



TRABAJO FINAL DE CARRERA

DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE PESTICIDAS SOBRE ABEJA MELÍFERA ADULTA

Nombre y Apellido: **Rodríguez, María Emilia**

Nº Legajo: **27841/1**

DNI: **35332837**

E-mail: **mariaemilia.rodriguez@agro.unlp.edu.ar**

Director: **Dra. Albo Graciela Noemí**

Co-director: **Lic. en Biología Altamirano Rodrigo**

Tutor Externo: **Lic. en Biología Genchi María Laura**

Fecha de entrega: **28-10-2019**

Modalidad: **Investigación**

2019

ÍNDICE

ÍNDICE	1RESUMEN
	4ABSTRACT
	6INTRODUCCIÓN
8LA INCIDENCIA DE LOS AGROQUÍMICOS EN LA APICULTURA.	11
ESTUDIOS DE TOXICIDAD REQUERIDOS PARA REGISTRAR UN AGROQUÍMICO	13
GRUPOS QUÍMICOS DE LOS INSECTICIDAS EVALUADOS.	14
PIRETROIDES (BIFENTRIN Y LAMBDAHALOTRINA)	14
NEONICOTINOIDES (IMIDACLOPRID Y THIAMETOXAM)	15
CARACTERÍSTICAS DEL PRINCIPIO ACTIVO	15PIRETROIDES
	16
BIFENTRIN	16
LAMBDAHALOTRINA	16
NEONICOTINOIDES	17
IMIDACLOPRID	17
THIAMETHOXAM	17
GRUPO QUÍMICO DEL HERBICIDA EVALUADO	16REGULADORES DE
CRECIMIENTO. HORMONALES AUXÍNICOS	17
PRINCIPIO ACTIVO DEL HERBICIDA EVALUADO	18
2 4 D	18
OBJETIVOS	17GENERAL
	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18HIPÓTESIS
	18MATERIALES Y MÉTODOS
	18CÁLCULO DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL50)
	19
TRATAMIENTOS Y CONCENTRACIONES	20
CÁLCULO DE LAS DILUCIONES:	21
TRATAMIENTOS	21
CONTROLES	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
CÁLCULO DOSIS LETAL MEDIA (DL50) CON PROBIT	22
CÁLCULO DE LA DL50 CON PRISMA 6.0	22

RESULTADOS Y DISCUSIÓN		24
		24
RESULTADOS OBTENIDOS CON PRISMA		25
COMPARACIÓN DE MODELOS / SOFTWARES PROBIT-PRISMA	25	DISCUSIÓN
		¡Error! Marcador no definido.
CONCLUSIÓN		28
BIBLIOGRAFÍA	¡Error! Marcador no definido.	ANEXO 40
48 FOTOS		TABLAS 41
		FIGURAS
56		

Agradecimientos

A mi familia, por apoyarme y acompañarme en la búsqueda de mis sueños.

A mis amigxs, por compartir caminos.

A mi Directora por su generosidad y potenciar mi capacidad.

A mi Co-director y tutora externa por sus aportes.

A los técnicos "el Tano y Daniel" sin los cuales hubiera sido posible llevar adelante este trabajo.

Por su definición, un sistema de vida y desarrollo debería fortalecer las capacidades "sin deteriorar los recursos naturales de base" (Chambers y Conway, 1992). La apicultura va más allá, porque ayuda a preservar los recursos naturales. En todo el mundo, desde siempre, la apicultura ha formado parte de la agricultura de los poblados. (FAO)

