

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTAL



TRABAJO FINAL DE CARRERA

**“BIOENSAYO DE SUPERVIVENCIA EN ESTADÍO ADULTO DE ABEJA
MELÍFERA (*Apis mellifera*, L.) A CONCENTRACIONES CRECIENTES DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*, COMO POTENCIAL AGENTE
DE CONTROL ANTIMICROBIANO”**

Autor: KLING, Ada María.

Directora: Ing. Agr. VEGA, Maricel.

Codirectora: Dra. Ing. Agr. ALBO, Graciela Noemí.

Fecha de entrega: 23-03-2022.

2022

ÍNDICE.

1.- RESUMEN.	3
1.1.- PALABRAS CLAVE.	3
1.2.- AGRADECIMIENTOS.	3
1.3.- PUBLICACIONES Y/O BECAS VINCULADAS AL TRABAJO FINAL.	4
1.3.1. Publicaciones.	4
1.3.2. Becas.	4
2. INTRODUCCIÓN.	6
2.1.- Apicultura a nivel mundial.	6
2.2.- La apicultura en Argentina.	6
2.3.- Importancia de los polinizadores.	7
2.4.- La influencia de la abeja melífera en los agroecosistemas	8
2.5.-Fitoquímicos, una estrategia para el control de enfermedades en la abeja melífera.	9
2.6.- Aceite esencial seleccionado para este estudio.	10
2.7.- Objetivo General.	11
2.8.- Objetivos Específicos.	12
2.9.-Hipótesis.	12
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.	12
3.2.- Ensayos preliminares de la unidad de confinamiento.	13
3.3.- Preparación de la unidad experimental.	13
3.4.- Procedimiento.	14
3.5.- Ensayo de consumo y supervivencia frente al AE de M.mollis.	14
3.6.- Análisis estadístico.	15
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	15
4.1.- Supervivencia.	16
4.2.- Consumo del AE de M. mollis.	16
5.- CONCLUSIONES Y/O RECOMENDACIONES.	19
6.- BIBLIOGRAFÍA.	20
7.- APÉNDICE.	28

1.- RESUMEN.

Se evaluó el efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb., "Peperina" en la supervivencia de la abeja melífera adulta (*Apis mellifera* L.), bajo un régimen de administración oral prolongada a concentraciones crecientes, con el propósito de obtener la concentración más segura para su empleo como potencial agente de biocontrol de patógenos en la colonia de abeja melífera. Se evaluaron concentraciones: 500, 1.000, 2.000 y 4.000 µl/l, con cuatro repeticiones por tratamiento. Se empleó 2,5% de alcohol 70° como diluyente en solución de sacarosa 50% p/v. Abejas de 3 días, nacidas en cautiverio se confinaron a razón de 30 abejas por frasco y se suministró el tratamiento durante 15 días. Se registró el número de abejas muertas y el consumo. Los resultados se analizaron con los softwares estadísticos INFOSTAT y GraphPad Prism. A partir del séptimo día del experimento, el aceite esencial de *M. mollis* presentó una supervivencia inferior al 50% a las concentraciones evaluadas y diferencias significativas en el consumo individual. El aceite esencial de *M. mollis* resultó tóxico en todas las concentraciones evaluadas, aún a la administración de 500 µl/l.

1.1.- PALABRAS CLAVE.

Minthostachys mollis; ACEITES ESENCIALES; BIOCONTROL; *Apis mellifera* L.

1.2.- AGRADECIMIENTOS.

A mi directora Maricel y Codirectora Graciela, por el tiempo dedicado, los conocimientos brindados y por acompañarme a lo largo de todo este proceso.

A mis compañeros de equipo, Tano, Daniel y Leandro, que sin ellos no hubiera sido posible llevar a cabo esta investigación.

A Rodrigo Altamirano, Miguel Juárez y la Dra. C. Van Baren por todo su aporte en este trabajo.

A mis evaluadoras Cecilia y Sonia, por compartir sus conocimientos.

A mis padres, tío y padrino, por su amor, acompañarme día a día y hacer posible este sueño.

A Mariano, mi compañero de vida, por su amor incondicional, su apoyo diario, y confiar siempre en mí.

A mis amigas y a cada una de sus familias, por brindarme su ayuda y contención en todo momento.

A la flia. Maida por su cariño y ayuda incondicional en muchos momentos a lo largo de mis estudios.

A Dolores y Guillermo, por su apoyo durante mis días en La Plata.

1.3.- PUBLICACIONES Y/O BECAS VINCULADAS AL TRABAJO FINAL.

1.3.1. Publicaciones.

- **Kling, A.**; Albo, G.N.; Lagos, L.G.; Leniz, D.; Vega, M. Supervivencia *in vitro* de *Apis mellifera* a la alimentación con aceite esencial de peperina como potencial fitoquímico de *Nosema ceranae*. Congreso Argentino de Apicultura 2021. Póster 2040. Disponible en: <https://congresosada.com/wp-content/uploads/2021/07/Libro-de-Resumenes-del-Congreso-Argentino-de-Apicultura-2021.pdf>
- Lagos, L.G.; Vega, M.; Grattoni, A.; **Kling, A.**; Albo, G.N. Efectos tóxicos de aceites esenciales de especies nativas sobre *Apis mellifera* para el control de *Nosema ceranae*. Congreso Argentino de Apicultura 2021. Póster 2041. Disponible en: <https://congresosada.com/wp-content/uploads/2021/07/Libro-de-Resumenes-del-Congreso-Argentino-de-Apicultura-2021.pdf>

1.3.2. Becas.

- 2021. Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas. Estudiar la actividad antiparasitaria de los aceites esenciales (AE) de *Mintostachys mollis* y *Cymbopogon citratus* sobre estadíos larval y adulto de abeja melífera (*Apis mellifera*, L.), como potencial control del hongo microsporidio *Nosema* spp.” Consejo Interuniversitario Nacional. Res. P. N° 1612/21.
- 2020. Beca Departamental. Programa Participación Estudiantil en Proyectos de Investigación y Extensión. Empleo de fitoquímicos en el control *in vitro* de nosemosis en abeja melífera. Facultad de Ciencias

Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Res. CA 039.
18/02/2020.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1.- Apicultura a nivel mundial.

En lo que respecta a la producción mundial de miel, China se posiciona como el primer productor mundial. A continuación, le siguen en importancia la Unión Europea (UE), Turquía, Canadá y Argentina con una producción de 79.000 toneladas (Tn) correspondiente al 4% del total (European Commission, 2021). China, también se posiciona como principal exportador mundial de miel, seguida por Argentina, mientras que México, India, Vietnam y Ucrania, compiten por el tercer lugar (Global export data, 2020). El principal país importador de miel es Estados Unidos, siendo a su vez, el consumidor más importante de la UE; su elevado consumo se debe a que la miel se destina principalmente a la industria; otros países importantes en cuanto a la importación de miel son: Alemania, Reino Unido y Japón (FAO, 2020).

A partir de datos de producción y población de FAOSTAT (FAOSTAT, 2016), se conoce el consumo per cápita de miel promedio hasta 2016: países como Japón y Estados Unidos alcanzan el kilo por habitante/año; Turquía y Alemania superan el kilo de miel por habitante/año, mientras que China, México e India se encuentran en un rango de 50 y 250 gramos/habitante/año.

2.2.- La apicultura en Argentina.

La apicultura ocupa un lugar destacado en la producción agropecuaria de nuestro país y tiene un fuerte impacto en las economías locales. Se estima que el sector apícola de Argentina emplea a más de 100.000 personas, tanto en la producción primaria de miel, como de otros productos de la colmena, entre ellos: propóleos, polen, cera, jalea, apitoxina, material vivo, etc.; y servicios de la colmena, como la polinización (MAGyP, 2021).

