VOCs se eluyeron del adsorbente con 1 mL de hexano (calidad HPLC), y previo a su análisis y uso se concentraron a 100 µL con corriente de nitrógeno.

Para la caracterización química de los VOCs se utilizaron las mismas columnas capilares y GC-MS que para los AE (ver sección 1 de materiales y métodos). En ambas columnas cromatográficas se inyectó 1 µL del extracto concentrado 10 veces en modo *splitless*, con un programa de temperaturas que inició en 40 °C (1 min), incrementándose a 5 °C/min hasta 235 °C, temperatura a partir de la cual se aumentó a 20 °C/min hasta 280 °C (2 min). Las temperaturas del inyector e interfase fueron 250 y 300 °C, respectivamente, y el rango de escaneo de masas fue de 27 a 400 m/z. Para manzano variedad Red Chief y Granny Smith se analizaron extractos representativos de distintas colectas de VOCs florales. Para los demás VOCs se analizaron mezclas de las réplicas de extractos. Para cada mezcla o extracto se identificaron los compuestos cuya área consistió en al menos 0.1 % del TIC.



**Figura 15.** Colecta *in vivo* de volátiles florales. **(A)** y **(B)** cultivo de manzano. **(C)** Cultivo de zapallito de tronco.

## 5.2. Análisis por GC-EAD

Se realizaron análisis de GC-EAD con los volátiles florales colectados, utilizando antenas de abejas obreras de edad desconocida sin previa exposición a varroacidas, colectadas al retornar de su viaje de pecoreo en un apiario comercial ubicado en Santa Rosa-Canelones (34.32 ° S, 55.57 ° O). Para ésto se utilizó un cromatógrafo gaseoso HP 5890 Series II, equipado con una columna OPTIMA-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Macherey-Nagel), y un detector de ionización de llama (FID). Para cada análisis se inyectó 1 o 2 µL del extracto concentrado diez veces, para manzano y zapallito de tronco, respectivamente, en modo *splitless*. El programa de temperatura del horno inició en 40 °C (1 min), incrementándose a 5 °C/min hasta 220 °C; la temperatura de la interfase al EAG fue de 220 °C, y la del inyector y detector fueron de 250 °C. El gas portador empleado fue Hidrógeno y el gas suplementario previo a la división de la columna fue Nitrógeno (20 mL/min).

La preparación y montaje de las antenas, y el suministro de la corriente continua de aire (450 mL/min) pasada por las antenas se realizó de igual manera que en el punto 3 [Efecto de la exposición a varroacidas en olfacción periférica (EAG)]. Los datos se recolectaron y analizaron usando el Software GC-EAD 2014 (Syntech, v. 1.2.5). Para cada extracto floral se evaluaron de 4 a 7 antenas y se consideró que un compuesto generó respuesta electrofisiológica cuando se registró una caída medible de potencial de la línea de base por el software en al menos tres antenas.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

---

### 1. Obtención y caracterización química de AE

Los AE estudiados en esta tesis están constituidos principalmente por mono- y sesquiterpenos no oxigenados, es decir, terpenos hidrocarbonados; y en menor medida por sesquiterpenos oxigenados. La composición de los AE discutida a continuación se basa en los compuestos cuya suma de áreas constituyen el 80 % de la TIC para cada AE (Tabla 1). En el apéndice (Tablas 1 a 3) se encuentra la composición química completa para cada AE.

Si bien los perfiles de los dos AE de *Eupatorium buniifolium* estudiados fueron similares (Tabla 1 y Figura 16), se observó una leve variación en las proporciones de mono- y sesquiterpenos no oxigenados. Mientras que en el AE de *E. buniifolium* 2021-2022 la representación de estos compuestos fue similar (monoterpenos no oxigenados: 42 %, sesquiterpenos no oxigenados: 38 %), en el AE de *E. buniifolium* 2016 predominaron los sesquiterpenos no oxigenados, que representaron el 50 % de la composición, y los monoterpenos no oxigenados constituyeron solo 26 % de la TIC. En ambos AE los monoterpenos mayoritarios fueron  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno, sabineno y D-limoneno. Los sesquiterpenos mayoritarios fueron germacreno-D,  $\beta$ -elemeno y un sesquiterpeno no oxigenado que no pudo ser identificado. Las composiciones de estos AE fueron similares a las reportadas en Uruguay para esta especie. Los AEs de material vegetal de *E. buniifolium* colectado en Canelones, Uruguay en diciembre 2009-febrero 2010 y diciembre 2014-febrero 2015 por Umpiérrez [111] consistieron principalmente de monoterpenos no oxigenados (32 %) y sesquiterpenos no oxigenados (40 %). En esta mezcla de AE los compuestos más abundantes fueron el  $\alpha$ -pineno (15 %),  $\beta$ -pineno (7 %), sabineno (7 %), (*E*)- $\beta$ -guaiano (9 %), D germacreno (8 %),  $\beta$ -elemeno (7 %), y  $\beta$ -cariofileno (5 %). El  $\alpha$ -pineno (15 %) también fue el compuesto mayoritario del AE obtenido por Lorenzo et al. [121] a partir de partes aéreas de *E. buniifolium* colectadas durante el período de floración (setiembre a noviembre) en 1999-2001 en Canelones, Uruguay. Este AE estuvo compuesto principalmente por sesquiterpenos no oxigenados (56 %), siendo el  $\beta$ -elemeno (12 %), germacreno-D (12%), (*E*)- $\beta$ -guaiano (7 %) y  $\beta$ -cariofileno (4%) los más abundantes, y por monoterpenos no oxigenados (33%) [121].



En el AE de *Schinus molle* los monoterpenos representaron el 65 % de la composición, siendo los mayoritarios  $\alpha$ -pineno (19 %),  $\beta$ -pineno (17 %), D-limoneno (14 %), sabineno (11 %) y  $\beta$ -mirceno (5 %). Los sesquiterpenos constituyeron solamente un 16 % de la composición, y los principales fueron los sesquiterpenos no oxigenados biciclogermacreno (10 %) y  $\beta$ -cariofileno (4 %), y el sesquiterpeno oxigenado espatulenol. Rossini et al. [122] identificaron 16 compuestos en un AE de *S. molle* obtenido a partir de ramas y hojas colectadas en primavera de 1992 en Salto, Uruguay. Dos diferencias importantes entre éste y el estudiado en esta tesis, es la ausencia de  $\alpha$ -pineno y su riqueza en sesquiterpenos hidrocarbonados, los cuales representaron un 60 % de la composición. Entre estos sesquiterpenos predominaron el biciclogermacreno (29.2 %) y el germacreno-D (12.8%); otros compuestos abundantes fueron los monoterpenos no oxigenados  $\beta$ -pineno (14 %) y sabineno (13 %), y el monoterpeno oxigenado terpinen-4-ol (11 %) [122].

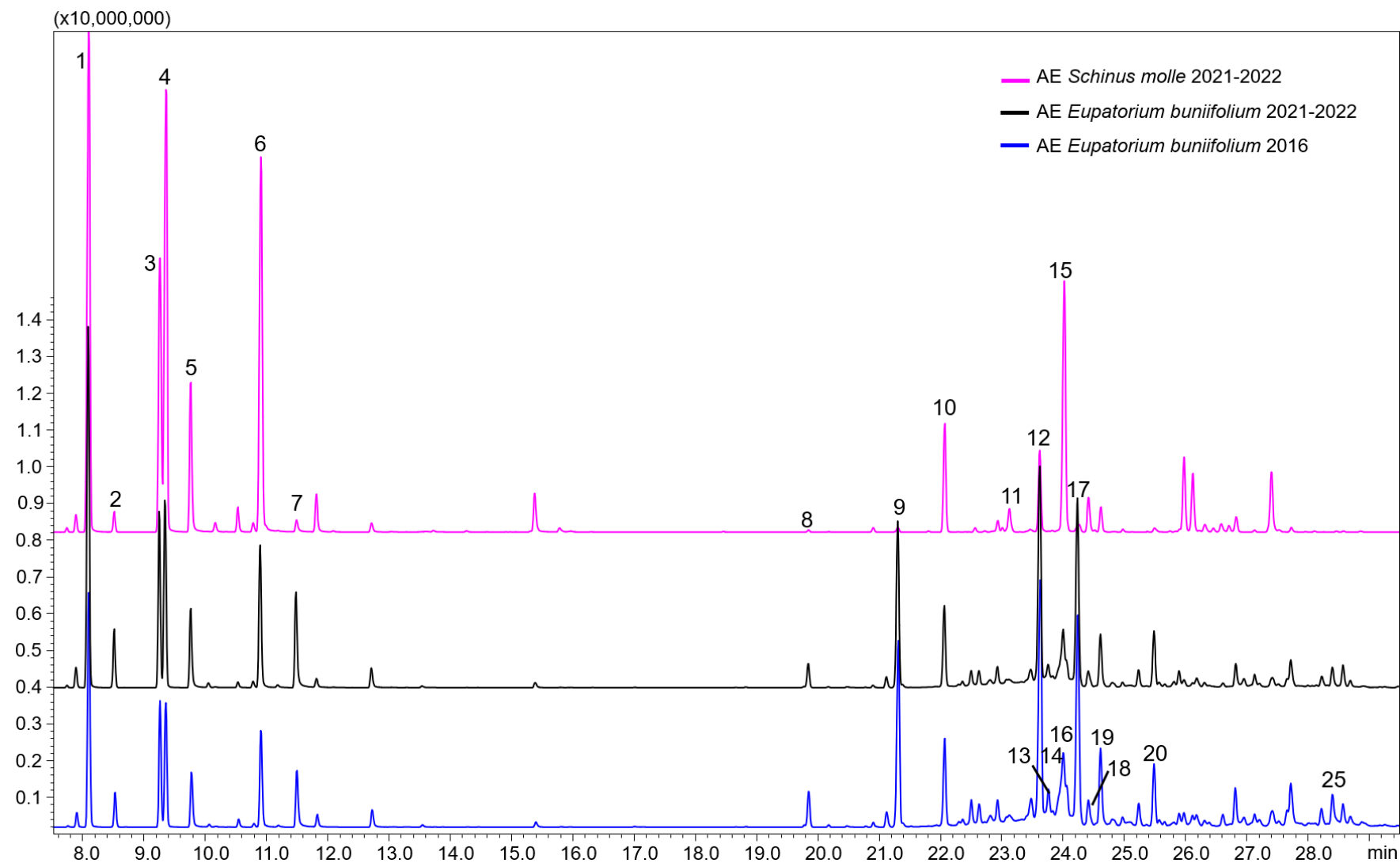
Las diferencias de composición en los AE de una misma especie botánica, en particular para los AE obtenidos de material vegetal recolectado en un territorio pequeño como Uruguay, pueden ser explicadas por la variación de las condiciones climáticas previas a las temporadas de recolección del material vegetal, por el órgano de la planta del cual se extrajo y del estado de desarrollo de la planta, así como de la composición del suelo y de factores genéticos [49, 56, 59].

Entre los componentes principales de los AE evaluados en este trabajo que presentan actividades plaguicidas se encuentran el  $\alpha$ -pineno y el D-limoneno, para los cuales se ha reportado alta toxicidad contra el ácaro *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), plaga de plantas de ambientes secos [123, 124]. Sin embargo, estos monoterpenos presentan baja toxicidad sobre *V. destructor* y *A. mellifera* [49]. Otro monoterpeno con actividad contra *T. urticae* es el  $\beta$ -pineno [123]. El D-limoneno, además, presenta actividad inhibitoria contra *Paenibacillus larvae*, bacteria que produce la enfermedad Loque Americana en colonias de *A. mellifera* [125]. El  $\beta$ -cariofileno, además de tener acción repelente sobre áfidos [126], resulta tóxico para el ácaro *Dermanyssus gallinae* (Mesostigmata: Dermanyssidae) y la garrapata *Hyalomma dromedarii* (Ixodida: Ixodidae) [127]. El germacreno-D presenta actividad repelente contra áfidos y garrapatas del ganado [126].

**Tabla 1.** Composición química de los AE estudiados, para cada AE se informan los compuestos cuya suma de áreas constituyen el 80 % de la TIC. Datos obtenidos por GC-MS con columna Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Restek).

				AE Eb 2016	AE Eb 2021-2022	AE Sm 2021-2022
n	Compuesto	Tipo de compuesto	IRL base de datos	Área (%)	Área (%)	Área (%)
1	α-Pineno	M	932	8.6	14.4	19.2
2	Canfeno	M	946	1.1	2.0	-
3	Sabineno	M	969	4.3	6.5	10.8
4	β-Pineno	M	974	4.3	7.0	16.5
5	β-Mirceno	M	988	1.9	2.9	4.6
6	D-Limoneno	M	1024	3.5	5.6	14.4
7	(E)-β-Ocimeno	M	1044	2.2	3.8	-
8	δ-Elemeno	SNO	1335	1.3	-	-
9	β-Elemeno	SNO	1389	7.8	7.0	-
10	β-Cariofileno	SNO	1417	3.5	3.4	3.8
11	α-Cariofileno	SNO	1452	1.0	-	-
12	Germacreno-D	SNO	1481	11.6	10.1	-
13	β-Selineno	SNO	1486	1.4	-	-
14	α-Selineno	SNO	1494	1.5	1.0	-
15	Biciclogermacreno	SNO	1495	2.4	1.7	9.8
16	α-Muuroleno	SNO	1499	1.1	-	-
17	NI, m/z 204	SNO		10.1	9.1	-
18	γ-Cadineno	SNO	1513	1.1	-	-
19	δ-Cadineno	SNO	1522	3.1	2.2	-
20	Germacreno-B	SNO	1559	2.4	2.3	-
21	Espatulanol	SO	1577	-	-	2.7
21	NI, m/z 204	SNO		1.4	-	-
23	NI, m/z 222	SO		2.1	1.2	-
24	NI, m/z 220	SO		1.6	-	-
25	Siobunol	SO	1701	1.0	-	-
<b>Monoterpenos no oxigenados totals</b>				<b>26.0</b>	<b>42.1</b>	<b>65.4</b>
<b>Sesquiterpenos no oxigenados totals</b>				<b>49.5</b>	<b>36.8</b>	<b>13.6</b>
<b>Sesquiterpenos oxigenados totals</b>				<b>4.7</b>	<b>1.2</b>	<b>2.7</b>
<b>Sesquiterpenos totals</b>				<b>54.2</b>	<b>38.0</b>	<b>16.3</b>

M: monoterpeno. SNO: sesquiterpeno no oxigenado. SO: sesquiterpeno oxigenado. IRL: índice de retención lineal. Área (%): % de área de la corriente iónica total (TIC), obtenida por normalización simple de área. NI: compuesto no identificado.



**Figura 16.** Cromatogramas de los AE de *S. molle* y *E. buniifolium* utilizados en los ensayos con abejas, obtenidos por GC-MS con columna Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m; Restek). Los números hacen referencia a los compuestos identificados según Tabla 1.