RESUMEN

Se determinó la Dosis Letal Media (DL_{50}) de agroquímicos sobre obreras adultas de *Apis mellifera* mediante ensayos de toxicidad oral aguda *in vitro*. Se evaluaron tres tratamientos, cinco concentraciones para cada tratamiento y cinco repeticiones por concentración. Los tratamientos analizados correspondieron a dos insecticidas neurotóxicos sistémicos combinados: Thiametoxam–Lambdacialotrina (TL); Imidacloprid–Lambdacialotrina–Bifentrin (ILB) y al herbicida sistémico hormonal: 2,4 D. Se evaluaron las concentraciones: 2×10^{-3} , 2×10^{-4} , 2×10^{-5} , 2×10^{-6} y 2×10^{-7} microgramos de principio activo por abeja ($\mu\text{g p.a./abeja}$). Se utilizó dimetoato como control tóxico a 2, 4, 8, 16, 32, y 64 $\mu\text{g p.a./abeja}$ y sacarosa 50 % p/v en agua destilada estéril como control blanco. Se recolectaron abejas pecoreadoras de la piquera de una colmena, sin humo, ubicada en el apiario experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Las abejas se anestesiaron con CO_2 y se introdujeron en número de 10 por frasco, “*unidad experimental*”. Luego de 2 horas (h) de ayuno, se alimentaron con 200 μL del tratamiento vehiculizado en sacarosa 50% p/v y a las 5 h, luego del consumo total del tratamiento, se alimentaron *ad libitum* con sacarosa 50% p/v. Los frascos se mantuvieron en oscuridad a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y 65 % HR. Se registró la mortalidad a 24, 48 y 72 h. Los valores de DL_{50} obtenidos con PROBIT fueron: TL: 2×10^{-3} ; 1×10^{-3} μg y mayor a 1×10^{-3} $\mu\text{g p.a./abeja}$ a 24, 48 h y 72 h, considerados “*altamente tóxicos*” en las categorías de toxicidad propuestas por la *International Commission for Bee Botany (ICBB)*. Para ILB el modelo de regresión lineal no ajustó en los tres tiempos/momentos de observación. 2,4-D arrojó: 7,1 y $3,2 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g p.a./abeja}$ a 24 y 48 h, respectivamente, resultando “*moderadamente tóxico*” y “*altamente tóxicos*”, respectivamente. A 72 el modelo no ajustó. La DL_{50} se calculó con PRISMA. Los valores obtenidos a 24, 48 y 72 h fueron: TL: 4,7; 2,8 y $3,5 \times 10^{-4}$; ILB: $3,2 \times 10^{-4}$, $1,7 \times 10^{-4}$ y $4,3 \times 10^{-5}$; 2,4D: $1,3 \times 10^{-4}$ y 1×10^{-4} $\mu\text{g p.a./abeja}$ a 24 y 72 h, valores dentro de la categoría “*altamente tóxicos*” de los niveles de toxicidad propuestos por la *ICBB*. A 48 h no ajustó, Los niveles de dimetoato fueron “*altamente tóxicos*”: 0,28; 0,20 y 0,13 $\mu\text{g p.a./abeja}$. Se observa que los resultados con PRISMA presentaron un ajuste mayor que los obtenidos con PROBIT. La DL_{50} de los insecticidas combinados TL y ILB, y el herbicida 2,4-D permitieron determinar a estos productos dentro del rango de “*moderadamente y altamente tóxicos*” en ensayos *in vitro* de toxicidad oral aguda. Nuevos análisis son necesarios para evaluar el grado de toxicidad crónica y por contacto, asimismo como la realización de ensayos a campo

que permitan actualizar las regulaciones de utilización de estos productos y a su vez, generar planes de contingencia para los apicultores.