Según el Registro Nacional de Productores Apícolas (RENAPA), hasta abril de 2021 existían 15.306 productores vigentes que manejan 33.477 apiarios, con 2.729.941 colmenas (MAGyP, 2021). También, el sector cuenta con un total de 1.209 salas de extracción de miel habilitadas por el SENASA (SENASA, 2021)

donde se extraen aproximadamente 76.000 Tn de miel por año, de las que se destinan al mercado interno un volumen cercano a las 6.000 Tn. El consumo de miel por habitante/año en nuestro país es de 156 g (MAGyP, 2021).

Es importante destacar que la miel producida en nuestro país es considerada como una de las de mejor calidad en el mundo, es así, que la Argentina destina más del 95% de la producción al mercado externo y según el análisis sobre los complejos exportadores del INDEC, en el 2020 por las exportaciones de miel ingresaron 152 millones de dólares, siendo los principales destinos Estados Unidos, Alemania y Japón (INDEC, 2020).

2.3.- Importancia de los polinizadores.

La mayoría de las angiospermas (plantas con flores) dependen de la polinización entomófila; por eso, para este grupo de plantas el orden de insectos polinizadores Hymenoptera es el de mayor importancia. Estos insectos polinizan de manera regular y eficiente a las flores, gracias a adaptaciones mutuas, morfológicas y de comportamiento, que surgieron a lo largo de su coevolución e interacción mutualista, de la que ambas partes se benefician (Ollerton, 1999). Dentro del orden, la superfamilia Apoidea contiene a los insectos que más se destacan, allí se encuentran las abejas melíferas (*A. mellifera* L.) que realizan la mayor parte de la actividad polinizadora dentro de los ecosistemas agrícolas y agroforestales (Carvajal, 2020). Más del 90% de los 114 principales tipos de cultivos globales, que garantizan la seguridad alimentaria en el mundo, son polinizados por abejas (Potts et al., 2016).

Alvites (2019) observó y describió la acción de los insectos en la polinización de plantas como palto, cítricos, zapallo, brócoli y alfalfa, concluyendo que el insecto que realiza más visitas en la mayoría de los cultivos observados era la abeja melífera.

En otros estudios se determinó que la polinización realizada por las abejas melíferas era muy importante; Santos et al., (2015) enuncia que, en el manzano con autoincompatibilidad genética cultivado en el sur de Uruguay, su polinización depende exclusivamente de las abejas melíferas, ya que es la única especie observada durante el periodo de floración.

Según David et al., (2020), en kiwi la polinización manual combinada con la de la abeja melífera incrementa tanto el número como el tamaño de los frutos a cosecha. Por un lado, el kiwi es una especie diclino dioica en la cual, el tamaño final del fruto está estrechamente relacionado con el número de semillas o de óvulos fecundados y se necesitan aproximadamente 1000 semillas para obtener un fruto de 100 gramos. Por lo tanto, es de suma importancia que muchos granos de polen puedan alcanzar cada flor femenina para lograr un fruto de tamaño adecuado para su comercialización.

En cuanto al girasol, es importante mencionar que es uno de los principales cultivos oleaginosos del mundo y nuestro país es actualmente uno de los tres grandes productores mundiales y el cuarto exportador mundial de aceite de girasol (FAOSTAT, 2016). Los cultivares de girasol en general presentan autogamia espontánea, pero aprovechan la polinización cruzada para formar y completar sus achenios y es aquí, que la mayoría de los estudios mencionan a la abeja melífera como el polinizador que visita con mayor frecuencia al girasol (Torretta et al., 2010).

2.4.- La influencia de la abeja melífera en los agroecosistemas

En Argentina, en los últimos quince años el área que anualmente se destina a la producción de cultivos se expandió un 55%. El crecimiento y transformación de la agricultura ha provocado la reducción de la diversidad biológica de las áreas más intensamente cultivadas de la región pampeana, que concentra el 70% del total de la producción apícola nacional (MAGyP, 2020).

Más allá de las pérdidas de biodiversidad, la agricultura extensiva actual genera una alteración del funcionamiento de los ecosistemas de regiones enteras, por lo que surge así la necesidad de encontrar caminos viables para proteger y restablecer alternativas ecosistémicas que complementen en tiempo y espacio a los cultivos, dando una respuesta a las amenazas para la salud de las abejas melíferas en el largo y corto plazo. A largo plazo, se debe involucrar la preservación de los ambientes naturales y un aumento en la disponibilidad de diversos recursos florales en ecosistemas agroproductivos. A corto plazo, el objetivo es reducir la rápida tasa de pérdida de colonias, minimizando el empleo

de plaguicidas de alta toxicidad y buscando alternativas de control de plagas eco-sustentables (Jobbágy et al., 2021).

2.5.-Fitoquímicos, una estrategia para el control de enfermedades en la abeja melífera.

El uso de sustancias fitoquímicas junto con enemigos naturales, microorganismos antagonistas para el control de plagas y enfermedades es una estrategia de manejo a implementar en los sistemas agrícolas que podría disminuir los problemas ambientales (Martínez & Luján, 2019).

Los fitoquímicos son productos derivados del metabolismo secundario de las plantas, con probadas propiedades antimicrobianas en enfermedades del hombre (Man et al., 2019) y los animales (Zhai et al., 2018). Dentro de los fitoquímicos se encuentran los aceites esenciales (AE) (Brzozowski & Mazourek, 2018). Los AE son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos a partir de materia vegetal (flores, capullos, semillas, hojas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces). Suelen ser mezclas complejas de compuestos naturales, tanto polares como no polares constituidos principalmente por terpenoides y sus derivados oxigenados, una variedad de otras moléculas, como hidrocarburos alifáticos, ácidos, alcoholes, aldehídos acíclicos, ésteres o lactonas, y excepcionalmente compuestos que contienen nitrógeno y azufre, cumarinas y homólogos de fenilpropanoides (Masango, 2005).

Los AE han recibido mucha atención como compuestos bioactivos potencialmente útiles, con especial énfasis en sus propiedades antisépticas, medicinales y por su actividad insecticida (Bakkali et al., 2008). Además, se han utilizado ampliamente como saborizantes alimenticios (Burt, 2004) y aditivos alimentarios (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Se emplean como agentes antimicrobianos en el control de distintas patologías (Wińska et al., 2019); utilizados en la concentración adecuada provocan bajo nivel de toxicidad, convirtiéndose en una alternativa atractiva para su empleo.

La clasificación de rangos de toxicidad para los AE propuesta por la International Commission for Bee Botany ICCB (ICCB, 1985) es la siguiente: virtualmente no tóxico (> 100 µg p.a./abeja); levemente tóxico (10 – 100 µg p.a./abeja);

moderadamente tóxico (1 – 10 µg p.a./abeja); altamente tóxico (< 1 µg p.a./abeja).

En particular, en Argentina, se encuentran una gran variedad de especies proveedoras de AE (Iannicelli et al., 2018). Los AE, se han estudiado ampliamente como tratamientos para las patologías de las abejas melíferas como Varroosis (Conti et al., 2020; Lin et al., 2020), Ascospaeriosis (Albo et al., 2016; Nardoni et al., 2018; Tutun et al., 2018), Loque americana *in vitro* (Alonso-Salces et al., 2017; Kačániová et al., 2020) y a campo (Albo et al., 2003; Gende et al., 2009) y Nosemosis (Porrini et al., 2017; Cristina et al., 2020).

Sin embargo, la información sobre los efectos de la administración sistémica prolongada de AE en la abeja melífera es limitada y metodológicamente heterogénea (Albo et al., 2003; Maistrello et al., 2008; Sammataro et al., 2009; Albo et al., 2010; Porrini et al., 2017; Borges et al., 2020). El amplio rango de actividad de estas sustancias podría controlar al patógeno potencial y afectar la supervivencia de la abeja, por lo que, un primer estudio necesario es el efecto tóxico del AE en el huésped, para determinar la concentración más segura, previo a realizar ensayos antimicrobianos o antiparasitarios *in vivo* (Cunha Pereira et al., 2020).