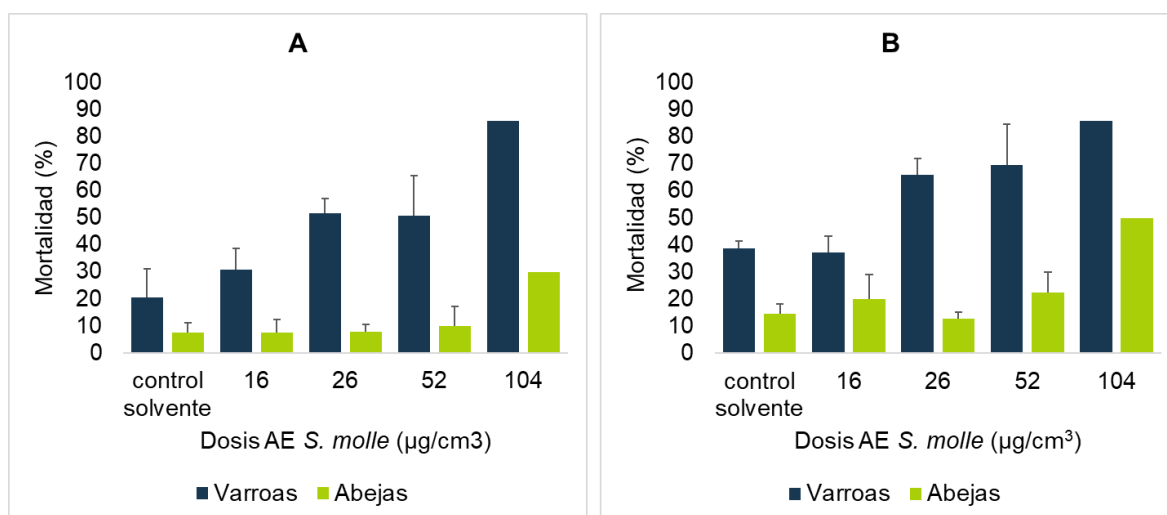
## 2. Toxicidad del AE de *S. molle*

Al aumentar la dosis de AE aplicada, para *V. destructor* se observó una tendencia al aumento en la mortalidad, llegando a un 86 % en la mayor dosis de exposición ( $104 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ), tanto a las 24 como a las 48 h (Figura 17). Sin embargo, para *A. mellifera*, no se percibió una variación en la mortalidad según la dosis de AE, con excepción del aumento de mortalidad a la mayor dosis de AE estudiada (Figura 17). Dado que no se murieron más del 50 % de las abejas para ninguna dosis (30 y 50 % mortalidad a las 24 y 48 h, respectivamente), no se pudo calcular la  $DL_{50}$  para abejas. Para *V. destructor* las  $DL_{50}$  fueron  $41 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  ( $IC_{95\%}$ :  $26 - 57 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) y  $21 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  ( $IC_{95\%}$ :  $5 - 37 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) para 24 y 48 horas, respectivamente (Figura 18). Estos valores indican que a mayor tiempo de exposición disminuyó la dosis necesaria para matar al 50 % de los individuos, lo cual es esperable [65]. Para evaluar la inocuidad del AE frente a las abejas se estimó el índice de seguridad ( $IS: DL_{50} A. mellifera / DL_{50} V. destructor$ ) como la relación entre la mayor dosis de AE ensayada y la  $DL_{50}$  de varroas, siendo mayores a 2.5 y 5 para 24 y 48 horas de exposición, respectivamente, sugiriendo que este AE es inocuo para las abejas y efectivo como varroacida, al menos en las condiciones evaluadas [65].

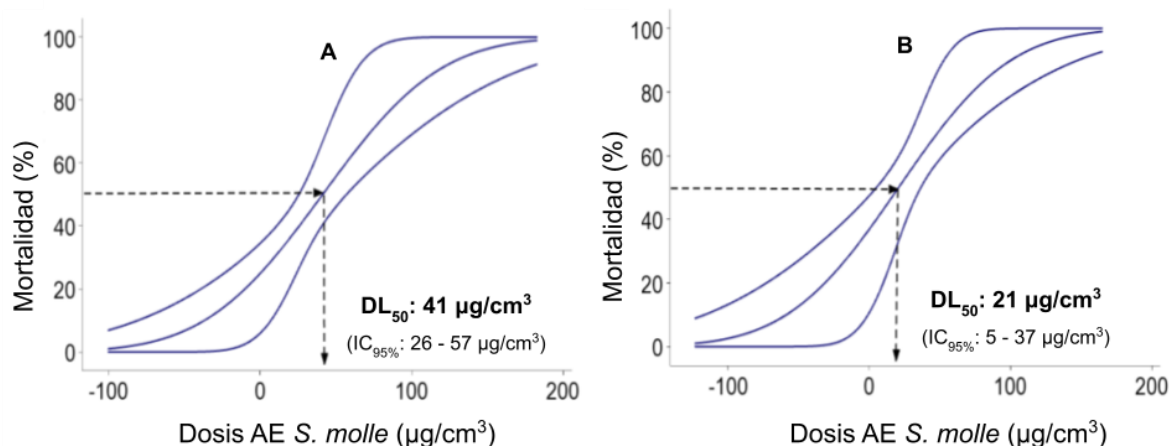
El IS estimado a las 48 h fue menor que el reportado por Ruffinengo et. al [65] para un AE de la misma especie (IS 16 a las 48 h de exposición) lo que puede ser explicado por la diferencia en las composiciones de los AE utilizados [49]. Como se mencionó anteriormente, en el AE de *S. molle* utilizado en este trabajo los compuestos principales fueron  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno, D-limoneno, sabineno y biciclogermacreno. Sin embargo, el AE utilizado por Ruffinengo et. al [65] estuvo compuesto mayoritariamente por  $\alpha$ - y  $\beta$ -felandreno (12 y 28 %), canfeno (8 %) y óxido de cariofileno (7 %). Tras estos resultados promisorios, Ruffinengo et al. [67] evaluaron en laboratorio la actividad de AE de *S. molle* microencapsulado, como una forma de mejorar su estabilidad y permitir una liberación más controlada de los PA, lo que aumentaría el rendimiento del AE. Sin embargo, tanto la exposición completa como los vapores provocaron efectos nocivos en las abejas, sin presentar una actividad varroacida óptima. A su vez, el grupo de Ruffinengo determinó que este AE no presentó efecto atrayente o repelente sobre *V. destructor* [65], pero su formulación microencapsulada resultó ser atrayente [67]. De tener efecto repelente podría afectar la fase reproductiva del ácaro, disminuyendo su población y nivel de infestación en las colmenas [67].

En Abancay, Perú, el tratamiento de colmenas con AE de frutos maduros de *S. molle* presentó una gran eficiencia varroacida, sin presentar daño sobre las abejas, prometiendo ser una buena alternativa a los acaricidas sintéticos. Este AE estuvo compuesto principalmente por los monoterpenos no oxigenados  $\alpha$ -felandreno (33 %),  $\beta$ -mirceno (16%) y D-limoneno (17 %) [68]. En un estudio realizado por Guala et al. [69] en colmenares en Argentina se evaluó el poder acaricida de un AE de frutos molidos, hojas y tallos de *S. molle* constituido principalmente por sabineno (54 %), y  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno (10 y 11 %, respectivamente), así como de dos de sus fracciones: una con mayor abundancia de pinenos y una enriquecida en terpinen-4-ol. En ninguno de los tres tratamientos se registró una eficacia varroacida óptima, pero la mortalidad de varroa aumentó en las fracciones del AE enriquecidas en pinenos y terpinen-4-ol, compuestos a los que se les atribuyó el aumento de toxicidad sobre varroa [69].

El AE de diferentes órganos de *S. molle* presenta toxicidad sobre larvas de la garrapata del ganado *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) [128], actividad insecticida y repelente contra pestes de granos [129], y actividad repelente frente a la cucaracha oriental *Blatta orientalis* (Blattodea: Blattidae) [126] y la cucaracha alemana *Blattella germanica* L. (Blattodea: Blattellidae) [130]. También se ha demostrado que posee propiedades antibacterianas [126, 131].



**Figura 17.** Toxicidad del AE de *S. molle* sobre *V. destructor* y *A. mellifera*. Porcentaje de mortalidad por exposición durante 24 h (A) y 48 h (B). Control solvente: N=3; dosis AE 16, 26 y 52  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ : N=4, y dosis AE 104  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ : N= 1. Barras de error: error estándar.



**Figura 18.** Toxicidad del AE de *S. molle* sobre *V. destructor*. Gráfico dosis-mortalidad obtenido con modelo Probit. La curva central representa la mortalidad, las adjuntas representan el intervalo de confianza (nivel de significancia de 95 %). **(A)** Mortalidad a las 24 h. **(B)** Mortalidad a las 48 h.

### 3. Efecto de la exposición a varroacidas en olfacción periférica (EAG)

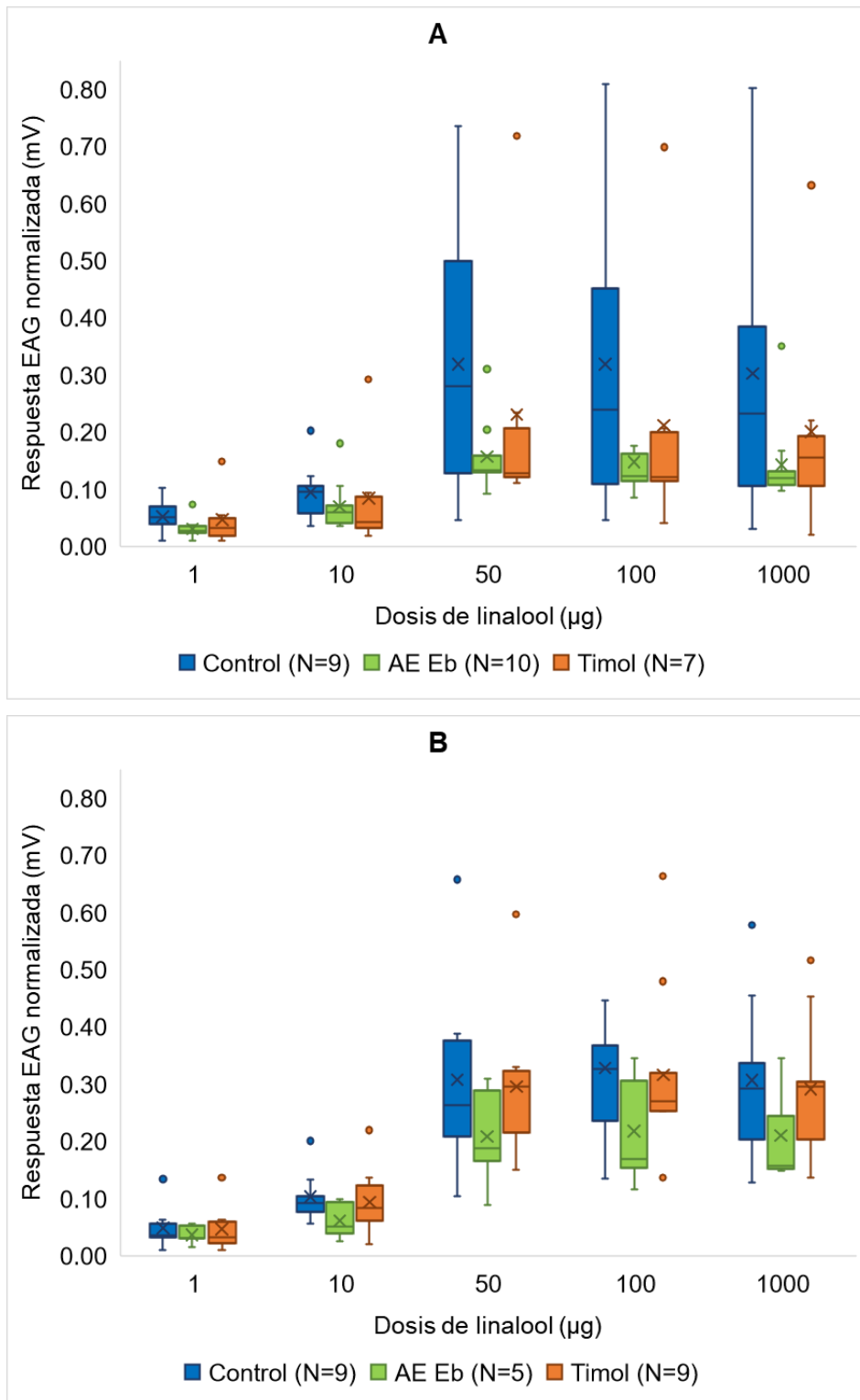
#### 3.1. Exposición temporal en laboratorio

Como era esperado, la respuesta EAG aumentó con la dosis de estímulo brindada [117, 118, 132] y alcanzó una meseta en las dosis más grandes [117] (Figura 19).

Para estudiar el efecto de la exposición temporal (24 h) de abejas de 9/10 días a los vapores de timol y de AE de *E. buniifolium*, se hizo una transformación logarítmica de la respuesta EAG y se eliminaron los valores atípicos de forma de cumplir el supuesto de normalidad necesario para aplicar el análisis estadístico ANOVA Split plot. Si bien este análisis mostró un efecto en la respuesta normalizada media a linalool (efecto principal tratamiento:  $p = 0.003$ ), y el análisis *post hoc* indicó que la diferencia era entre respuestas de antenas expuestas a control y AE de *E. buniifolium* (Games-Howell:  $p = 0.046$ ), el p-valor de éste fue cercano al valor de significancia, y con la gran dispersión que presentaron las respuestas de antenas control (Figura 19 A), no se considera que la diferencia fuese biológicamente relevante. La exposición a los vapores de timol no tuvo efecto en la respuesta EAG (Games-Howell:  $p = 0.055$ ).

Para abejas de 14/15 días se aplicó el análisis a los datos sin transformar, con y sin valores atípicos, dado que se cumplió el requisito de normalidad. En ambos casos el efecto principal del tratamiento no mostró un efecto estadísticamente significativo en la respuesta normalizada media (ANOVA Split plot:  $p = 0.367$  para conjunto de datos

con valores atípicos y  $p = 0.395$  para conjunto de datos sin valores atípicos; Figura 19 B).



**Figura 19.** Efecto de la exposición temporal (24 h) en laboratorio a vapores de AE de *E. buniifolium* y timol sobre la respuesta EAG a linalool en (A) abejas de 9/10 días y (B) abejas de 14/15 días. Los círculos representan valores atípicos.

### 3.2. Exposición crónica en laboratorio

Al igual que en antenas de abejas expuestas temporalmente a AE de *E. buniifolium*, timol y control de vehículo, la respuesta EAG a linalool en antenas de abejas expuestas crónicamente a los varroacidas o al vehículo aumentó con la dosis de linalool, alcanzando una meseta en las mayores dosis (Figura 20).

No hubo diferencia estadísticamente significativa (ANOVA Split plot,  $p > 0.05$  en todos los casos, ver abajo) entre las respuestas EAG normalizadas de antenas de abejas expuestas crónicamente en laboratorio al control en la misma incubadora en que se encontraban los tratamientos varroacidas (control C2) respecto al control externo (C1) a dicha incubadora. Esto indica que los resultados de ambos controles son consistentes, por lo que el control interno (C2) es válido como control.