2.6.- Aceite esencial seleccionado para este estudio.

Se ha seleccionado el AE de *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. (*M. mollis*) “Muña o Peperina” clasificada dentro de la familia *Lamiaceae*, cuyo género se distribuye desde Venezuela hasta Argentina (Alkire et al., 1994). Aunque originalmente se clasificó como *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling (Epling, 1939). Según algunos autores, el género incluye 17 especies (Schmidt-Lebuhn, 2008), mientras que otros sugieren un complejo poliploide, por eso, los fusionaron en una especie polimorfa única: *M. mollis* (Kunth.) Griseb. (Epling & Játiva, 1963). Entonces, de acuerdo con Epling & Játiva (1963) y debido al amplio uso como medicamento por parte de la población local, en nuestro país, fue codificada en la Farmacopea Nacional Argentina (1978) como *M. mollis* (Kunth) Griseb.

En Argentina, se la conoce principalmente como “Peperina” y se encuentra ampliamente distribuida en las provincias de Córdoba, San Luis, Tucumán, Salta

y Catamarca. Se explota intensamente para las industrias de infusiones, bebidas amargas no alcohólicas y fitoterapia (Bandoni et al., 2002; Elechosa et al., 2007), siendo también utilizada localmente por las personas como aditivo en la infusión denominada "compañero". Asimismo, *M. mollis* funciona como digestiva, antiespasmódica, antidiarreica, antihelmíntica, carminativa, emenagoga, para inhalaciones en catarros y sinusitis (Juliani et al., 2021).

Las observaciones anatómicas y morfológicas realizadas en materiales vivos y de herbario, no mostraron diferencias significativas entre poblaciones naturales, pero algunas diferencias menores observadas en los rendimientos y composición del AE, son atribuibles principalmente a las condiciones ambientales y etapas fenológicas (Elechosa et al., 2007). Esta variabilidad en el rendimiento y composición del AE de peperina se ha informado en Argentina (Zygadlo et al., 1996; Bandoni et al., 2002; Elechosa et al., 2007; Mora et al., 2009; Elechosa, 2009) así como, en otros países andinos (Alkire et al., 1994; Rojas & Usubillaga, 1995). Es así, como los estudios basados en las variaciones estacionales del contenido y la composición del AE, establecieron la plena floración como el mejor momento para la cosecha (Bandoni et al., 2002).

Van Baren et al., (2014) caracterizaron la variabilidad en rendimientos y composición química de los AE de *M. mollis* de colectas de cuatro años de muestreos en poblaciones de plantas silvestres de las provincias de Córdoba, San Luis, Tucumán, Salta y Catamarca mediante un estudio comparativo. Las muestras fueron analizadas por cromatografía gaseosa y se determinaron cinco quimiotipos (qt). Córdoba y San Luis presentaron el qt. *M. mollis* mentona-pulegona; en tanto, Tucumán, Salta y Catamarca, mostraron la presencia de diferentes componentes, obteniéndose a partir de las muestras, los siguientes cinco grupos: i) dihidrocarvona-carvona, ii) pulegona con ausencia de mentona, iii) acetato de carvacrilo-carvacrol, iv) limoneno y v) linalol.

2.7.- Objetivo General.

Evaluar la supervivencia del estadio adulto de *Apis mellifera* L. a la administración oral prolongada del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb., con el propósito de obtener una concentración inocua del fitoquímico como potencial alternativa natural para el control de enfermedades en la colonia de abejas melíferas (*Apis mellifera* L).

2.8.- Objetivos Específicos.

1. Determinar la supervivencia de la abeja melífera adulta bajo un régimen de administración oral prolongada al AE de *M. mollis* a diferentes concentraciones.
2. Determinar el consumo del AE de *M. mollis* a distintas concentraciones, por la abeja adulta sometida a un régimen de administración oral prolongada.

2.9.-Hipótesis.

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb., podría provocar efectos deletéreos sobre la abeja melífera adulta si se administra a concentraciones elevadas.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.- Aceite esencial de *M. mollis*.

El AE de *M. mollis* fue proporcionado por el Instituto de Recursos Biológicos (IRB), INTA, Castelar a través del técnico Juárez Miguel, quien recolectó en 2007 y a 1200 metros de altitud las plantas de *M. mollis* en la localidad de Sagrada Familia, provincia de Córdoba. Las plantas se encontraban en floración y fueron nombradas como ejemplares 366 y 410; de estas plantas el técnico obtuvo el AE para este estudio. Para ello, el Sr. Juárez procedió a secar el material natural al aire (12-15% de humedad final) y someterlo a extracción del AE mediante hidrodestilación durante 2 horas utilizando una trampa de tipo Clevenger (IRAM 18729, 1996); la humedad restante se eliminó con sulfato de sodio anhidro y el AE se almacenó a 2°C antes del análisis. El rendimiento se expresó como relación v/p.

El AE fue caracterizado por Van Baren et al., (2014) a través de cromatografía gaseosa, detector de ionización de llama y espectrómetro de masa (GC-FID-MS). La calidad del AE ha sido estandarizado como se describe en la norma IRAM argentina (IRAM 18606, 2003).

La composición detallada del AE de *M. mollis* con sus componentes mayoritarios y minoritarios se adjunta en la **Tabla N° 1**.

3.2.- Ensayos preliminares de la unidad de confinamiento.

Se efectuaron ensayos preliminares con distintos modelos de la “unidad de confinamiento” para observar el comportamiento del grupo de abejas confinadas y optimizar la practicidad de la manipulación del mismo durante los experimentos. En primer lugar, se determinó el tamaño ideal del recipiente, para contener el número de abejas necesario para las pruebas, seleccionándose un recipiente con un volumen de 500 ml (frasco de plástico con tapa), que permitió mejorar la maniobrabilidad de cada unidad de confinamiento. Como abertura de ventilación se evaluaron dos modelos, una rejilla ubicada en posición lateral (3/4 del tamaño de la pared del frasco), y otra ubicada en la parte superior en reemplazo de la tapa ([Figura 1.c](#)); ambos modelos fueron descartados. Los alimentadores se colocaron a modo de prueba en la tapa y los laterales ([Figura 1. a y b](#)).

La compuerta para retirar las abejas muertas se ubicó en el lateral inferior del frasco, con el objetivo de evitar la apertura por la tapa de la unidad de confinamiento y la fuga de abejas.

En cuanto al material, se seleccionó plástico debido a su bajo valor económico y fácil manipulación en general. Se probaron plásticos de diferentes espesores como los que se visualiza en las [Figuras 1. a, b y c](#), los cuales son usados comúnmente para el envasado de miel, siendo estos de mayor espesor que los finalmente seleccionados ([Figura 1. d](#)), ya que resultaron más fáciles de perforar.

3.3.- Preparación de la unidad experimental.

La unidad definitiva de confinamiento presentó estas características: frascos de plásticos estériles de 500 ml, con pequeñas aberturas de 3 mm ubicadas en los laterales y en la tapa para permitir la ventilación; dos aberturas adicionales laterales donde se colocaron dos alimentadores. Como alimentador se utilizó un tubo de centrífuga tipo Eppendorf de 1,5 ml ([Figura 1. d](#)), dos por cada unidad de confinamiento, ubicados en posición horizontal con una pequeña inclinación (10°) hacia el interior. A cada alimentador se le realizó un orificio en la punta, por el cual las abejas se alimentaron “*ad libitum*”. El agua fue suministrada en un tercer alimentador (Eppendorf). A su vez, se realizó una compuerta (abertura

adicional) en el lateral, casi en el fondo del frasco para poder insertar una pinza y retirar las abejas muertas como se describió en el [punto 3.2.](#)

3.4.- Procedimiento.

Las abejas se obtuvieron a partir de cuadros de cría operculados con cría naciente, extraídos del colmenar experimental del Curso Producción Animal I, FCAYF, UNLP, durante el año 2021.

Se seleccionaron colonias "sanas" con una infección cero o un nivel bajo de patógenos y parásitos. Una vez seleccionadas las colmenas, se colocó un cuadro de cera labrado vacío con la reina en el interior del canasto técnico, el cual fue ubicado en el centro de una colonia de abejas, 23 días antes del inicio del experimento con el propósito de obtener cría naciente de edad homogénea y abundante. Una vez que se verificó la presencia de pupas con ojos coloreados (18 días), se trasladó el cuadro a incubadora en laboratorio, y se mantuvo a 30-32°C y 60% HR, para lograr la emergencia de los imagos en condiciones controladas en un período de 1-3 días (Human et al., 2013).

3.5.- Ensayo de consumo y supervivencia frente al AE de *M. mollis*.

Se determinó la supervivencia y el consumo de la abeja obrera adulta a la administración oral prolongada (15 días) del AE de *M. mollis*. Se evaluaron las concentraciones de 500, 1.000, 2.000 y 4.000 del AE expresadas en µl/l, 4 repeticiones por tratamiento y un control blanco. El experimento fue realizado con 20 unidades de confinamiento, 16 correspondientes a las 4 concentraciones del AE de *M. mollis* y 4 del control blanco.

El control fue formulado con sacarosa al 50% en agua destilada estéril (ADE) p/v. Las concentraciones del AE con las cuales se alimentó a las abejas durante los 15 días fueron realizadas de la siguiente manera: los AE fueron vehiculizados en 2,5% del diluyente alcohol 70°, de acuerdo a lo propuesto por Albo et al., (2016); luego llevados a concentración final con solución de sacarosa 50% en ADE p/v y por último, se adiciono polivitamínico (Nutribee®) al 1 % p/v. Estas formulaciones del AE de *M. mollis* se prepararon diariamente para evitar su evaporación y se colocaron en frascos de vidrio estériles a 5°C (en heladera) hasta su empleo ([Figura 2.a](#)).

Al completarse el nacimiento de las abejas en incubadora, se efectuó la introducción de las mismas en el interior de una bolsa de plástico, con un golpe leve sobre el cabezal del cuadro. Las abejas se anestesiaron por 5 segundos con Dióxido de Carbono (CO₂). De esa manera se confinaron a razón de 35 abejas por frasco. Las abejas se dejaron recuperar, reemplazando aquellas que no mostraban signos vitales. Al cabo de dos horas de inanición, se administró cada tratamiento en los dos alimentadores. Las unidades de confinamiento se colocaron en bandejas ([Figura 2. b y c](#)), en laboratorio mantenido a 32°C y 60% HR. Los alimentadores con el AE de cada tratamiento se reemplazaron diariamente para evitar la cristalización del alimento ([Figura 2. d](#)).

En planillas diseñadas previamente al ensayo, se relevaron durante los 15 días, los datos de consumo/frasco y el n° de abejas muertas/frasco de cada tratamiento y del control. Las abejas muertas se retiraron diariamente del interior del frasco, para evitar contaminaciones.

3.6.- Análisis estadístico.

Las tasas de supervivencia se calcularon, graficaron y compararon mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y las pruebas de Gehan-Breslow ($p < 0.0001$), que también estima la mediana del tiempo de supervivencia, con el software GraphPad Prism, versión 8.0.0 (GraphPad Prism, 2019). Para el análisis de consumo se empleó ANOVA No Paramétrico de Krüskal Wallis y el Test de Comparaciones Múltiples de Medianas ($p \leq 0.05$) con el software estadístico INFOSTAT (Di Rienzo, 2019).

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este Trabajo Final de Carrera para optar por el Título de Ingeniero Agrónomo se estudió el efecto de la administración oral prolongada del AE de *M. mollis* sobre la supervivencia de la abeja melífera adulta. Se evaluó el consumo y la supervivencia a distintas concentraciones.

4.1.- Supervivencia.

En cuanto a la supervivencia respecto al control, hubo diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) para los tratamientos 500 $\mu\text{l/l}$ ([Figura 3](#)), 2.000 $\mu\text{l/l}$ ([Figura 4](#)) y 4.000 $\mu\text{l/l}$ ([Figura 5](#)). No se observaron diferencias significativas en el tratamiento 1.000 $\mu\text{l/l}$ ([Figura 6](#)). Al analizar el tiempo medio de supervivencia se observa que los tratamientos 500 y 2.000 $\mu\text{l/l}$ presentan el mismo patrón, el 50% de la población sobrevive hasta el 6° día del experimento, aunque el AE de *M. mollis* a 500 $\mu\text{l/l}$ tiene un 10% de supervivencia a los 15 días y el de 2.000 a los 13 días, frente al 30% del control. El AE de *M. mollis* a 4.000 $\mu\text{l/l}$ presentó un valor de supervivencia media más baja, de 5 días. Hasta el 9° día se observa el 10% de la población viva.

La concentración de 1.000 $\mu\text{l/l}$ no se diferenció del testigo y presentó un tiempo medio de supervivencia a los 10 días frente a los 12 días observados en el control.

4.2.- Consumo del AE de *M. mollis*.

Los resultados obtenidos sobre el consumo de la solución de sacarosa – AE se observan en la [Tabla 2](#). Se demostró que existieron diferencias significativas en el consumo de los distintos tratamientos del AE de *M. mollis* a partir del 7° día del experimento.

En la [Figuras 7](#) se graficó el consumo de los tratamientos del AE de *M. mollis* el día 1° del experimento. No se observaron diferencias entre tratamientos.

En las [Figura 8](#) se exponen los consumos de los distintos tratamientos del AE de *M. mollis* a los 7 días del ensayo, a partir del cual se observan diferencias significativas entre tratamientos y el control. Se observa la disminución del consumo del tratamiento control, y la reducción del consumo del AE de *M. mollis* a 4.000 $\mu\text{l/l}$. Esta alta concentración es probable que no sea palatable, además de liberar componentes aromáticos tóxicos al ambiente confinado (del frasco) y alterar el proceso de alimentación de la abeja a través de la trofalaxia; Se puede estimar que algunas obreras detectan el efecto deletéreo que produce la formulación del AE y dejen de consumirlo.

En la gráfica de consumo del 15° día ([Figura 9](#)), se advierte el bajo consumo del tratamiento de 1.000 µl/l, lo que hace suponer que es poco palatable para la abeja. A 500 µl/l consume los valores de consumo son similares que el al tratamiento control, pero hay que destacar que la supervivencia a esta concentración fue del 10%. Para el caso de los tratamientos de 2.000 y 4.000 µl/l, no fue posible graficar el consumo debido a que no hubo supervivencia de la población para este día.

El AE de *M. mollis* presenta múltiples propiedades como antimicrobiano. En el qt. estudiado en este trabajo, predominan los componentes pulegona y mentona. Existen pocos estudios sobre la supervivencia de la abeja obrera adulta sometida a un régimen de administración sistémica de largo plazo a formulaciones de AE. Entre los estudios que se pueden mencionar, Porrini et al., (2017) evaluaron los AE de eucalipto, canela, laurel y orégano, así como sus componentes mayoritarios. Sólo felandreno, 1,8 cineol y β mirceno se diferenciaron estadísticamente del control en la supervivencia de la obrera adulta a dosis mayores a 6000 ug/kg.

Sin embargo, existe una gran cantidad de investigaciones que estudiaron la Dosis Letal Media (DL₅₀) como parámetro de la Toxicidad de productos naturales y/o sus componentes mayoritarios sobre abeja melífera. Gashout & Guzmán-Novoa, (2009) testearon la DL₅₀ de 22 AE sobre *V. destructor*, entre ellos, el AE de *Mentha spicata* fue muy tóxico sobre abeja adulta con una DL₅₀ de 523.5 µg/abeja y el menos tóxico para larvas con una CL₅₀ menos tóxica de 382.8 µg/larva.