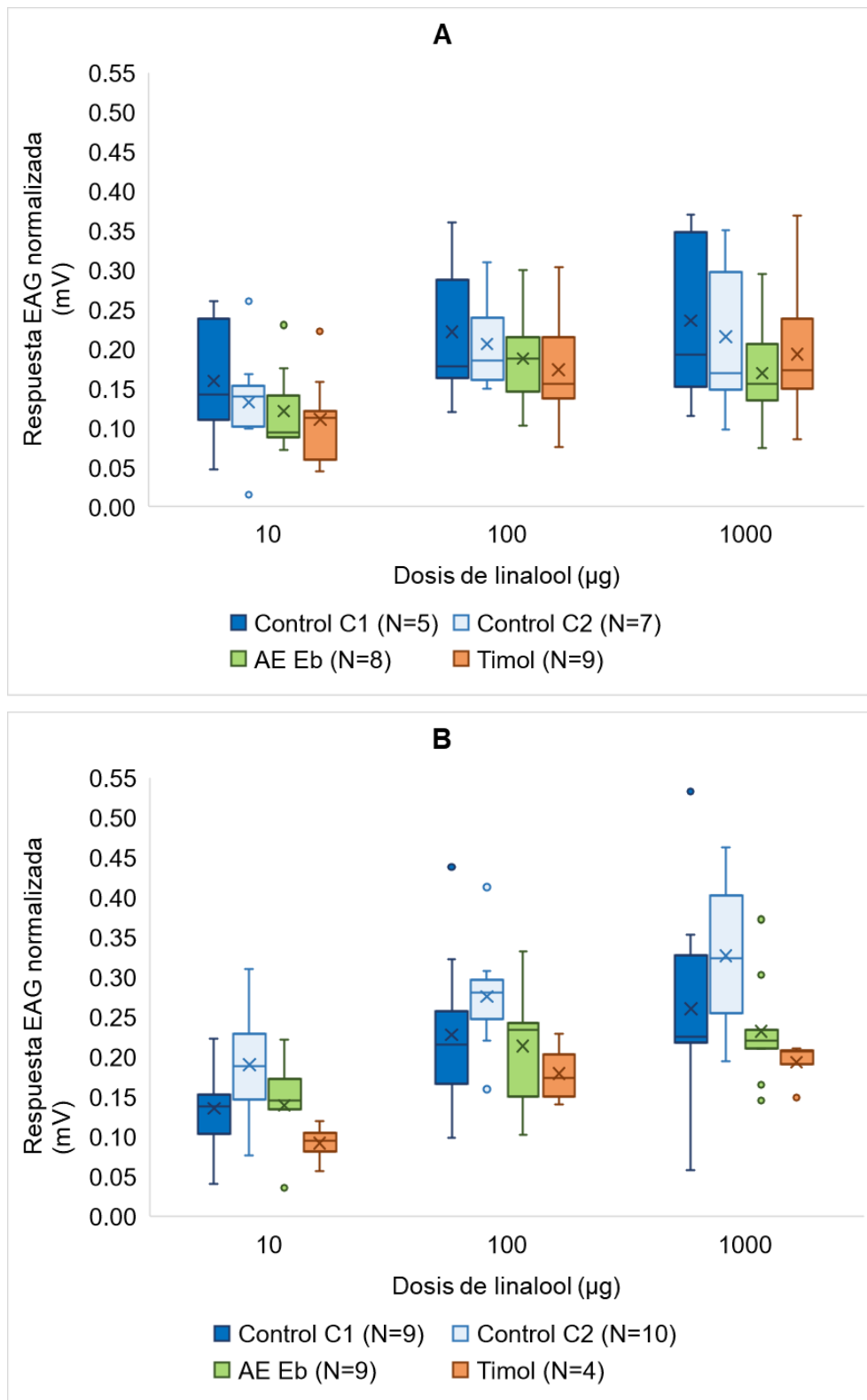
Para abejas de 9/10 días la exposición crónica -completa- a los varroacidas no provocó una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta normalizada media a linalool (ANOVA Split plot:  $p = 0.598$  y  $p = 0.164$ , para datos con y sin valores atípicos, respectivamente. Figura 20 A).

En abejas de 14/15 días de edad, el análisis estadístico aplicado a los datos con valores atípicos indicó diferencia estadística entre al menos dos tratamientos (ANOVA Split plot:  $p = 0.041$ . Figura 20 B). Sin embargo, el análisis *post hoc* no arrojó diferencias significativas entre los tratamientos (Bonferroni:  $p > 0.05$ ). En cambio, el análisis estadístico hecho a los datos sin valores atípicos mostró una disminución estadísticamente significativa en la respuesta normalizada media a linalool en abejas tratadas con timol en relación con el grupo control interno (C2) (ANOVA Split plot:  $p = 0.009$ ; *post hoc* Games-Howell:  $p$ -valor = 0.04). Sin embargo, esta diferencia solo se considera tentativa debido al bajo número de réplicas de timol, además, no hubo diferencia con el control externo (C1). Las abejas tratadas con timol presentaron una alta mortalidad a partir de los 9/10 días post emergencia, por lo que se puso en duda la salud de las sobrevivientes, motivo que explica que en algunas repeticiones del ensayo se decidiera no obtener réplicas de antenas de abejas tratadas con timol.

En este ensayo, entre las tres aplicaciones de PA realizadas se administraron en total 0.18 g de timol por caja, 2.5 veces menos que el equivalente de timol a aplicar por caja de confinamiento si se usara un escalado de la dosis de timol (8 g) utilizada en colmenas Langstroth [calculado como el volumen libre de una colmena Langstroth



(aproximadamente 14350 cm<sup>3</sup>) / volumen de una caja de confinamiento (836 cm<sup>3</sup>)]. Por este motivo, y por la ausencia de alta mortalidad en las abejas tratadas con control de vehículo o con AE de *E. buniifolium* (datos no mostrados), se cree que la mortandad en abejas tratadas con timol podría deberse a una combinación del propio tratamiento con condiciones de incubación y alimentación subóptimas para abejas expuestas a éste. Por consiguiente, en el siguiente experimento de exposición crónica en laboratorio se probaron nuevas condiciones de incubación y se cambió el origen del polen suministrado. En este caso la exposición al AE de *E. buniifolium* no tuvo efecto en la respuesta EAG a linalool ( $p = 0.059$  y  $0.965$  para control externo (C1) y control interno (C2), respectivamente).



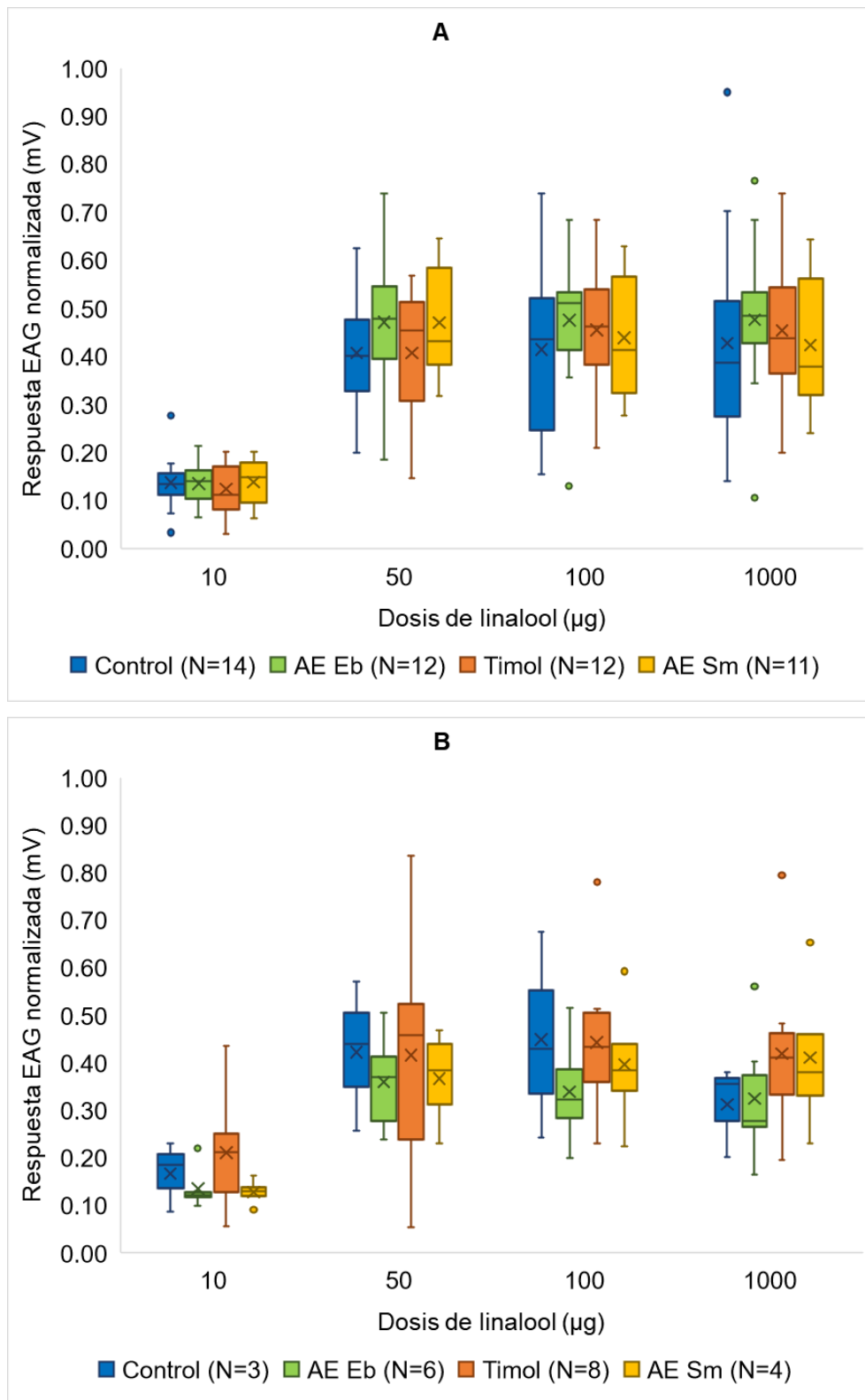
**Figura 20.** Efecto de exposición crónica en laboratorio a AE de *E. buniifolium* y timol sobre la respuesta EAG a linalool en **(A)** abejas de 9/10 días y **(B)** abejas de 14/15 días. Los círculos representan valores atípicos. Control C2: realizado en la misma incubadora que los tratamientos varroacidas. Control C1: en incubadora externa a los tratamientos.

### 3.3. Exposición crónica en colmenas

Para estudiar el efecto de la exposición crónica a los varroacidas en colmenas sobre la respuesta EAG a linalool, se unificaron los datos de las dos colmenas de cada tratamiento dado que el factor colmena no tuvo efecto significativo en el análisis estadístico preliminar (ANOVA Split plot,  $p = 0.12$  para abejas nodrizas;  $p = 0.45$  y  $0.38$  para abejas pecoreadoras con y sin valores atípicos respectivamente). Para abejas nodrizas solo se realizó el análisis al conjunto de datos sin valores atípicos, ya que de lo contrario no se cumplía el supuesto de normalidad, ni siquiera después de aplicar transformaciones a los datos. Para abejas pecoreadoras, se obtuvieron menos de 3 réplicas de antenas de una de las colmenas control, una expuesta al AE de *E. buniifolium* y una expuesta al AE de *S. molle*, por lo tanto, éstas no fueron consideradas para el análisis ni se incluyeron en la Figura 21 B.

El tratamiento crónico con timol, AE de *E. buniifolium* y AE de *S. molle* no tuvo efecto estadísticamente significativo sobre la detección periférica a linalool en abejas nodrizas o pecoreadoras (ANOVA Split plot: nodrizas:  $p = 0.81$  y  $0.32$  para datos con y sin valores atípicos, respectivamente; pecoreadoras:  $0.73$  y  $0.67$ , con y sin valores atípicos, respectivamente; Figura 21).

Según Chapuy et al. [108], la exposición tópica a timol en las 3 horas previas a la evaluación EAG no provocó efecto sobre las respuestas de las antenas a 1- y 2-hexanol ni a 1- y 2-octanol. Lim et al. [107] determinaron que el tratamiento tópico de abejas pecoreadoras con dosis subletales de tau-fluvalinato provocó efectos negativos sobre la detección olfativa periférica a distintas clases de compuestos ( $\alpha$ -pineno, ocimeno, linalool, acetato de bencilo y acetato de fenetilo) en las 24 horas posteriores al tratamiento.



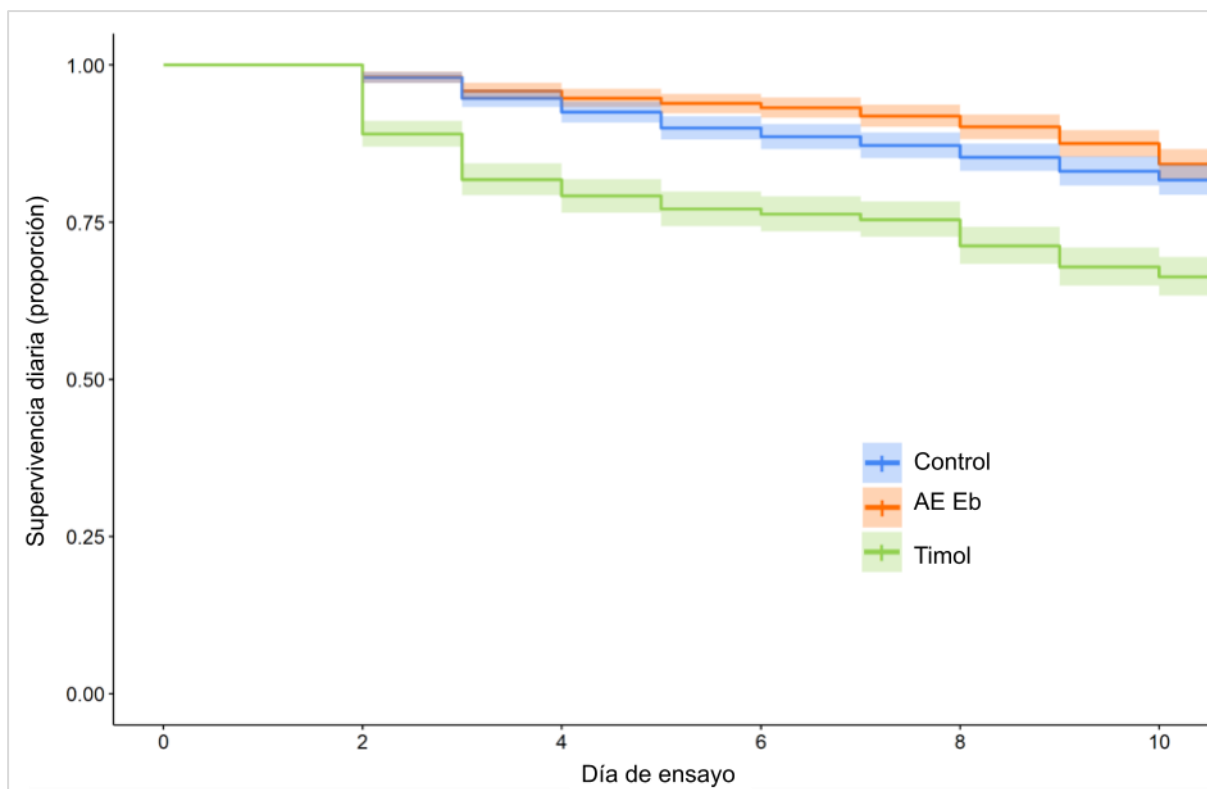
**Figura 21.** Efecto de exposición crónica en colmenas a AE de *E. buniifolium*, timol y AE de *S. molle* sobre la respuesta EAG a linalool en **(A)** abejas nodrizas (12/13 días) y **(B)** abejas pecoreadoras (46/47 días).