Albo et al (2010) determinaron la Dosis Letal Media (DL₅₀) de *Mentha piperita* con 44% de mentol libre, 20% de mentona, 10% de mentofurano y 7,4% de metilacetato, clasificándolo como un AE con una DL₅₀ de 7.9; 6.9 y 6.3 µg p.a/abeja a 24, 48 y 72 horas, respectivamente para abeja de primavera, por lo tanto, se debe considerar un producto “moderadamente tóxico”.

Anta et al., (2016), determinaron que el AE de *M. mollis*, *Mentha arvensis* y *Mentha spicata* presentaron una DL₅₀ ≥ 100 µg/abeja, lo que los ubica como productos “virtualmente no tóxicos”. Los componentes mayoritarios

determinados fueron: en *M. mollis*, 58% pulegona y 31% de mentona; en *M. spicata*, 27.5% limoneno y 37.6% de levo carvona y en *M. arvensis*, 57% mentol, 11.5% de pulegona, 10.5% mentona y 9.5% de mentofurano. Ruffinengo et al., (2005) evaluaron el AE de *M. mollis* sobre *V. destructor* y la abeja adulta “*in vitro*” en Caja de Petri, observaron un efecto repelente sobre el ácaro y un bajo índice de selectividad, lo que implica que la DL₅₀ de la abeja es alta y la del ácaro es baja.

Dado que la mayoría de los insecticidas para plantas son biodegradables, esto ha llevado a un resurgimiento del interés en el uso de extractos de plantas o AE. Se ha informado que más de 1500 especies de plantas tienen valor insecticida (Kumar et al., 2011), muchas de ellas poseen metabolitos secundarios, como alcaloides, monoterpenoides o fenilpropanoides, que son tóxicos para los insectos. Además, los AE extraídos de plantas han sido ampliamente investigados por sus propiedades de control de plagas y algunos demostraron ser tóxicos (Aziz & Abbass, 2010). Asimismo, el AE de *M. mollis* se puede utilizar como insecticida natural en el control de hembras del mosquito *Aedes aegypti*; alcanzando un 100% de repelencia a los estadios adultos y la capacidad de oviposición a una DL₅₀ de 18.50 ug/mg (Silvério et al., 2020).

Pellegrini et al., (2017) determinaron la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) *in vitro* de dos AE autóctonos, entre ellos *M. mollis*, frente a 10 aislamientos de *P. larvae*, *M. mollis* mostró una CIM y CBM de 37.5 y 75 pg/ml, respectivamente.

Anta (2016) evaluó la CIM₅₀ de *M. mollis*, *M. spicata* y *M. arvensis* sobre *A. apis*, determinando valores de 800, 800 y 400 ppm, respectivamente.

Pellegrini et al., (2017) estudiaron AE de varias especies nativas y determinaron los componentes principales que causaron disrupción de la pared celular y membrana citoplasmática de *P. larvae*. Dentro de ellos, comprobaron que la pulegona del AE de *M. mollis* producía ese efecto.

La detección de quórum (QS) es un mecanismo de comunicación bacteriano que depende de la densidad de población. Pellegrini et al., (2014) estudiaron la actividad y las propiedades anti-QS y antimicrobiana del AE de *M. mollis*; mostraron que el AE de *M. mollis* era un buen candidato para el desarrollo de

productos anti-QS con una potencial aplicación en el control de enfermedades bacterianas mediadas por QS, como la loque americana.

Por ello, si bien son sustancias naturales, su toxicidad debe ser previamente evaluada a corto y largo plazo antes de su empleo en el tratamiento de enfermedades en el hombre, los animales o los insectos como es el caso de la abeja melífera.

Muchos investigadores han evaluado la eficacia del AE de *M. mollis* para el tratamiento de distintas enfermedades de la abeja, lo que genera expectativas para el potencial empleo como fitoquímico en la colonia de abejas.

5.- CONCLUSIONES Y/O RECOMENDACIONES.

Como se ha detallado previamente, muchos autores han evaluado *in vitro* el control de distintas patologías de la abeja con el AE de *M. mollis*. Asimismo, otros investigadores han testeado la toxicidad oral aguda con el AE de *M. mollis* u otras especies con componentes mayoritarios compartidos. No obstante, los estudios realizados en este **Trabajo Final de Carrera** sobre la supervivencia de la abeja adulta a la administración oral prolongada con el AE de *M. mollis* son **inéditos** y han proporcionado información relevante. El AE de *M. mollis* resultó tóxico en todas las concentraciones evaluadas, aún a la administración de 500 µl/l, que es la menor concentración probada. Es necesario continuar con el estudio de la supervivencia de la abeja adulta a concentraciones menores y evaluar que concentraciones no son deletéreas sobre los estadíos larvales, con el objetivo de optimizar el uso de este fitoquímico eficaz para el tratamiento de patologías en colonias de abeja melífera.

6.- BIBLIOGRAFÍA.

- ✓ **Albo, G. N., Henning, C., Ringuelet, J., Reynaldi, F. J., De Giusti, M. R., & Alippi, A. M.** 2003. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie*, 34(5), 417-427.
- ✓ **Albo, G. N., Henning, C., Reynaldi, F. J., Ringuelet, J., & Cerimele, E.** 2010. Dosis Letal Media (DL₅₀) de algunos aceites esenciales y biocidas efectivos para el control de *Ascosphaera apis* en *Apis mellifera* L. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 11(10), 1-12.
- ✓ **Albo, G. N., Reynaldi, F. J., Altamirano, R., Vivot, W., & Córdoba, S. B.** 2016. Evaluación de la actividad inhibitoria, *in vivo* e *in vitro*, del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y cinco diluyentes sobre cultivos de *Ascosphaera apis*. *Analecta Veterinaria*, 36.
- ✓ **Alkire, B.H., Tucker, A., & Maciarelo, M.** 1994. Tipo, *Minthostachys mollis* (Lamiaceae): *An Ecuadorian Mint. Econ Bot*, 48:60–64.
- ✓ **Alonso-Salces, R. M., Cugnata, N. M., Guaspari, E., Pellegrini, M. C., Aubone, I., De Piano, F. G. & Fuselli, S. R.** 2017. Natural strategies for the control of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. *Apidologie*, 48(3), 387-400.
- ✓ **Alvites Vigo, R. S.** 2019. Acción de los insectos polinizadores y su importancia en la agricultura en la campiña de Huacho. Tesis. Dr. En Ciencias Ambientales. Universidad Nacional José Faustino Gómez Carrión (UNJFGC). Huacho. Perú. 74 pp.
- ✓ **Anta J., Reinoso E.H., Henning C., Juárez M., Léniz D. y Albo G.** 2016. Evaluación “*in vitro*” de *Minthostachys mollis*, *Mentha arvensis* y *Mentha spicata* para el control de *Ascosphaera apis* en abeja melífera. *IV Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales*. 27 y 28 de Noviembre de 2014, Tucumán-Argentina (Anexo II).
- ✓ **Aziz, E.E., Abbass, M.H.** 2010. Chemical composition and efficiency of five essential oils against the pulse beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) on *Vigna radiata* seeds. *Am. J.Agric. Environ. Sci.* 8, 411–419.
- ✓ **Bandoni, A.L., Lopez, M.A., Juárez, M.A., Elechosa, M.A., Van Baren**

C., Di Leo Lira, P. 2002. Seasonal variations in the composition of the essential oil of “peperina” (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) from a local population of the Province of Córdoba, Argentina. *Essenze e derivati Agrumari* 72:11-14.

✓ **Bandoni, A.J., Manjón, F., Rossignoli, J.J., Villa, E.M.** 1978. *Farmacopea Nacional Argentina*, 469-471.

✓ **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.** 2008. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.

✓ **Borges, D., Guzman-Novoa, E., & Goodwin, P. H.** 2020. Control of the microsporidian parasite *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) using nutraceutical and immuno-stimulatory compounds. *Plos one*, 15(1), e0227484.