#### **4. Efecto de la exposición a varroacidas en aprendizaje y memoria olfativa (condicionamiento PER)**

Inicialmente en este ensayo se administró una dosis de timol de 449 mg por caja de confinamiento ( $0.54 \text{ mg/cm}^3$ ) que se corresponde con la dosis de timol utilizada en el ensayo de exposición crónica en colmenas (Sección 3.3) (cálculo realizado por escalado de volumen: relación de volumen libre en una colmena Langstroth y volumen de la caja de confinamiento), obteniendo mortalidades de abejas de 83 a 85 % en las cajas de confinamiento luego de 1 día de exposición. Por este motivo se disminuyó la dosis a la mitad, en estas dosis se obtuvieron mortalidades de entre 10 a 94 % luego de 1 día de exposición. Finalmente se aplicaron 112 mg de timol por caja ( $0.13 \text{ mg/cm}^3$ ), lo que representa, con su correspondiente escalado por volumen, un 25 % de las dosis aplicadas en colmenas en el ensayo 3.3.

La supervivencia diaria acumulada de abejas expuestas crónicamente a AE de *E. buniifolium* no fue estadísticamente diferente de las expuestas al control de vehículo (test de Mantel-Cox:  $p = 0.11$ ; Figura 22), indicando que la dosis ensayada en el laboratorio sería (extrapolándola a las dimensiones de la colmena) segura para su uso en colmenas en condiciones similares de temperatura y % HR. En cambio, en cajas de abejas expuestas crónicamente a timol la supervivencia diaria acumulada fue significativamente menor que en las expuestas al control de vehículo (test de Mantel-Cox:  $p < 0.0001$ ; Figura 22).

A pesar de que la dosis de timol ( $0.13 \text{ mg/cm}^3$ ) fue casi el doble que en el ensayo de exposición crónica en laboratorio (apartado 3.2;  $0.07 \text{ mg/cm}^3$ ), la mortalidad en este ensayo fue menor, lo que sugiere que la mortalidad observada en 3.2 podría deberse a efectos adicionales al timol, como las condiciones de incubación y/o el origen del polen suministrado [133]. En el ensayo 3.2 la incubación se hizo a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ , dos grados más que en este, lo que podría provocar una liberación más rápida de los vapores de timol, pudiendo haber causado la alta toxicidad en las abejas expuestas. La cinética de liberación del timol también podría haber sido afectada por el vehículo utilizado para preparar la emulsión: aceite de ricino en 3.2 y aceite de soja en el ensayo aquí discutido.

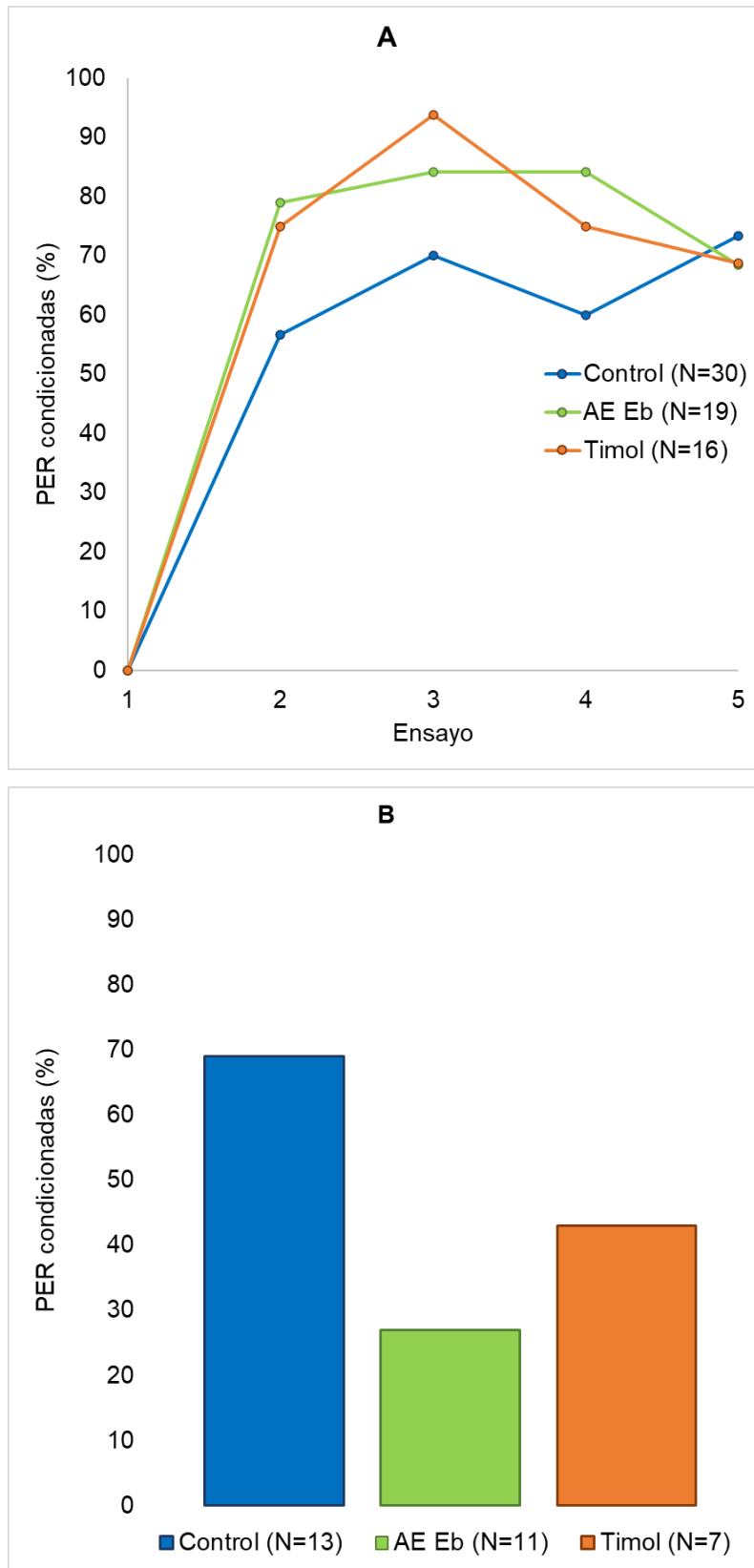


**Figura 22.** Supervivencia diaria acumulada de abejas expuestas crónicamente en cajas de confinamiento a AE de *E. buniifolium* (449 mg / caja) y a timol (112 mg / caja). Curvas de supervivencia construidas mediante el método de Kaplan Meier.

La exposición crónica completa (fumigante, tópica y oral) en laboratorio a AE de *E. buniifolium* y timol no afectó el aprendizaje asociativo de linalool en abejas de 9/10 días (ANOVA de medidas repetidas de 1 vía:  $p = 0.10$ ; Figura 23 A) así como tampoco su memoria (Test exacto de Fisher:  $p = 0.13$ ; Figura 23 B). Sin embargo, para poder sacar conclusiones debería realizarse un ensayo con 30 réplicas como mínimo.

Los resultados obtenidos para abejas tratadas con timol estuvieron en consonancia con los reportados por Gashout et al. [105] y Bonnafé et al. [106] para abejas tratadas tópicamente. Bonnafé et al. [106] informaron que el tratamiento con timol 3 horas antes del condicionamiento PER no afectó el aprendizaje ni la memoria a mediano plazo (24 h) de 1-nonanol y 2-hexanol. Gashout et al. [105] reportaron que el tratamiento con timol luego del condicionamiento olfativo no afectó la memoria a corto, mediano o largo plazo (2, 24 y 48 h, respectivamente). A su vez, estos autores informaron el efecto perjudicial de la aplicación tópica de tau-fluvalinato, amitraz y cumafós (varroacidas sintéticos) y ácido fórmico (varroacida orgánico) sobre la memoria olfativa a las 48 h del aprendizaje, este último varroacida afectó también la memoria a corto y mediano plazo [105]. Además, en el caso del tau-fluvalinato se ha reportado dificultad de

aprendizaje asociativo en abejas expuestas completamente durante las 24 h previas al condicionamiento [100]. Williamson & Wright [101] informaron que la ingestión oral de cumafós durante 4 d provocó dificultad en el aprendizaje asociativo de 1-hexanol, así como también en la memoria a las 24 h. Por último, el tratamiento crónico de colmenas con el producto comercial ApilifeVar, compuesto por timol (74 %), AE de eucalipto (16 %), canfor (3.7 %) y levomenthol (3.7 %), no afectó el aprendizaje olfativo de 1-nonanol y 2-hexanol pero sí la memoria a las 24 h [78].



**Figura 23.** Efecto de la exposición crónica en laboratorio a AE de *E. buniifolium* y timol sobre el aprendizaje y la memoria olfativa de linalool en abejas de 9/10 días. **(A)** Fase de entrenamiento: 5 ensayos de aprendizaje separados por 15 minutos. **(B)** Prueba de retención (memoria, 24 h post entrenamiento).



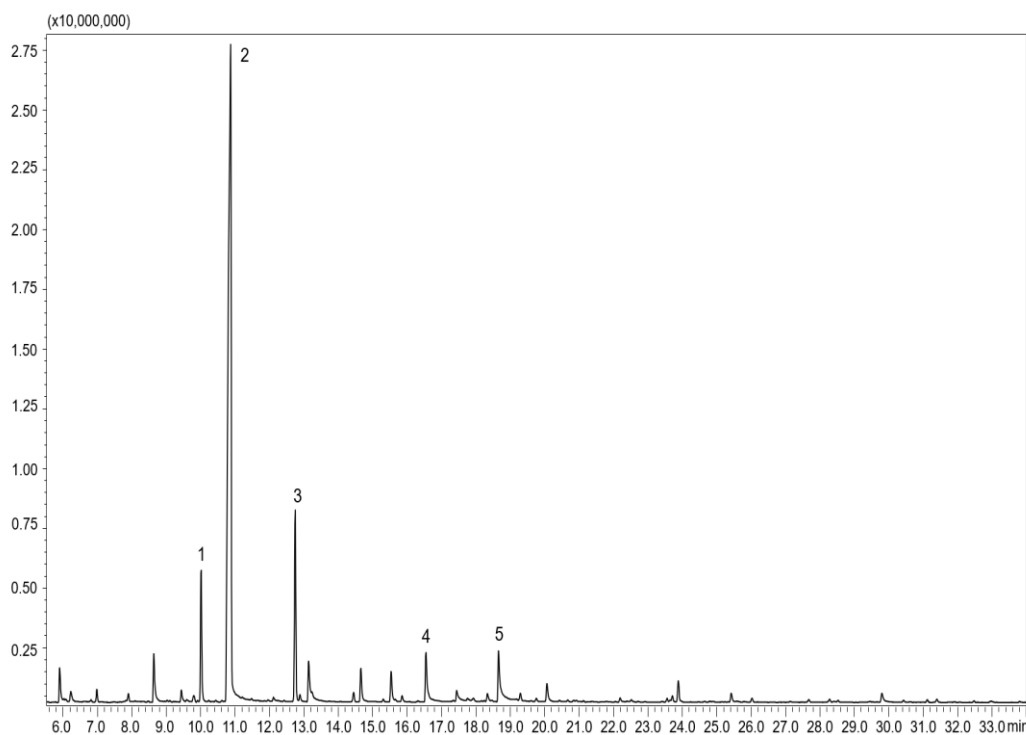
## 5. Análisis de volátiles florales con actividad electrofisiológica

### 5.1. Colectas *in vivo* y caracterización química

El alcohol bencílico fue el compuesto mayoritario en los volátiles florales de las tres variedades de *Malus x domestica* estudiadas (Tablas 2 a 4, Figura 24), constituyendo el 61 % de la TIC en la variedad Red Chief. El segundo compuesto mayoritario en las variedades Red Chief y Granny Smith fue el linalool (8.0 y 9.1 % área, respectivamente), que también se encuentra en la variedad Gala (2.1 % TIC). En las flores de la variedad Gala otros compuestos mayoritarios fueron salicilato de metilo y hex-3-en-1-ol.

**Tabla 2.** Composición química de un extracto representativo de VOCs florales de *Malus x domestica* variedad Red Chief. Datos obtenidos por GC-MS con columna Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m; Restek).

N	Compuesto	IRL base de datos	IRL calc.	Simil. (%)	Área (%)
1	Acetato de 3-hexen-1-ilo	1004	1007	97	5.2
2	Alcohol bencílico	1026	1036	99	61.0
3	Linalool	1095	1100	93	8.0
4	Alcohol hidrocinámico	1224	1231	94	3.1
5	( <i>E</i> )-Alcohol cinámico	1303	1308	87	3.7



**Figura 24.** Cromatograma representativo de extracto de VOCs de flores de *Malus x domestica* variedad Red Chief, obtenidos por GC-MS con columna Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m; Restek). Los números hacen referencia a los compuestos identificados según Tabla 2.

**Tabla 3.** Composición química de extracto representativo de VOCs florales de *Malus x domestica* variedad Granny Smith. Datos obtenidos por GC-MS con columna Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Restek).

Compuesto	IRL base de datos	IRL calc.	Simil. (%)	Área (%)
Octano	800	801	86	0.6
Hex-3-en-1-ol	848	850	96	3.8
1-Hexanol	863	863	93	1.6
Nonano	900	892	94	0.8
NI	-	929	-	0.6
Benzaldehído	952	960	99	1.7
6-metil-5-hepten-2-ona	981	988	94	2.0
Octanal	998	1005	95	0.6
Acetato de 3-hexen-1-ilo	1005	1009	93	2.3
Limoneno	1024	1031	93	0.8
Alcohol bencílico	1026	1039	98	24.1
NI	-	1045	-	0.9
NI	-	1047	-	0.6
β-Ocimeno	1037	1051	89	1.0
Linalool	1095	1103	94	9.1
Nonanal	1100	1108	95	2.4
Alcohol feniletílico	1106	1119	86	3.3
Salicilato de metilo	1190	1200	97	5.0
Decanal	1206	1209	96	2.5
Dodecanal	1408	1413	95	1.4
NI	-	1416	-	0.6
NI	-	1447	-	0.6
NI	-	1501	-	1.5
Pentadecano	1500	1503	90	1.3
(E,E)-α-Farneseno	1505	1515	94	6.0
Benzoato de (Z)-3-Hexen-1-ilo	1565	1580	95	0.6
Hexadecano	1600	1601	94	0.7
Heptadecano	1700	1703	95	0.8
Hexahidrofarnesil cetona	1844	1849	94	0.8
Nonadecano	1900	1901	94	0.9
Heneicosano	2100	2103	95	1.6

**Tabla 4.** Composición química de VOCs florales de *Malus x domestica* variedad Gala. Datos obtenidos por GC-MS con columna Stabilwax (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m; Restek).

Compuesto	IRL base de datos	IRL calc.	Simil. (%)	Área (%)
$\beta$ -Pineno	1112	1085	90	2.5
D-Limoneno	1200	1192	93	6.4
$\gamma$ -Terpineno	1246	1241	95	0.8
Acetato de 3-hexen-1-ilo	1315	1314	94	7.1
6-Metil-5-hepten-2-ona	1338	1335	91	0.7
Hexanol	1355	1349	94	0.7
Hex-3-en-1-ol	1382	1380	95	7.5
Nonanal	1391	1392	92	1.0
Tetradecano	1400	1398	95	1.2
Pentadecano	1500	1500	91	1.0
Benzaldehído	1520	1521	96	4.6
Linalool	1547	1546	93	2.1
NI	-	1580	-	1.6
Hexadecano	1600	1598	91	0.8
Acetato de bencilo	1720	1727	94	2.8
Salicilato de metilo	1765	1771	97	8.7
Alcohol bencílico	1870	1872	95	24.9
Alcohol feniletílico	1906	1905	96	2.2
Alcohol hidrocinámico	2039	2040	92	1.9
NI	-	2167	-	1.0
Alcohol cinámico	2279	2279	85	0.8

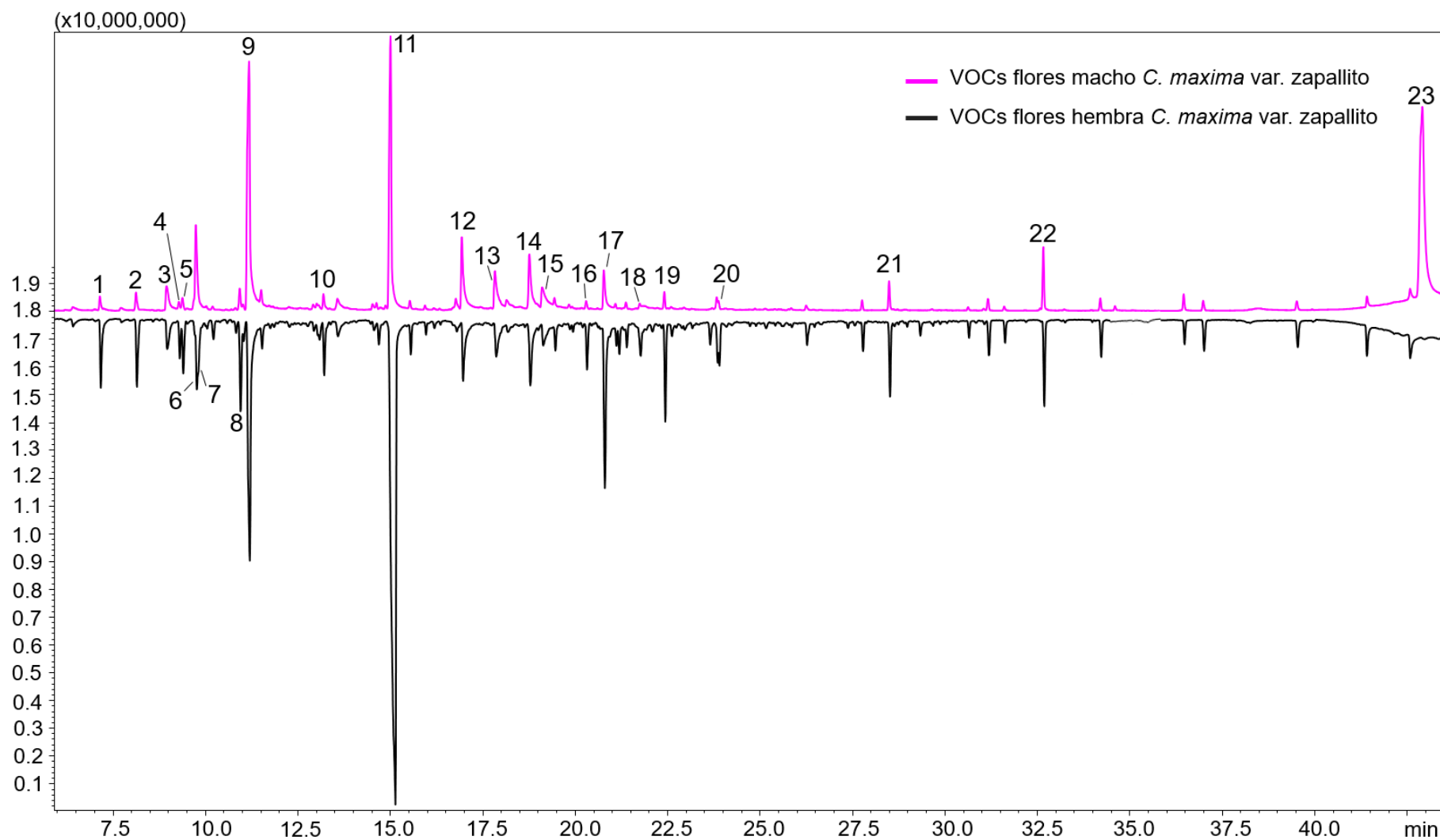
IRL: índice de retención lineal. Simil. (%): porcentaje de similitud del espectro obtenido respecto a los espectros disponibles en las bases de datos de espectros de masas [NIST 08, NIST 17 [112] y Adams [113]]. Área (%): % de área de la corriente iónica total (TIC), obtenida por normalización simple de área. NI: compuesto no identificado.

Los componentes mayoritarios de la mezcla de extractos de VOCs de flores hembra de *Cucurbita maxima* var. zapallito fueron 1,4-dimetoxibenceno (32.8 %), alcohol bencílico (11.3 %) y 1,2,4-trimetoxibenceno (5.3%) (Tabla 5). En la mezcla de extractos de flores macho el componente principal fue un hidrocarburo lineal no identificado (24.0 %), otros componentes mayoritarios fueron el alcohol bencílico (18.8 %) y el 1,4-dimetoxibenceno (16.4 %). La diferencia encontrada en las composición de los VOCs de flores macho y hembra de zapallito de tronco (Tabla 5, Figura 25) es típica del dimorfismo sexual de flores de plantas monoicas [83].

**Tabla 5.** Composición química de mezcla de extractos de VOCs de flores hembra y macho de *Cucurbita maxima* var. zapallito. Para cada mezcla se muestran los compuestos cuya suma de áreas constituyen el 80 % de la TIC. Datos obtenidos por GC-MS con columna Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m; Restek).

n	Compuesto	IRL base de datos	VOCs flores hembra			VOCs flores macho		
			IRL calc.	Simil. (%)	Área (%)	IRL calc.	Simil. (%)	Área (%)
1	Nonano	900	892	93	2.0	-	-	-
2	$\alpha$ -Pino	932	928	95	2.0	-	-	-
3	Benzaldehído	952	959	97	1.5	959	98	2.0
4	Sabineno	969	972	93	1.0	-	-	-
5	$\beta$ -Pino	974	975	95	1.5	-	-	-
6	Éter de metilo de bencilo	984	989	95	2.0	989	97	4.7
7	$\beta$ -Mirreno	988	991	82	1.2	-	-	-
8	Limoneno	1030	1030	91	2.6	-	-	-
9	Alcohol bencílico	1036	1039	97	11.3	1039	98	18.8
10	Nonanal	1100	1107	95	1.4	-	-	-
11	1,4-Dimetoxibenceno	1168	1172	94	32.8	1168	94	16.4
12	Alcohol hidrocínámico	1232	1237	93	2.3	1236	92	4.7
13	(Z)-Alcohol cinámico	1259	1269	85	0.8	-	-	-
14	Indol	1290	1303	96	2.7	1303	97	3.7
15	(E)-Alcohol cinámico	1303	1316	92	0.9	1316	92	2.3
16	NI	-	1360	-	1.2	-	-	-
17	1,2,4-Trimetoxibenceno	1372	1377	92	5.3	1377	95	2.2
18	Longifoleno	1407	1414	94	0.7	-	-	-
19	trans- $\alpha$ -Bergamoteno	1432	1442	90	2.4	-	-	-
20	Pentadecano	1500	1502	95	0.8	-	-	-
21	Heptadecano	1700	1701	94	1.9	-	-	-
22	Nonadecano	1900	1899	92	2.1	1898	93	2.4
23	Hidrocarburo lineal	-	-	-	-	> 1900	-	24.0

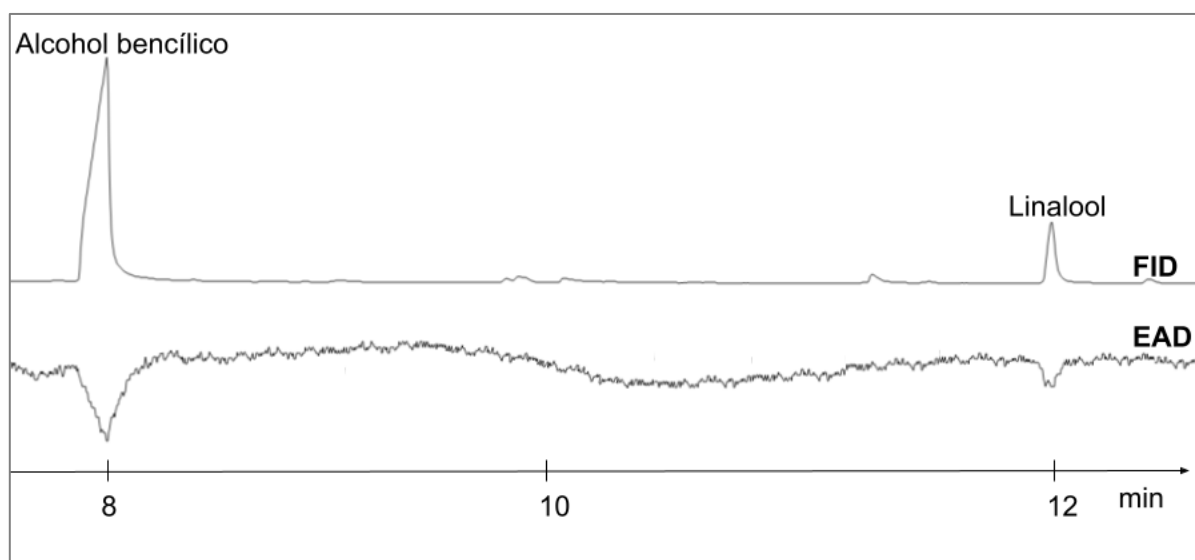
IRL: índice de retención lineal. Simil. (%): porcentaje de similitud del espectro obtenido respecto a los espectros disponibles en las bases de datos de espectros de masas [NIST 08, NIST 17 [112] y Adams [113]]. Área (%): % de área de la corriente iónica total (TIC), obtenida por normalización simple de área. NI: compuesto no identificado.



**Figura 25.** Cromatogramas de las mezclas de extractos de VOCs de flores hembra y macho de *Cucurbita maxima* var. zapallito, obtenidos por GC-MS con columna Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m; Restek). Los números hacen referencia a los compuestos identificados según Tabla 5.

## 5.2. Análisis por GC-EAD

Con la información aportada por esta técnica y por la caracterización química de los volátiles florales de manzano variedad Red Chief se identificó al alcohol bencílico y al linalool como los compuestos activos que generaron respuesta EAG en las antenas de abejas (Figura 26), con una respuesta EAG promedio de  $0.13 \pm 0.02$  y  $0.06 \pm 0.01$  mV, respectivamente. Para los volátiles florales de las variedades de manzano Granny Smith y Gala no se obtuvo respuesta electrofisiológica. En este estudio se utilizaron abejas pecoreadoras de edad desconocida, colectadas en diferentes meses y colmenas, por lo que esta falta de respuesta a compuestos para los cuales se registró respuesta EAG en los VOCs florales de manzano variedad Red Chief, en particular a alcohol bencílico (compuestos mayoritarios de todas las variedades) y linalool podría deberse a las condiciones biológicas de los individuos y su edad [134, 135], así como también a su experiencia olfativa [134-136], ya que podrían haber estado explotando recursos florales que posean los mismos compuestos que los presentes en los VOCs estudiados. Claudianos et al. [136] demostraron que la experiencia olfativa (asociación y recuerdo de odorantes florales con la recompensa) provoca una disminución de la expresión de los receptores olfativos que detectan esos compuestos (niveles que son medidos indirectamente mediante EAG [136]), pudiendo estar estos niveles debajo del umbral necesario para generar una respuesta EAG medible [84].



**Figura 26.** Fragmento de cromatograma (FID, arriba) de extracto representativo de VOCs de flores de *Malus x domestica* variedad Red Chief, con la respuesta EAD correspondiente (abajo).

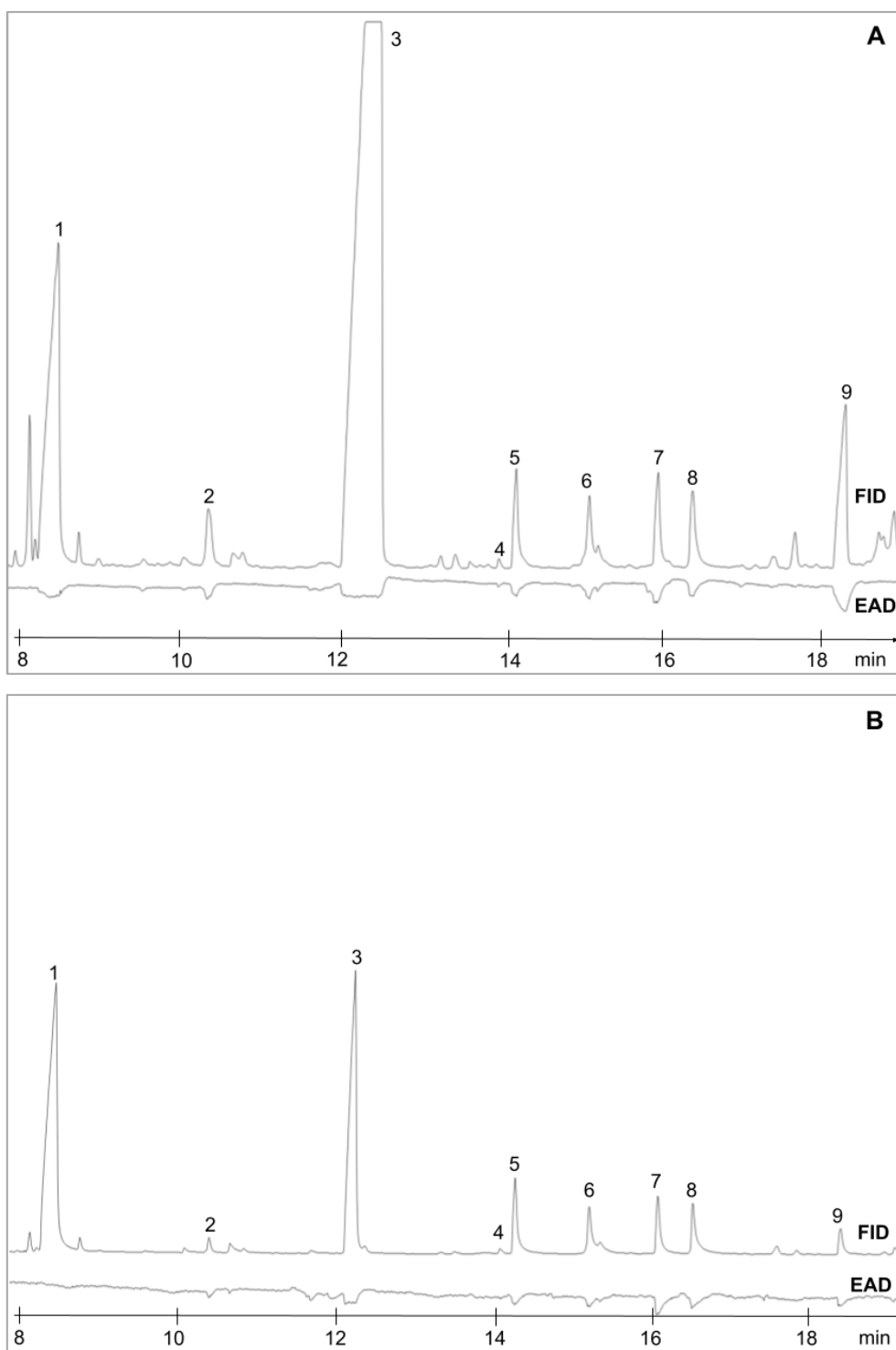
En los volátiles de flores hembra de *C. máxima* var. zapallito se identificaron ocho compuestos que generaron respuesta EAD en los individuos estudiados (Figura 27 A) y en los volátiles de flores macho, seis (Figura 27 B). Además, para los VOCs de ambos sexos se registró respuesta EAD a un pico que eluyó entre el 1,4-dimetoxibenceno y el alcohol hidrocinámico, y a otro que eluyó entre el alcohol hidrocinámico y el indol. Estas dos respuestas EAD se adjudican a dos grupos de compuestos que no se resuelven en las condiciones cromatográficas utilizadas en el GC-FID, y que tienen pobre resolución en las condiciones empleadas en el GC-MS. El primer grupo estuvo conformado por tres compuestos que no pudieron ser identificados, y el segundo por el (*Z*)-alcohol cinámico y dos co-eluyentes no identificados (NI). En la tabla 5 se detallan los compuestos con actividad electrofisiológica y la amplitud de la respuesta EAD promedio y en la Figura 28 se muestran las estructuras químicas de los compuestos que pudieron ser identificados.