✓ **Brzozowski, L., & Mazourek, M.** 2018. A Sustainable Agricultural Future Relies on the Transition to Organic Agroecological Pest Management. *Sustainability*, 10(6), 202. <https://doi.org/10.3390/su10062023>.

✓ **Burt, S.** 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 94, 223–253.

✓ **Carvajal, V.** 2020. Departamento de Ciencias Biológicas - Escuela Politécnica Nacional. Importancia de las abejas como polinizadores. 4 pp. Disponible en:<https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/21021/1./Importancia%20de%20as%20abejas%20como%20polinizadores2a.pdf>.

✓ **Conti, B., Bocchino, R., Cosci, F., Ascricchi, R., Flamini, G., & Bedini, S.** 2020. Essential oils against *Varroa destructor*: a soft way to fight the parasitic mite of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 774-782.

✓ **Cristina, R. T., Kovačević, Z., Cincović, M., Dumitrescu, E., Muselin, F., Imre, K., & Puvača, N.** 2020. Composition and Efficacy of a Natural Phytotherapeutic Blend against Nosemosis in Honey Bees. *Sustainability*, 12(14), 5868.

✓ **Cunha Pereira, R., Faria Barbosa, W., Pereira Lima, M. A., Vieira, J. O. L., Carvalho Guedes, R. N., Rodrigues da Silva, B. K., & Lemes Fernandes, F.** 2020. Toxicity of botanical extracts and their main constituents on the bees *Partamona helleri* and *Apis mellifera*. *Ecotoxicology*, 29(3), 246-257.

✓ **David, M.A., YoM. mollisi, A., Sánchez, E., Martínez, A., Palacio, A., & Atela, O.** 2020. Las abejas melíferas (*Apis mellifera* L) y su desempeño como

insectos polinizadores en kiwi (*Actinidia chinensis* var. Deliciosa). Estación Experimental Agropecuaria Balcarce. Cabaña Apícola Pedro Bover, General Belgrano.

✓ **Di Rienzo, J. A.** 2019. InfoStat versión estudiantil. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

✓ **Elechosa, M.A.** 2009. Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina. Buenos Aires. Ediciones INTA. 48p.

✓ **Elechosa, M.A., Molina, A.M., Juárez M.A., Van Baren, C.M., Di Leo Lira P., Bandoni, A.L.** 2007. Estudio comparativo de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. Obtenido de colectas en 21 poblaciones de las provincias de Tucumán, Córdoba, San Luis y Catamarca. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5): 244-245.

✓ **Epling, C.** 1939. Las Labiadas del noroeste de la Argentina. *Lilloa* 4:389–446.

✓ **Epling, C.C. & Jativa, C.** 1963. Supplementary notes on America Labiatae VIII. *Brittonia* 15: 366-376.

✓ **European Commission.** 2021. Honey Market Presentation. Disponible en: [ec.europa.eu › documents › market-presentation-honey-spring2021_en](http://ec.europa.eu/documents/market-presentation-honey-spring2021_en).

✓ **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** 2020. Disponible en <http://www.fao.org/resources/infographics/es/>. Último acceso: diciembre 2021.

✓ **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** 2016. FAOSTAT. Estadísticas de producción de miel de abeja. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es>. Último acceso: enero 2022.

✓ **Gashout, H. A. & Guzmán-Novoa, E.** 2009. Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*, 48(4), 263-269.

- ✓ **GraphPad Prism. 2019.** Versión 8.0.0. [Computer software]. La Jolla, CA: GraphPad Software, Inc. Disponible en: <http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>.
- ✓ **Gende, L. B., Maggi, M. D., Fritz, R., Eguaras, M. J., Bailac, P. N., & Ponzi, M. I.** 2009. Antimicrobial activity of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* essential oils against *Paenibacillus larvae*. *Journal of Essential Oil Research*, 21(1), 91-93.
- ✓ **Global export data.** 2020. <http://www.worldstopexports.com/natural-honey-exporters/> .
- ✓ **Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J. D., Forsgren, E., & Zheng, H. Q.** 2013. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-53.
- ✓ **Iannicelli, J., Guariniello, J., Pitta Álvarez, S. & Escandón, A.** 2018. Traditional uses, conservation status and biotechnological advances for a group of aromatic / medicinal native plants from America. *Biol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat*, 17 (5): 453 – 491.
- ✓ **International Commission for Bee Botany. ICCB.** 1985. Third symposium on the harmonization of methods for testing the toxicity of pesticides to bees, Rothamsted Experimental Station, England.
- ✓ **Instituto Argentino de Normalización y Certificación. IRAM.** 1996. Productos aromatizantes. Aceites esenciales. Determinación del contenido de aceites volátiles. *Norma IRAM 18729*.
- ✓ **Instituto Argentino de Normalización y Certificación. IRAM.** 2003. Productos aromatizantes. Aceites esenciales. Determinación del contenido de aceites volátiles. *Norma IRAM 18606*.
- ✓ **Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. INDEC.** 2020. Disponible en <http://www.indec.gob.ar/indec/web/Nivel4-Tema-3-2-39>. Último acceso: enero 2022.
- ✓ **Jobbágy, E., Aguiar, S., Piñeiro, G., & Garibaldi, L.** 2021. Impronta ambiental de la agricultura de granos en Argentina: revisando desafíos propios y ajenos. Disponible en: [https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/6725/1/Jobbagy%20\(2021\)%20Im](https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/6725/1/Jobbagy%20(2021)%20Im)

pronta%20ambiental%20de%20la%20agricultura%20de%20granos%20en%20Argentina%20revisando%20desaf%3%ados%20propios%20y%20ajenos.pdf

✓ **Juliani, H.R., Brunetti, P., Koroch, A.R.** 2021. *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. In: Máthé Á., Bandoni A. (eds) Medicinal and Aromatic Plants of South America Vol. 2. *Medicinal and Aromatic Plants of the World*, vol 7. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-62818-5> 28.

✓ **Kačániová, M., Terentjeva, M., Žiarovská, J. & Kowalczewski, P. Ł.** 2020. In Vitro Antagonistic Effect of gut bacteriota isolated from indigenous honey bees and essential oils against *Paenibacillus larvae*. *International Journal of Molecular Sc.*

✓ **Kumar, P., Mishra, S., Malik, A. & Satya, S.** 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Ind. Crops Prod.* 34, 802–817.

✓ **Lin, Z., Liu, Y., Chen, X., Han, C., Wang, W., Ke, Y.** 2020. Genome-wide identification of long non-coding RNAs in the gravid ectoparasite *Varroa destructor*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.14.151340>.

✓ **Maistrello, L., Lodesani, M., Costa, C., Leonardi, F., Marani, G. & Caldon M.** 2008. Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*; 39: 436–45.

✓ **Man, A., Santacroce, L., Iacob, R., Mare, A., & Man, L.** 2019. Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. *Pathogens*, 8(1), 15.

✓ **Martínez, G. J. & Luján, M. C.** 2019. Etnobotánica, conocimiento tradicional asociado al recurso genético.

✓ **Masango, P.** 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean. Prod.* 13, 833–839.

✓ **Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. MAGyP.** 2020. Apicultura. Disponible en [http: magyp.gob.ar/apicultura/](http://magyp.gob.ar/apicultura/). Último acceso: enero 2022.

✓ **Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. MAGyP.** 2021. Apicultura. Disponible en [http: www.magyp.gob.ar/sitio/areas/cambio_rural/boletin/07_apicultura.php](http://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/cambio_rural/boletin/07_apicultura.php)
Ultimo acceso: enero 2022.

- ✓ **Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. MAGyP.** 2021. Apicultura. Políticas públicas para fortalecer el desarrollo de la cadena apícola. Disponible en: <https://magyp.gob.ar/apicultura/index.php>. Ultimo acceso: febrero 2022.
- ✓ **Mora, F.D., Araque, M., Rojas, L.B., Ramírez, R., Silva, B. & Usubillaga, A.** 2009. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. Vaught from the Venezuelan Andes. *Nat Prod CoM. mollisun* 4(7):997–1000
- ✓ **Nardoni, S., D'Ascenzi, C., Rocchigiani, G., Papini, R. A., Pistelli, L., Formato, G., & Mancianti, F.** 2018. Stonebrood and chalkbrood in *Apis mellifera* causing fungi: *in vitro* sensitivity to some essential oils. *Natural Product Research*, 32(4), 385-390.
- ✓ **Ollerton, J.**1999. La evolución de las relaciones polinizador-planta en los Artrópodos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* (España) 26: 741-758.
- ✓ **Pellegrini, M. C., Alvarez, M. V., Ponce, A. G., Cugnata, N. M., De Piano, F. G., & Fuselli, S. R.** 2014. Anti-quorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. *Journal of Essential Oil Research*, 26(6), 458-465.
- ✓ **Pellegrini, M. C.** 2016. Informe científico de Beca de Perfeccionamiento: Pellegrini, María Celeste (2015-2016). Disponible en: <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/3228>.
- ✓ **Pellegrini, M. C., Alonso-Salces, R. M., Umpierrez, M. L., Rossini, C., & Fuselli, S. R.** 2017. Chemical composition, antimicrobial activity, and mode of action of essential oils against *Paenibacillus larvae*, etiological agent of American foulbrood on *Apis mellifera*. *Chemistry & Biodiversity*, 14(4), e1600382.
- ✓ **Porrini, M. P., Garrido, P. M., Gende, L. B., Rossini, C., Hermida, L., Marcángeli, J. A., & Eguaras, M. J.** 2017. Oral administration of essential oils and main components: Study on honey bee survival and *Nosema ceranae* development. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 616-624.
- ✓ **Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H.T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J.C., Breeze, T.D., Dicks, L.V., Garibaldi, L.A., Hill, R., Settele, J.**

& Vanbergen, A.J. 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540 (7632); 220-9. doi: <https://doi.org/10.1038/nature20588>.

✓ **Registro Nacional de Productores Apícola, RENAPA.** 2021. Disponible en <http://https://renapa.magyp.gob.ar/publico/Padron>. Último acceso: diciembre 2021.

✓ **Rojas, L.B. & Usubillaga, A.N.** 1995. Essential oil of *Minthostachys mollis* Griseb. from Venezuela. *J Essent Oil Res* 7: 211 - 213.

✓ **Ruffinengo, S., Eguaras, M., Floris, I., Faverin, C., Bailac, P., & Ponzi, M.** 2005. LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 651-655.

✓ **Sammataro., Hargreaves, A.L., Harder, L.D, & Johnson, S.D.** 2009. Consumptive emasculation: The ecological and evolutionary consequences of pollen theft. *Biological Reviews* 84(2): 259–276.

✓ **Santos, E., Mendoza, Y., Invernizzi, C., Cabrera, D. y Zoppolo, R.** 2015. Caracterización de la polinización entomófila del cultivo de manzana en Uruguay: Importancia de la abeja melífera en el cuajado de los frutos. *Revista INIA*, 42, 22-26.

✓ **Schmidt-Lebuhn, A. N.** 2008. Revision of the genus *Minthostachys* (Labiatae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 98: 1-74.

✓ **Servicio Nacional de Sanidad y Seguridad Agroalimentaria, SENASA.** 2021. Disponible en <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/abejas/industria/establecimiento-industrializador/salas-de-extraccion>. Último acceso: diciembre 2021.

✓ **Silvério, M. R. S., Espindola, L. S., Lopes, N. P., & Vieira, P. C.** 2020. Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: The main vector of important arboviruses. *Molecules*, 25(15), 3484.

✓ **Tongnuanchan, P. & Benjakul, S.** 2014. Essential Oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *J. Food Sci.* 79, 1231–1249.

✓ **Torreta, J. P., Medan, D., Roig-Alsina, A., & Montaldo, N.H.** 2010. Visitantes florales diurnos del girasol (*Helianthus annuus*, Asterales: Asteraceae) en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 69:17-32.

- ✓ **Tutun, H., Koç, N., & Kart, A.** 2018. Plant essential oils used against some bee diseases. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(1), 34-45.
- ✓ **Van Baren, C. M., Lira, P. D. L., Elechosa, M. A., Molina, A. M., Juárez, M. A., Martinez, A. & Bandoni, A. L.** 2014. New insights into the chemical biodiversity of *Minthostachys mollis* in Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, 57, 374-383.
- ✓ **Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M. & Czubaszek, A.** 2019. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative. *Molecules*, 24(11), 2130. <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>.
- ✓ **Zhai, H., Liu, H., Wang, S., Wu, J., & Kluentner, A. M.** 2018. Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal Nutrition*, 4(2), 179-186.
- ✓ **Zygodlo, J.A., Maestri, D.M., Lamarque, A.L., Guzmán, C.A., Velasco Negueruel A., Pérez Alonso, M.J., García Vallejos, M.C. & Grosso, N.R.** 1996. Essential Oil Variability of *Minthostachys verticillata*. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 24, No4, pp. 319-323.

7.- APÉNDICE.

Tabla 1. Composición del aceite esencial de *Minthostachys mollis* utilizado en este estudio (Van Baren et al., 2014).

Componente	Porcentaje (%)
Espatulenol	0.2
Linalol	0.3
Limoneno	0.9
Isomentona	1.2
Piperitenona	1.3
Mentona	41.4
Pulegona	49.1

Tabla 2. Evaluación estadística del consumo de las concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* por día.

Día de consumo	p value
1	0.19
2	0.49
3	0.33
4	0.18
5	0.22
6	0.74
7	0.008*
8	0.09
9	0.02*
10	0.10
11	0.6
12	0.02*
13	0.007*
14	0.008*
15	0.005*

*Diferencias significativas (≤ 0.05).



Figura 1. Unidades de confinamiento. **a y b.** Frascos de 1000 ml con ventilación y alimentadores laterales. **c.** Frasco con ventilación superior y alimentadores laterales. **d.** Frasco de 500 ml seleccionado para este estudio con alimentadores laterales y orificios de ventilación superiores y laterales.



Figura 2. Trabajo en laboratorio. Concentraciones y testigo en frascos de vidrio estériles. **b y c.** Unidades de confinamiento numeradas y dentro de la bandeja de madera. **d.** Unidades de confinamiento, listas para el recambio del alimentador.

**Supervivencia de *A. mellifera* al AE de *Minthostachys mollis*
Tratamiento 500 μ /l**

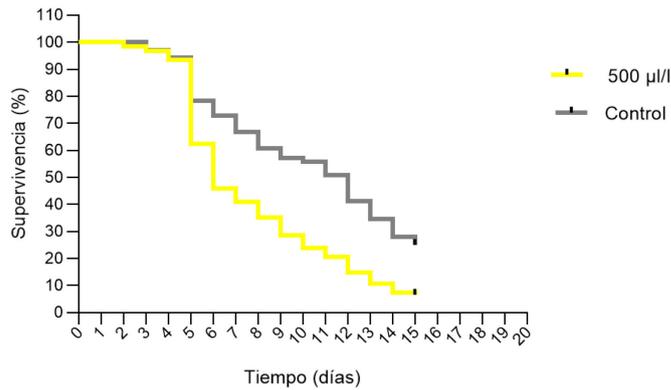


Figura 3. Supervivencia de *Apis mellifera* (*A. mellifera*) a la administración oral prolongada del aceite esencial (AE) de *Minthostachys mollis* (*M. mollis*) al tratamiento de 500 μ /l.