**Tabla 5.** Compuestos de los extractos de VOCs de flores hembra y macho de *Cucurbita maxima* var. zapallito que provocaron respuesta electrofisiológica en antenas de *A. mellifera*.

n	Compuesto	Resp. EAG prom. $\pm$ error estándar (mV) a VOCs de flores de zapallito de tronco	
		Hembra	Macho
1	Alcohol bencílico	0.09 $\pm$ 0.02	NRE
2	Nonanal	0.15 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.00
3	1,4-Dimetoxibenceno	0.10 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.02
4	Compuestos NI que coeluyen	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.00
5	Alcohol hidrocinámico	0.07 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.02
6	( <i>Z</i> )-Alcohol cinámico y coeluyentes NI	0.08 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.01
7	Indol	0.13 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.04
8	( <i>E</i> )-Alcohol cinámico	0.11 $\pm$ 0.01	0.104 $\pm$ 0.01
9	1,2,4-Trimetoxibenceno	0.28 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.01
10	Hexahidrofarnesil cetona	0.05 $\pm$ 0.01	NRE

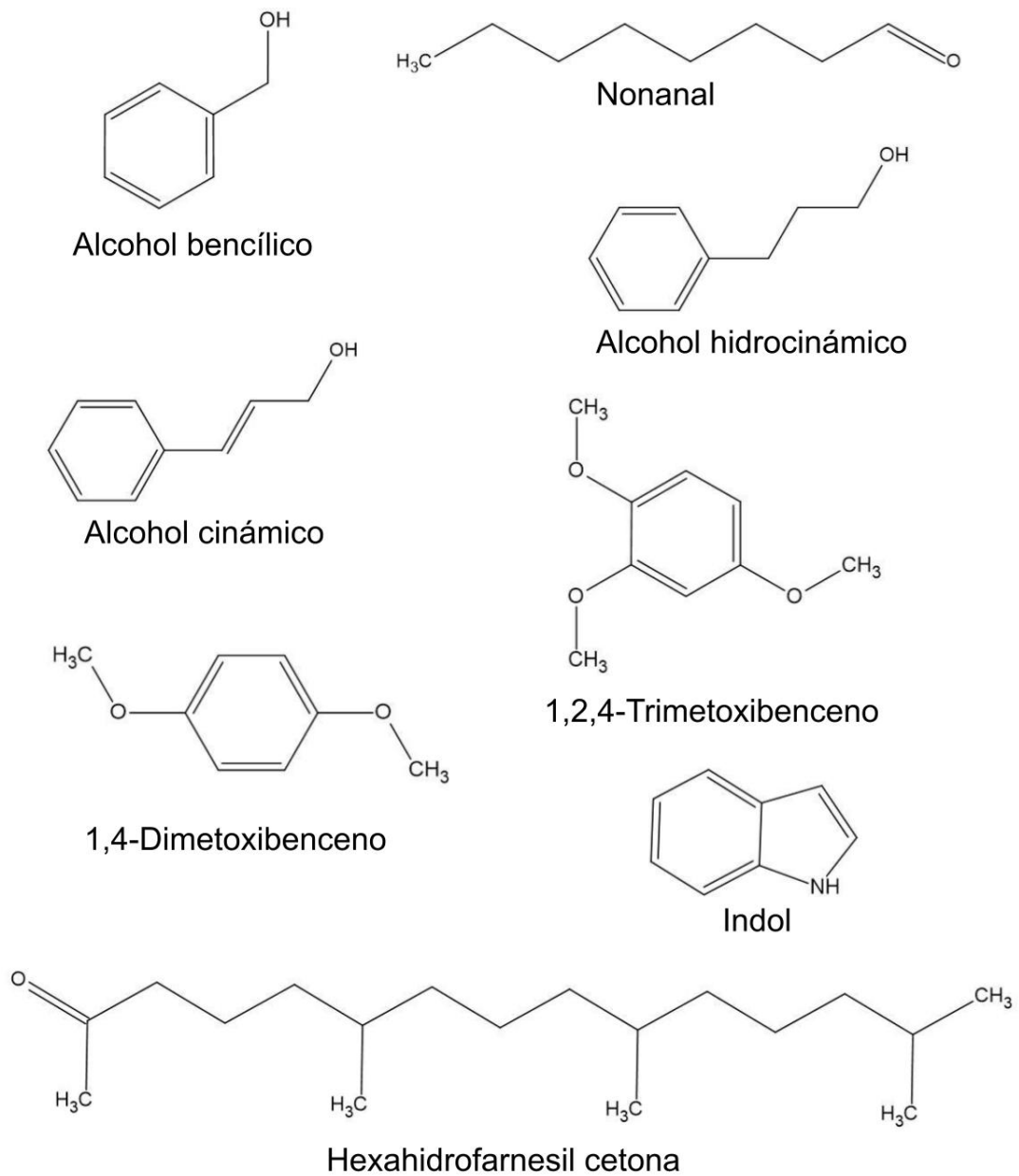
NRE: compuesto para el cual no se registró respuesta electrofisiológica.

NI: no identificado



**Figura 27.** Cromatograma (FID, arriba) de la mezcla de extractos de VOCs de flores de *Cucurbita maxima* var. zapallito con la respuesta EAD correspondiente (abajo). Se muestra el fragmento de cromatograma delimitado por los tiempos de retención de los compuestos que generaron respuesta EAG. Los números hacen referencia a los compuestos identificados según Tabla 5. **(A)** Flores hembra. El compuesto hexahidrofarnesil cetona (10) no está incluido en la imagen para mejor visualización de los otros compuestos. **(B)** Flores macho.





**Figura 28.** Estructuras de los compuestos de los VOCs de flores de manzano y zapallito de tronco que provocaron respuesta electrofisiológica en antenas de *A. mellifera*.

## CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

---

Mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se determinó que los dos AE de *Eupatorium buniifolium* y el AE de *Schinus molle* estudiados están constituidos por mono- y sesquiterpenos, con variabilidad en la composición de los AE de *E. buniifolium* obtenidos en las distintas temporadas. En los tres AE los monoterpenos mayoritarios fueron  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno, sabineno y D-limoneno. Los sesquiterpenos mayoritarios en los AE de *E. buniifolium* fueron germacreno-D,  $\beta$ -elemeno y un sesquiterpeno no oxigenado que no fue identificado, y en el AE de *S. molle* fueron el biciclogermacreno,  $\beta$ -cariofileno y el espatulenol.

En la evaluación de toxicidad del AE de *S. molle* por exposición completa en laboratorio, se obtuvieron índices de seguridad mayores a 2.5 (24 h) y 5 (48 h). Este resultado, además de ser consistente con los resultados de trabajos de otros grupos, en los cuales se informaba que es un varroacida efectivo e inocuo para las abejas, es auspicioso, ya que según Guala et. al [66] el tratamiento de colmenas con AE de *S. molle* en primavera permite duplicar la producción de miel respecto a colmenas tratadas con acaricidas sintéticos sin aumentar el costo de producción.

Se evaluaron los efectos subletales de varroacidas derivados de productos naturales sobre la olfacción, aprendizaje y memoria de linalool en *Apis mellifera*. La medida de la respuesta olfativa se evaluó por la técnica de electroantenografía (EAG). A pesar de que ésta ha sido poco utilizada para estudiar efectos subletales de pesticidas sobre abejas, Lim et al. [107] reportaron efectos de un acaricida sobre la respuesta EAG a VOCs con distintas funciones para las abejas (compuestos de volátiles florales, un compuesto de la feromona de alarma y un compuesto que induce el comportamiento higiénico), demostrando que es una técnica que podría ser utilizada para evaluar el efecto de xenobióticos sobre la detección periférica en *Apis mellifera*. La capacidad de aprendizaje y memoria se estudió mediante la técnica de condicionamiento de la respuesta de extensión de probóscide (PER). Ésta, además de estar establecida en la comunidad científica de abejas como una técnica estándar para estudiar los efectos de pesticidas sobre estos procesos, es confiable y fácil de aplicar [96, 109]. El tratamiento temporal (24 h) o crónico en el laboratorio con timol y AE de *E. buniifolium* no provocó efecto en las respuestas EAG a linalool en antenas de abejas de 9/10 y 14/15 d. La exposición crónica en colmenas a esos dos varroacidas y al AE de *S.*

*molle* tampoco causó efecto en la respuesta EAG a linalool en antenas de abejas nodrizas (12/13 d) ni de pecoreadoras (46/47 d). Asimismo, en abejas de 9/10 d la exposición crónica a timol y a AE de *E. buniifolium* en laboratorio no tuvo un efecto significativo sobre el aprendizaje asociativo de linalool o sobre la memoria a mediano plazo (24 h). Si bien los resultados obtenidos mediante EAG y PER son promisorios, para completar este estudio se debe incrementar el número de réplicas, y antes de continuar con el desarrollo de productos basados en estos dos AE y para determinar si el uso de timol afecta procesos olfativos y cognitivos necesarios para la polinización, se debe extender el estudio a compuestos volátiles florales pertenecientes a distintas familias químicas. Además, cabe destacar que en ninguno de los ensayos se contó con un control positivo que afectara la respuesta estudiada, los cuales deben incorporarse en futuros ensayos a modo comparativo, siendo el tau-fluvalinato un candidato a usar en ambas técnicas.

Con el fin de determinar compuestos a utilizar en futuros estudios de efectos subletales de varroacidas sobre la fisiología olfativa de abejas melíferas, se utilizó la técnica de cromatografía gaseosa acoplada a electroantenografía (GC-EAD) para analizar la respuesta olfativa a componentes individuales de mezclas de volátiles florales de manzano y zapallito de tronco, cultivos seleccionados por tener una alta dependencia de la polinización entomófila. Los resultados de este análisis indicaron que en los diversos volátiles florales evaluados los principales compuestos a los que respondió la antena de *A. mellifera* fueron el nonanal (aldehído alifático), el (*E*)-alcohol cinámico y el alcohol bencílico (alcoholes aromáticos), 1,4-dimetoxibenceno y 1,2,4-trimetoxibenceno (éteres aromáticos), indol (compuesto aromático que contiene nitrógeno) y hexahidrofarnesil cetona (cetona terpénica irregular).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. FAO, *The importance of bees and other pollinators for food and agriculture*. 2018.
2. Miñarro, M., D. García , and R. Martínez-Sastre, *Los insectos polinizadores en la agricultura: importancia y gestión de su biodiversidad*. Ecosistemas, 2017. **27**(2): p. 81-90.
3. Maggi, M., et al., *Honeybee health in South America*. Apidologie, 2016. **47**(6): p. 835-854.
4. Klein, A.M., et al., *Importance of pollinators in changing landscapes for world crops*. Proceedings of the Royal Society B, 2007. **274**(1608): p. 303-313.
5. Santos, E., *Relevamiento de polinización y polinizadores en Uruguay*, in *Consultoría en Conservación de Polinizadores*. 2019.
6. Santos, E., et al., *Valor económico de la polinización realizada por abejas *Apis mellifera* en Uruguay, una aproximación*, INIA, Editor. 2009: Serie Actividades de Difusión N°568.
7. Santos, E., et al., *Dependencia del cultivo de manzana a la polinización entomófila en Uruguay. Importancia de la Abeja melífera en el cuajado de los frutos*. INIA, 2015. **42**: p. 28-32.
8. Miñarro Prado, M. and D. García, *Manzana, kiwi y arándano: sin insectos no hay frutos ni beneficios*, in *Tecnología agroalimentaria: Boletín informativo del SERIDA*. 2016. p. 4-8.
9. Smith-Pardo, A., *Principios y avances sobre la polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y el Caribe*. 2014, Santiago: FAO.
10. Johnson, B.R., *Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 2010. **64**(3): p. 305-316.
11. Seeley, T.D., *Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 1982. **11**(4): p. 287-293.
12. Schmickl, T. and K. Crailsheim, *How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behaviour in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 2002. **51**(5): p. 415-425.

13. Page, R.E., Jr., et al., *The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (Apis mellifera L.)*. Current Topics in Developmental Biology, 2006. **74**: p. 253-286.
14. Dötterl, S. and N.J. Vereecken, *The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives*. Canadian Journal of Zoology, 2010. **88**(7): p. 668-697.
15. Amdam, G.V. and S.W. Omholt, *The regulatory anatomy of honeybee lifespan*. Journal of Theoretical Biology, 2002. **216**(2): p. 209-228.
16. Slessor, K.N., M.L. Winston, and Y. Le Conte, *Pheromone communication in the honeybee (Apis mellifera L.)*. Journal of Chemical Ecology, 2005. **31**(11): p. 2731-2745.
17. Bortolotti, L. and C. Costa, *Chemical Communication in the Honey Bee Society*, in *Neurobiology of Chemical Communication*, C. Mucignat-Caretta, Editor. 2014, CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton. p. 147–210.
18. Hrassnigg, N. and K. Crailsheim, *The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (Apis mellifera L.)*. Journal of Insect Physiology, 1998. **44**(3939-3404).
19. Huang, Z. and G.E. Robinson, *Regulation of honey bee division of labor by colony age demography*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 1996. **39**(3): p. 147-158.
20. vanEngelsdorp, D., et al., *Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis*. Journal of Economic Entomology, 2010. **103**(5): p. 1517-1523.
21. Potts, S.G., et al., *Global pollinator declines: trends, impacts and drivers*. Trends in Ecology & Evolution, 2010. **25**(6): p. 345-353.
22. Le Conte, Y., M. Ellis, and W. Ritter, *Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?* Apidologie, 2010. **41**(3): p. 353-363.
23. Invernizzi, C., et al., *Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay: novedades de la última década*, in *Veterinaria (Montevideo)*. 2022. p. e20225821704.
24. SOLATINA, *Científicos alertan sobre la muerte de abejas en Latinoamérica*. 2020: Gacetilla de prensa Sociedad Latinoamericana de Investigación en Abejas.