**Supervivencia de *A. mellifera* al AE de *Minthostachys mollis*
Tratamiento 2000 μ /l**

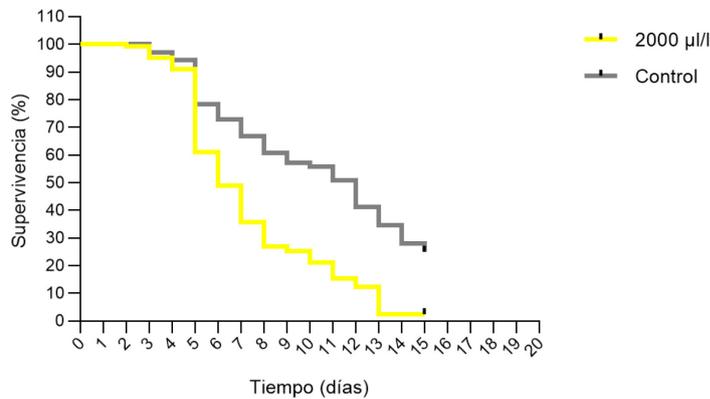


Figura 4. Supervivencia de *Apis mellifera* (*A. mellifera*) a la administración oral prolongada del aceite esencial (AE) de *Minthostachys mollis* (*M. mollis*) al tratamiento 2.000 μ /l.

**Supervivencia de *A. mellifera* al AE de *Minthostachys mollis*
Tratamiento 4000 μ l/l**

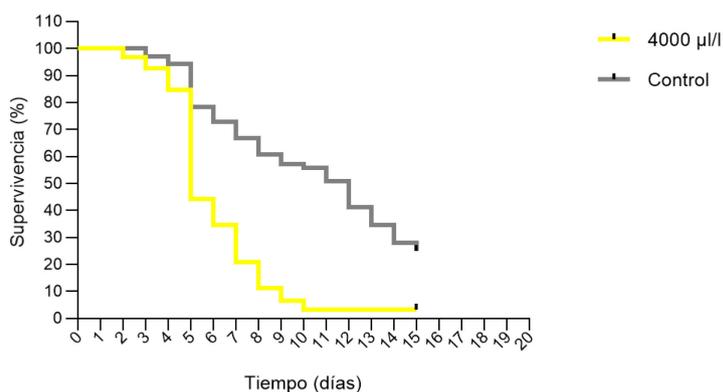


Figura 5. Supervivencia de *Apis mellifera* (*A. mellifera*) a la administración oral prolongada del aceite esencial (AE) de *Minthostachys mollis* (*M. mollis*) al tratamiento de 4.000 μ l/l.

**Supervivencia de *A. mellifera* al AE de *Minthostachys mollis*
Tratamiento 1000 μ l/l**

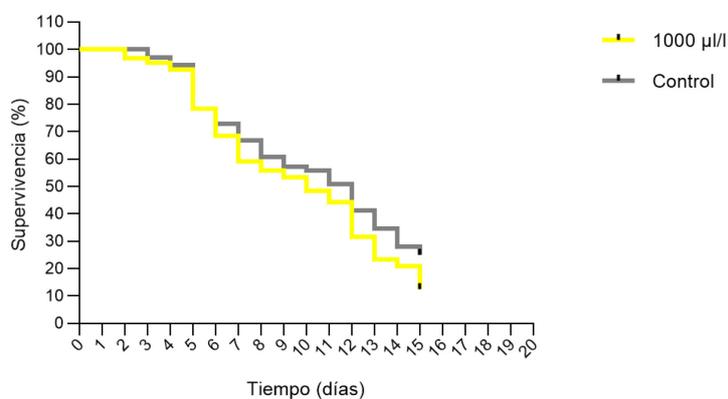


Figura 6. Supervivencia de *Apis mellifera* (*A. mellifera*) a la administración oral prolongada del aceite esencial (AE) de *Minthostachys mollis* (*M. mollis*) al tratamiento 1.000 μ l/l.

Consumo Día 1 AE *Minthostachys mollis*

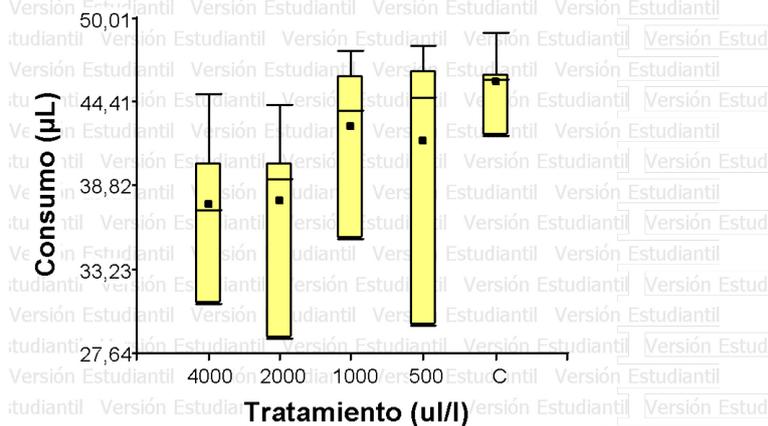


Figura 7. Consumo de tratamientos del aceite esencial (AE) de *Minthostachys mollis* (*M. mollis*) en el 1° día de ensayo, expresado en µl/abeja.

Consumo Día 7 AE *Minthostachys mollis*

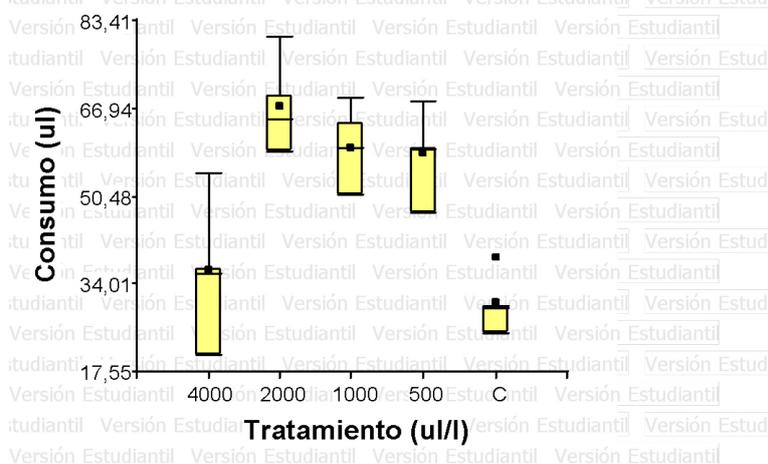


Figura 8. Consumo de tratamientos del aceite esencial (AE) de *Minthostachys mollis* (*M. mollis*) en el 7° día de ensayo, expresado en µl/abeja.

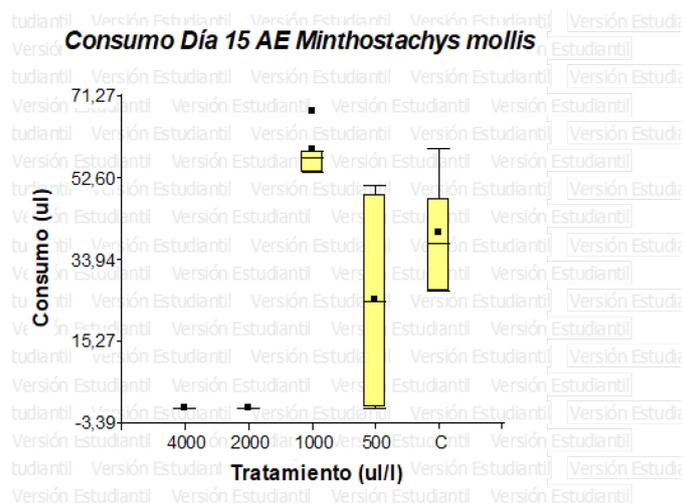


Figura 9. Consumo de tratamientos del aceite esencial (AE) de *Minthostachys mollis* (*M. mollis*) en el 15° día de ensayo, expresado en $\mu\text{l}/\text{abeja}$.