25. Yang, X. and D. Cox-Foster, *Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(21): p. 7470-7475.
26. Traynor, K.S., et al., *Varroa destructor: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide*. Trends in Parasitology, 2020. **36**(7): p. 592-606.
27. Hristov, P., et al., *Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review*. Veterinary Sciences, 2020. **7**(4).
28. Ramsey, S.D., et al., *Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019. **116**(5): p. 1792-1801.
29. Gisder, S., P. Aumeier, and E. Genersch, *Deformed wing virus: replication and viral load in mites (Varroa destructor)*. Journal of General Virology, 2009. **90**(2): p. 463-467.
30. Chauhan, A., M. Dabhi, and R. Jyotshna, *Review on Varroa mite An invasive threat to apiculture industry*. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2021. **9**(1): p. 535-539.
31. Nazzi, F. and Y. Le Conte, *Ecology of Varroa destructor, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, Apis mellifera*. Annual Review of Entomology, 2016. **61**: p. 417-432.
32. Rosenkranz, P., P. Aumeier, and B. Ziegelmann, *Biology and control of Varroa destructor*. Journal of Invertebrate Pathology, 2010. **103**: p. S96-119.
33. Mendoza, Y., et al., *Unraveling Honey Bee-Varroa destructor Interaction: Multiple Factors Involved in Differential Resistance between Two Uruguayan Populations*. Veterinary Sciences, 2020. **7**(3).
34. Roth, M.A., et al., *Biology and Management of Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae) in Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) Colonies*. Journal of Integrated Pest Management, 2020. **11**(1): p. 1-8.
35. Haber, A.I., N.A. Steinhauer, and D. vanEngelsdorp, *Use of Chemical and Nonchemical Methods for the Control of Varroa destructor (Acari: Varroidae) and Associated Winter Colony Losses in U.S. Beekeeping Operations*. Journal of Economic Entomology, 2019. **112**(4): p. 1509-1525.

36. Medici, S.K., et al., *The presence of synthetic acaricides in beeswax and its influence on the development of resistance in Varroa destructor*. Journal of Apicultural Research, 2016. **54**(3): p. 267-274.
37. Lodesani, M., M. Colombo, and M. Spreafico, *Ineffectiveness of Apistan treatment against the mite Varroa jacobsoni Oud in several districts of Lombardy (Italy)*. Apidologie, 1995. **26**: p. 67-72.
38. Maggi, M.D., et al., *Susceptibility of Varroa destructor (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: Varroa mites' potential to develop acaricide resistance*. Parasitology Research, 2011. **108**(4): p. 815-821.
39. Rodríguez-Dehaibes, S.R., et al., *Resistance to amitraz and flumethrin in Varroa destructor populations from Veracruz, Mexico*. Journal of Apicultural Research, 2015. **44**(3): p. 124-125.
40. Martin, S.J., *Acaricide (pyrethroid) resistance in Varroa destructor*. Bee World, 2015. **85**(4): p. 67-69.
41. Rinkevich, F.D., *Detection of amitraz resistance and reduced treatment efficacy in the Varroa Mite, Varroa destructor, within commercial beekeeping operations*. PLoS One, 2020. **15**(1): p. e0227264.
42. Maggi, M.D., et al., *First detection of Varroa destructor resistance to coumaphos in Argentina*. Experimental and Applied Acarology, 2009. **47**(4): p. 317-320.
43. Mitton, G.A., et al., *First record of resistance to flumethrin in a varroa population from Uruguay*. Journal of Apicultural Research, 2016. **55**(5): p. 422-427.
44. Ministerio de Ganadería, A.y.P. *Vademécum de productos veterinarios habilitados en Uruguay*. Último acceso: 24 de enero de 2023. <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2%2Ctramites-en-linea-no-regist%2Caplicaciones-externas-dilave-consulta-de-vademecum-no-registrado%2CO%2Ces%2C0%2C>.
45. Milani, N., *The resistance of Varroa jacobsoni Oud to pyrethroids: a laboratory assay*. Apidologie, 1995. **26**: p. 415-429.
46. Wallner, K., *Varroacides and their residues in bee products*. Apidologie, 1999. **30**: p. 235-248.
47. Bogdanov, S., *Contaminants of bee products*. Apidologie, 2005. **37**(1): p. 1-18.
48. Orantes-Bermejo, F.J., et al., *Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (Apis mellifera L.) in Spain. Possible*

- implications for bee losses*. Journal of Apicultural Research, 2015. **49**(3): p. 243-250.
49. Imdorf, A., et al., *Use of essential oils for the control of Varroa jacobsoni Oud. in honey bee colonies*. Apidologie, 1999. **30**(2-3): p. 209-228.
  50. Umpiérrez, M.L., et al., *Essential oil from Eupatorium buniifolium leaves as potential varroacide*. Parasitology Research, 2013. **112**: p. 3389-3400.
  51. Saroj, A., et al., *Phytochemicals of Plant-Derived Essential Oils*, in *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*, C. Egbuna and B. Sawicka, Editors. 2020, Academic Press. p. 65-79.
  52. Eguaras, M., et al., *A new product with formic acid for Varroa jacobsoni Oud. control in Argentina. I. Efficacy*. Journal of Veterinary Medicine Series B, 2001. **48**(1): p. 11-14.
  53. Kraus, B. and S. Berg, *Effect of a lactic acid treatment during winter in temperate climate upon Varroa jacobsoni Oud. and the bee (Apis mellifera L.) colony*. Experimental and Applied Acarology, 1994. **18**: p. 459-468.
  54. Maggi, M., N. Damiani, and e. al, *The susceptibility of Varroa destructor against oxalic acid*. Bulletin of Insectology, 2017. **70**(1): p. 39-44.
  55. Rademacher, E. and M. Harz, *Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies – a review*. Apidologie, 2006. **37**(1): p. 98-120.
  56. Bakkali, F., et al., *Biological effects of essential oils - a review*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**(2): p. 446-475.
  57. Isman, M.B., *Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world*. Annual Review of Entomology, 2006. **51**: p. 45-66.
  58. Regnault-Roger, C., C. Vincent, and J.T. Arnason, *Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world*. Annual Review of Entomology, 2012. **57**: p. 405-424.
  59. Tutun, H., N. Koç, and A. Kart, *Plant Essential Oils Used Against Some Bee Diseases*. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 2018. **6**(1): p. 34-45,.
  60. Nerio, L.S., J. Olivero-Verbel, and E. Stashenko, *Repellent activity of essential oils: a review*. Bioresource Technology, 2010. **101**(1): p. 372-8.
  61. Aglagane, A., et al., *Essential oils as sustainable control agents against Varroa destructor (Acari, Varroidae), an ectoparasitic mite of the western honeybees*



- Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): Review of recent literature (2010-onwards). International Journal of Acarology, 2021. **47**(5): p. 436-445.
62. Umpiérrez, M.L., et al., *Plant essential oils as potential control agents of varroaosis*. Phytochemistry Reviews, 2010. **10**(2): p. 227-244.
  63. Marchesi, E. and P. Davies, *Especies vegetales autóctonas e introducidas presentes en el territorio de Uruguay consideradas como aromáticas y/o medicinales en relación con los datos de uso popular*, in *Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas 2014*: Montevideo.
  64. Ventoso, A., *Guía de identificación de especies arbóreas nativas de Uruguay*. 2014, Montevideo: Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA).
  65. Ruffinengo, S., et al., *LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on Varroa destructor*. Journal of Economic Entomology, 2005. **98**(3): p. 651-655.
  66. Guala, M.S., et al., *Rose Pepper (Schinus molle L.) Oils*, in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, V. Preedy, Editor. 2016, Academic Print. p. 689-695.
  67. Ruffinengo, S.R., et al., *Bioactivity of microencapsulated essentials oils and perspectives of their use in the control of Varroa destructor*. Bulletin of Insectology, 2014. **67**(1): p. 81-86.
  68. Huamán, N. and G. Silva, *Acaricidal effect of essential oil from molle (Schinus molle) in the control of Varroa destructor in bee (Apis mellifera) hives*. Agroindustrial Science, 2020. **10**(2): p. 145-151.
  69. Guala, M.S., et al., *Efecto acaricida del aceite esencial de Aguaribay (Schinus molle L.) y sus fracciones en colmenares de abejas (Apis Mellifera) en relación con la composición química*. Información tecnológica, 2014. **25**(2): p. 151-156.
  70. Gregorc, A. and I. Planinc, *The Control of Varroa destructor in Honey Bee Colonies Using the Thymol-based Acaricide – Apiguard*. American Bee Journal, 2005. **145**(8): p. 672-675.
  71. Brasesco, C., et al., *Assessing in Vitro Acaricidal Effect and Joint Action of a Binary Mixture Between Essential Oil Compounds (Thymol, Phellandrene, Eucalyptol, Cinnamaldehyde, Myrcene, Carvacrol) Over Ectoparasitic Mite*

- Varroa Destructor* (Acari: Varroidae). Journal of Apicultural Science, 2017. **61**(2): p. 203-215.
72. Santos, E., *Timol en las Colmenas, una buena práctica en la agricultura familiar uruguaya, para el desarrollo de pequeños y medianos productores*, in *XII Congreso Latinoamericano de Apicultura*. 2016: La Habana, Cuba.
73. Ministerio de Ganadería, A.y.P. *Vademécum de productos veterinarios habilitados en Uruguay: Aluén CAP*. Último acceso: 24 de enero de 2023 [http://www.mgap.gub.uy/bpm/dilave\\_productosveterinarios\\_vademecum\\_esp.aspx?DSP,2016A00344](http://www.mgap.gub.uy/bpm/dilave_productosveterinarios_vademecum_esp.aspx?DSP,2016A00344) ].
74. Ministerio de Ganadería, A.y.P. *Vademécum de productos veterinarios habilitados en Uruguay: Varroxsan*. Último acceso: 24 de enero de 2023 [http://www.mgap.gub.uy/bpm/dilave\\_productosveterinarios\\_vademecum\\_esp.aspx?DSP,2020A00822](http://www.mgap.gub.uy/bpm/dilave_productosveterinarios_vademecum_esp.aspx?DSP,2020A00822)].
75. Glavan, G., et al., *Comparison of sublethal effects of natural acaricides carvacrol and thymol on honeybees*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020. **166**.
76. Rossini, C., et al., *Sub-lethal effects of the consumption of Eupatorium buniifolium essential oil in honeybees*. PLoS One, 2020. **15**(11): p. e0241666.
77. Tihelka, E., *Effects of synthetic and organic acaricides on honey bee health: a review*. Slovenian Veterinary Research, 2018. **55**(3).
78. Bonnafé, E., et al., *Monoterpenoid-based preparations in beehives affect learning, memory, and gene expression in the bee brain*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2017. **36**(2): p. 337-345.
79. Rachersberger, M., et al., *Honeybee Pollinators Use Visual and Floral Scent Cues to Find Apple (Malus domestica) Flowers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019. **67**(48): p. 13221-13227.
80. Wright, G.A. and F.P. Schiestl, *The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards*. Functional Ecology, 2009. **23**(5): p. 841-851.
81. Reinhard, J., M.V. Srinivasan, and S.W. Zhang, *Scent triggered navigation in honeybees*. Nature, 2004. **427**: p. 411.
82. Knudsen, J.T., et al., *Diversity and Distribution of Floral Scent*. The Botanical Review, 2006. **72**(1): p. 1-120.

83. Mena Granero, A., et al., *Analysis of biogenic volatile organic compounds in zucchini flowers: identification of scent sources*. *Journal of Chemical Ecology*, 2005. **31**(10): p. 2309-2322.
84. Schiestl, F.P. and E. Marion- Poll, *Detection of physiologically active flower volatiles using gas chromatography coupled with electroantennography*, in *Analysis of Taste and Aroma. Molecular Methods of Plant Analysis*, J.F. Jackson and H.F. Linskens, Editors. 2002, Springer: Berlin, Heidelberg. p. 173-198.
85. Reinhard, J. and M.V. Srinivasan, *The Role of Scents in Honey Bee Foraging and Recruitment*, in *Food exploitation by Social Insects: An Ecological, Behavioral, and Theoretical Approach*, S. Jarau and M. Hrncir, Editors. 2009, CRC-Press Boca Raton. p. 165-182.
86. Kelber, C., W. Rössler, and C.J. Kleineidam, *Multiple Olfactory Receptor Neurons and Their Axonal Projections in the Antennal Lobe of the Honeybee *Apis mellifera**. *Journal of Comparative Neurology*, 2006. **496**(3): p. 395-405.
87. Jacquin-Joly, E. and C. Merlin, *Insect olfactory receptors: contributions of molecular biology to chemical ecology* *Journal of Chemical Ecology*, 2004. **30**(12): p. 2359-2397.
88. Sato, K. and K. Touhara, *Insect Olfaction: Receptors, Signal Transduction, and Behavior*, in *Chemosensory Systems in Mammals, Fishes, and Insects*, W. Meyerhof and S. Korsching, Editors. 2009, Springer. p. 121-138.
89. Galizia, G. and W. Rossler, *Parallel olfactory systems in insects: Anatomy and Function*. *Annual Review of Entomology*, 2010. **55**: p. 399-420.
90. Sandoz, J.C., *Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees*. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 2011. **5**: p. 1-20.
91. Syntech, *Electroantennography: a practical introduction*. 2015: Kirchzarten, Germany.
92. Torto, B., et al., *Standard methods for chemical ecology research in *Apis mellifera**. *Journal of Apicultural Research*, 2015. **52**(4): p. 1-34.
93. Giurfa, M. and J.C. Sandoz, *Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees*. *Learning & Memory*, 2012. **19**(2): p. 54-66.

94. Takeda, K., *Classical conditioned response in the honey bee*. Journal of Insect Physiology, 1961. **6**: p. 168-179.
95. Hammer, M. and R. Menzel, *Learning and memory in the honeybee*. The Journal of Neuroscience, 1995. **15**(3): p. 1617-1630.
96. Smith, B.H. and C.M. Burden, *A proboscis extension response protocol for investigating behavioral plasticity in insects: application to basic, biomedical, and agricultural research*. Journal of Visualized Experiments, 2014(91): p. e51057.
97. Desneux, N., A. Decourtye, and J.M. Delpuech, *The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods*. Annual Review of Entomology, 2007. **52**: p. 81-106.
98. Thompson, H.M., *Behavioural effects of pesticides in bees- their potential for use in risk assesment*. Ecotoxicology, 2002. **12**: p. 317-330.
99. Decourtye, A., E. Lacassie, and M.H. Pham-Delegue, *Learning performances of honeybees (Apis mellifera L) are differentially affected by imidacloprid according to the season*. Pest Management Science, 2003. **59**(3): p. 269-78.
100. Taylor, K., G.D. Waller, and L.A. Crowder, *Impairment of classical conditioned response of the honey bee by sublethal doses of synthetic pyrethroid insecticides*. Apidologie, 1987. **18**(3): p. 243-252.
101. Williamson, S.M. and G.A. Wright, *Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees*. The Journal of Experimental Biology, 2013. **216**(10): p. 1799-1807.
102. El Hassani, A.K., et al., *Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (Apis mellifera)*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2008. **54**(4): p. 653-661.
103. Aliouane, Y., et al., *Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides effects on behavior* Environmental Toxicology and Chemistry, 2008. **28**(1): p. 113-122.
104. Decourtye, A., et al., *Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (Apis mellifera L.)*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2004. **78**(2): p. 83-92.
105. Gashout, H.A., et al., *Impact of sublethal exposure to synthetic and natural acaricides on honey bee (Apis mellifera) memory and expression of genes related to memory*. Journal of Insect Physiology, 2020. **121**: p. 104014.

106. Bonnafé, E., et al., *Effect of a thymol application on olfactory memory and gene expression levels in the brain of the honeybee Apis mellifera*. Environmental Science and Pollution Research, 2015. **22**(11): p. 8022-8030.
107. Lim, S., et al., *Abdominal contact of fluvalinate induces olfactory deficit in Apis mellifera*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020. **164**: p. 221-227.
108. Chapuy, C., et al., *Thymol Affects Congruency Between Olfactory and Gustatory Stimuli in Bees*. Scientific Reports, 2019. **9**: p. 7752.
109. Scheiner, R., et al., *Standard methods for behavioural studies of Apis mellifera*. Journal of Apicultural Research, 2015. **52**(4): p. 1-58.
110. Decourtye, A., et al., *Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004. **57**(3): p. 410-419.
111. Umpiérrez, M.L., *Aceites esenciales de la flora local como alternativa de control integral a plagas y enfermedades del tomate*. 2021, Universidad de la República: Montevideo.
112. Wallace, W.E., *Retention Indices*, in *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*, P.J. Linstrom and W.G. Mallard, Editors.: National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899.
113. Adams, R.P., *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 2007, Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
114. Van Den Dool, H. and P.D. Kratz, *A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography*. Journal of Chromatography, 1963. **11**: p. 463-471.
115. Lindberg, C.M., A.P. Melathopoulos, and M.L. Winston, *Laboratory evaluation of miticides to control Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite*. J Econ Entomol, 2000. **93**(2): p. 189-98.
116. Olsson, S.B. and B.S. Hansson, *Electroantennogram and single sensillum recording in insect antennae*. Methods in Molecular Biology, 2013. **1068**: p. 157-177.
117. Anfora, G., et al., *Behavioural and electrophysiological lateralization in a social (Apis mellifera) but not in a non-social (Osmia cornuta) species of bee*. Behavioural Brain Research, 2010. **206**(2): p. 236-239.

118. Mas, F., et al., *Selection of key floral scent compounds from fruit and vegetable crops by honey bees depends on sensory capacity and experience*. Journal of Insect Physiology, 2020. **121**: p. 104002.
119. Henning, J.A. and L.R. Teuber, *Combined Gas Chromatography-Electroantennogram alfalfa floral volatiles*. Entomological Society of America, 1992. **85**(1): p. 226–232.
120. Mengoni Goñalons, C. and W.M. Farina, *Effects of Sublethal Doses of Imidacloprid on Young Adult Honeybee Behaviour*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140814.
121. Lorenzo, D., et al., *Application of Multidimensional Gas Chromatography to the Enantioselective Characterisation of the Essential Oil of Eupatorium buniifolium Hooker et Arnott*. Phytochemical Analysis, 2005. **16**: p. 39-44.
122. Rossini, C., et al., *Essential Oils from Leaves of Schinus molle and S. lentiscifolius of Uruguayan Origin*. Journal of Essential Oil Research, 1996. **8**(1): p. 71-73.
123. Miresmailli, S., R. Bradbury, and M.B. Isman, *Comparative toxicity of Rosmarinus officinalis L. essential oil and blends of its major constituents against Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants*. Pest Management Science, 2006. **62**(4): p. 366-71.
124. Abdelgaleil, S.A.M., et al., *Acaricidal activity, biochemical effects and molecular docking of some monoterpenes against two-spotted spider mite (Tetranychus urticae Koch)*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019. **156**: p. 105-115.
125. Gende, L., et al., *Antimicrobial and miticide activities of Eucalyptus globulus essential oils obtained from different Argentine regions*. Spanish Journal of Agricultural Research, 2010. **8**(3): p. 642-650.
126. Deveci, O., et al., *Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of Schinus molle L.* Journal of Medicinal Plants Research 2010. **4**(21): p. 2211-2216.
127. Tabari, M.A., et al., *Acaricidal properties of hemp (Cannabis sativa L.) essential oil against Dermanyssus gallinae and Hyalomma dromedarii*. Industrial Crops and Products, 2020. **147**: p. 112238.
128. Torres, F.C., et al., *Influence of Essential Oil Fractionation by Vacuum Distillation on Acaricidal Activity Against the Cattle Tick*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2012. **55**(4): p. 613-621.

129. Abdel-Sattar, E., et al., *Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of Schinus molle L. leaf and fruit essential oils against Trogoderma granarium and Tribolium castaneum*. Natural Product Research, 2010. **24**(3): p. 226-35.
130. Sánchez Chopa, C., R. Alzogaray, and A. Ferrero, *Repellency Assays with Schinus molle var. areira (L.) (Anacardiaceae) Essential Oils against Blattella germanica L. (Blattodea: Blattellidae)*. BioAssay, 2006. **1**(6).
131. Hayouni el, A., et al., *Tunisian Salvia officinalis L. and Schinus molle L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against Salmonella inoculated in minced beef meat*. International Journal of Food Microbiology, 2008. **125**(3): p. 242-51.
132. Wadhams, L.J., et al., *Discrimination of oilseed rape volatiles by honey bee: Novel combined gas chromatographic-electrophysiological behavioral assay*. Journal of Chemical Ecology, 1994. **20**(12): p. 3221-31.
133. Williams, G.R., et al., *Standard methods for maintaining adult Apis mellifera in cages under in vitro laboratory conditions*. Journal of Apicultural Research, 2015. **52**(1): p. 1-36.
134. Thiery, D., et al., *Sunflower aroma detection by the honeybee : Study by coupling gas chromatography and electroantennography*. J Chem Ecol, 1990. **16**(3): p. 701-711.
135. De Jong, R. and M.H. Pham-Delègue, *Electroantennogram responses related to olfactory conditioning in the honey bee (Apis mellifera ligustica)*. Journal of Insect Physiology, 1991. **37**(4): p. 319–324.
136. Claudianos, C., et al., *Odor memories regulate olfactory receptor expression in the sensory periphery*. European Journal of Neuroscience, 2014. **39**(10): p. 1642-1654.

## APÉNDICE

**Tabla 1.** Composición química del AE *E. buniifolium* 2016, compuestos cuya área consistió en al menos 0.1 % de la corriente iónica total (TIC). Datos obtenidos por GC-MS con columna Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m; Restek).

Compuesto	IRL base de datos	IRL calcul.	Simil. (%)	Área (%)
$\alpha$ -Tujeno	924	922	94	0.5
$\alpha$ -Pinoeno	932	929	96	8.6
Canfeno	946	945	95	1.1
Sabineno	969	972	93	4.3
$\beta$ -Pinoeno	974	976	95	4.3
$\beta$ -Mirceno	988	991	93	1.9
$\alpha$ -Terpinoeno	1014	1018	93	0.3
Cimeno	1020	1027	91	0.1
D-Limoneno	1024	1031	92	3.5
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimeno	1044	1050	95	2.2
$\gamma$ -Terpinoeno	1054	1062	95	0.4
Terpinoleno	1086	1092	93	0.7
Terpinen-4-ol	1174	1182	88	0.2
$\delta$ -Elemeno	1335	1344	93	1.3
$\alpha$ -Copaeno	1374	1383	91	0.2
NI	-	1391	-	0.6
$\beta$ -Elemeno	1389	1398	94	7.8
NI	-	1401	-	0.1
$\beta$ -Cariofileno	1417	1429	96	3.5
$\beta$ -Copaeno	1430	1439	85	0.1
$\gamma$ -Elemeno	1434	1441	89	0.2
$\alpha$ -Guaieno	1437	1447	94	0.9
6,9-Guaiadieno	1442	1452	90	0.8
( <i>E</i> )-muurolo 3,5-dieno	1451	1460	87	0.5
$\alpha$ -Cariofileno	1452	1465	95	1.0
NI	-	1471	-	0.2
( <i>E</i> )-9-Epi-cariofileno	1464	1473	89	0.2
NI	-	1474	-	0.1
Dauca-5,8-dieno	1471	1485	87	0.1
NI	-	1487	-	0.5
$\gamma$ -Muuroloeno	1477	1487	89	0.6
Germacreno-D	1481	1493	93	11.6
$\beta$ -Selineno	1486	1499	93	1.4



NI	-	1502	-	0.4
NI	-	1506	-	0.8
$\alpha$ -Selineno	1494	1508	90	1.5
Biciclogermacreno	1495	1509	93	2.4
$\alpha$ -Muuroleno	1499	1511	92	1.1
NI	-	1518	-	10.1
$\gamma$ -Cadineno	1513	1526	93	1.1
$\delta$ -Cadineno	1522	1534	92	3.1
NI	-	1542	-	0.2
NI	-	1543	-	0.1
$\alpha$ -Cadineno	1537	1548	89	0.3
NI	-	1553	-	0.1
NI	-	1553	-	0.1
Elemol	1548	1559	91	0.8
Germacreno-B	1559	1569	93	2.4
NI	-	1573	-	0.2
NI	-	1577	-	0.1
NI	-	1583	-	0.1
NI	-	1586	-	0.5
Espatulenol	1577	1590	90	0.5
Óxido de cariofileno	1582	1595	87	0.4
NI	-	1598	-	0.5
NI	-	1604	-	0.2
NI	-	1607	-	0.1
NI	-	1617	-	0.4
NI	-	1627	-	1.4
NI	-	1632	-	0.1
NI	-	1633	-	0.3
NI	-	1641	-	0.5
$\gamma$ -Eudesmol	1631	1645	87	0.2
NI	-	1654	-	0.5
NI	-	1654	-	0.5
NI	-	1659	-	0.3
$\beta$ -Eudesmol	1649	1665	92	0.6
NI	-	1668	-	2.1
NI	-	1673	-	0.2
NI	-	1676	-	0.1
NI	-	1691	-	0.8
NI	-	1699	-	1.6
NI	-	1703	-	0.2

Siobunol	1701	1707	89	1.0
NI	-	1712	-	0.5
NI	-	1721	-	0.2
NI	-	1722	-	0.1
NI	-	2021	-	0.1

**Tabla 2.** Composición química del AE *E. buniifolium* 2021-2022, compuestos cuya área consistió en al menos 0.1 % de la corriente iónica total (TIC). Datos obtenidos por GC-MS con columna Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m; Restek).

Compuesto	IRL base de datos	IRL calcul.	Simil. (%)	Área (%)
$\alpha$ -Tujeno	924	921	93	0.7
$\alpha$ -Pino	932	928	93	14.4
Canfeno	946	944	96	2.0
Sabineno	969	971	93	6.5
$\beta$ -Pino	974	975	95	7.0
$\beta$ -Mirceno	988	991	94	2.9
$\delta$ -2-Careno	1001	1001	93	0.2
$\alpha$ -Terpineno	1014	1017	88	0.2
Cimeno	1020	1026	93	0.2
D-Limoneno	1024	1030	93	5.6
$\beta$ -( <i>E</i> )-Ocimeno	1044	1049	94	3.8
$\gamma$ -Terpineno	1054	1061	92	0.3
Terpinoleno	1086	1091	94	0.8
Terpinen-4-ol	1174	1181	91	0.2
$\delta$ -Elemeno	1335	1343	94	0.9
NI	-	1390	-	0.4
$\beta$ -Elemeno	1389	1397	94	7.0
NI	-	1400	-	0.1
$\beta$ -Cariofileno	1417	1428	96	3.4
$\gamma$ -Elemeno	1434	1440	85	0.2
$\alpha$ -Guaieno	1437	1446	88	0.6
6,9-Guaiadieno	1442	1451	91	0.5
( <i>E</i> )-Muurolo 3,5-dieno	1448	1459	84	0.3
$\alpha$ -Cariofileno	1452	1464	94	0.7
NI	-	1470	-	0.2
9-epi-cariofileno	1464	1472	87	0.2
$\gamma$ -Muurolo	1477	1486	90	0.7
Germacreno-D	1481	1492	94	10.1
$\beta$ -Selineno	1486	1498	91	0.8

NI	-	1501	-	0.3
NI	-	1505	-	0.4
$\alpha$ -Selineno	1494	1507	89	1.0
Biciclogermacreno	1500	1508	88	1.7
$\alpha$ -Muuroleno	1500	1510	87	0.5
Ni	-	1517	-	9.1
$\gamma$ -Cadineno	1513	1525	92	0.8
$\delta$ -Cadineno	1522	1533	92	2.2
NI	-	1541	-	0.2
$\alpha$ -Cadineno	1537	1548	82	0.2
Elemol	1548	1558	90	0.6
Germacreno-B	1559	1569	94	2.3
NI	-	1572	-	0.1
NI	-	1582	-	0.2
Germacreno D-4-ol	1574	1586	83	0.6
Espatulanol	1577	1589	87	0.3
NI	-	1595	-	0.2
Viridiflorol	1592	1597	85	0.4
NI	-	1603	-	0.2
NI	-	1617	-	0.1
NI	-	1626	-	1.0
NI	-	1632	-	0.4
Isoespatulanol	1638	1640	88	0.5
Hinesol	1640	1644	85	0.1
$\tau$ -Cadinol	1640	1653	84	0.6
NI	-	1658	-	0.1
$\beta$ -Eudesmol	1649	1664	84	0.3
NI	-	1667	-	1.2
NI	-	1690	-	0.5
NI	-	1698	-	0.9
Siobunol	1701	1706	89	0.9
NI	-	1712	-	0.3

**Tabla 3.** Composición química del AE *S. molle* 2021-2022, compuestos cuya área consistió en al menos 0.1 % de la corriente iónica total (TIC). Datos obtenidos por GC-MS con columna Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m; Restek).

Compuesto	IRL base de datos	IRL calcul.	Simil. (%)	Área (%)
Triciclono	921	916	92	0.1
$\alpha$ -Tujeno	924	921	94	0.5
$\alpha$ -Pineno	932	929	96	19.2
Canfeno	946	945	96	0.6
Sabineno	969	972	93	10.8
$\beta$ -Pineno	974	976	95	16.5
$\beta$ -Mirceno	988	991	94	4.6
$\alpha$ -Felandreno	1002	1005	93	0.2
$\alpha$ -Terpineno	1014	1018	94	0.7
Cimeno	1020	1026	94	0.3
Limoneno	1024	1030	92	14.4
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimeno	1044	1050	93	0.4
$\gamma$ -Terpineno	1054	1061	96	1.2
Terpinoleno	1086	1091	94	0.3
Terpinen-4-ol	1174	1181	95	1.2
$\alpha$ -Terpineol	1186	1194	86	0.1
$\alpha$ -Copaeno	1374	1382	90	0.1
$\beta$ -Elemeno	1389	1397	89	0.1
$\beta$ -Cariofileno	1417	1428	96	3.8
Aromadendreno	1439	1449	91	0.1
$\alpha$ -Cariofileno	1452	1464	95	0.3
Alloaromadendreno	1461	1472	95	0.8
Germacreno-D	1481	1492	94	2.7
Biciclogermacreno	1500	1508	92	9.8
NI	-	1518	-	0.2
NI	-	1518	-	0.2
$\gamma$ -Cadineno	1513	1525	93	1.2
$\delta$ -Cadineno	1522	1533	92	0.8
( <i>E</i> )-Nerolidol	1561	1569	84	0.2
Espatulanol	1577	1589	87	2.7
NI	-	1594	-	2.1
Viridiflorol	1592	1603	84	0.2
NI	-	1609	-	0.1
NI	-	1615	-	0.3
NI, sesquiterpeno oxigenado	-	1621	-	0.2

Epi-Cubenol o Di-epi-1,10-				
cubenol	1627	1626	87	0.5
$\tau$ -Cadinol	1640	1652	94	2.3
$\alpha$ -Cadinol	1652	1667	86	0.1

IRL: índice de retención lineal. Simil. (%): porcentaje de similitud del espectro obtenido respecto a los espectros disponibles en las bases de datos de espectros de masas [NIST 08, NIST 17 [112] y Adams [113]]. Área (%): % de área de la corriente iónica total (TIC), obtenida por normalización simple de área. NI: compuesto no identificado.