ABSTRACT

The Mean Lethal Dose (LD₅₀) of agrochemicals on adult workers of *Apis mellifera* were determined *in vitro* using acute oral toxicity tests. Three treatments, five concentrations for treatment and five repetitions per concentration were analyzed. The agrochemicals used are two combined systemic neurotoxic insecticides: Thiamethoxam – Lambdacialothrin (TL); Imidacropid – Lambdacialothrin – Bifentrin (ILB) and the hormonal systemic herbicide: 2,4 D. The analyzed concentrations were: 2×10^{-3} , 2×10^{-4} , 2×10^{-5} , 2×10^{-6} and 2×10^{-7} micrograms of active ingredient per bee ($\mu\text{g pa/bee}$). Dimethoate was used as toxic control at 2, 4, 8, 16, 32, and 64 $\mu\text{g p.a./bee}$ concentrations and 50% w/v sucrose in sterile distilled water was used as white control. Foraging bees were collected from the hive door, without smoke, located in the experimental apiary of the Faculty of Agricultural and Forest Sciences, UNLP. The bees were anesthetized with CO₂ and introduced in the experimental units in number of 10. After 2 hours (h), they were fed with 200 μL of the treatment carried in 50% w/v sucrose and at 5 h, after treatment total consumption, they were fed *ad libitum* with 50% w/v sucrose. The experimental units were kept in the dark at $25^\circ\text{C} \pm 2$ and 65% RH. Mortality was recorded at 24, 48 and 72 h. The LD₅₀ values obtained with PROBIT were: TL: 2×10^{-3} ; 1×10^{-3} μg and greater than 1×10^{-3} $\mu\text{g p.a./bee}$ at 24, 48 h and 72 h, considered "*highly toxic*" in the toxicity categories proposed by the *International Commission for Bee Botany (ICBB)*; ILB did not adjust in the three observation times, with a value of 0.000 $\mu\text{g p.a./bee}$; 2,4-D yielded 7.1 and 3.2×10^{-2} $\mu\text{g p.a./bee}$ at 24 and 48 h, respectively, resulting in "*moderately and highly toxic*", respectively, at 72 h it did not adjust, with a value of 0.000 $\mu\text{g p.a./bee}$. The DL₅₀ was calculated with PRISMA. The values obtained at 24, 48 and 72 h were: TL: 4.7; 2.8 and 3.5×10^{-4} ; ILB: 3.2×10^{-4} , 1.7×10^{-4} and 4.3×10^{-5} ; 2,4D: 1.3×10^{-4} and 1×10^{-4} $\mu\text{g pa / bee}$ at 24 and 72 h, values within the "*highly toxic*" category of the toxicity levels proposed by the *ICBB*. At 48 h it did not adjust. Dimethoate levels were "*highly toxic*": 0,28; 0,20 and 0,13 $\mu\text{g p.a./bee}$. It is observed that the results with PRISMA presented a greater adjustment than those obtained with PROBIT. The LD₅₀ values of the combined insecticides TL and ILB, and the herbicide 2,4-D determined these products within the range of "*moderately and highly toxic*" in acute oral toxicity *in vitro* tests. New analyzes are necessary to evaluate chronic and contact toxicity, as well as field tests to update the use regulations for these products and to set up contingency plans for beekeepers.

INTRODUCCIÓN

La abeja melífera (*Apis mellifera*, L.) constituye el grupo más importante de polinizadores manejados por el hombre, ya que poliniza más del 90% de los 107 cultivos globales básicos que garantizan la seguridad alimentaria en el mundo y asegura la biodiversidad al polinizar las plantas silvestres (Klein et al., 2007; Gallai et al., 2009; Potts et al., 2016).

Se han registrado disminuciones en poblaciones de abejas melíferas en Europa (Meana et al., 2017) América del Norte (VanEngelsdorp et al., 2009; Ellis et al., 2010; VanEngelsdorp & Meixner, 2010), Asia y América del Sur (Farooqui, 2013; Maggi et al., 2016; Antúnez et al., 2017; Requier et al., 2018; García et al., 2019) y esto ha causado una gran alarma entre los apicultores y los productores de cultivos. Particularmente en Argentina, están muriendo a razón de un 30 % de las colonias por año (Maggi et al., 2016). La disminución de colonias se ha atribuido a múltiples factores que incluyen parásitos, patógenos, mala nutrición, fallas en la reina, pérdida de hábitat, estrés migratorio y plaguicidas, entre otros (CoxFoster et al., 2007; Potts et al., 2010; Cressey et al., 2013; Johnson et al., 2015). Entre estos factores, el impacto potencial de los plaguicidas, particularmente aquellos aplicados en entornos agrícolas, es de particular interés (Bartomeus et al., 2019).

La expansión de la frontera agrícola y la utilización desmedida de glifosato y plaguicidas cada vez más específicos, pero con mayor toxicidad para las abejas, lleva a una merma de producción y pone en juego la vida de las colonias (Sanchez-Bayo et al., 2014, Zhu et al., 2014).

Los plaguicidas neonicotinoides se encuentran entre los insecticidas más utilizados en el mundo (Zhu et al., 2004) y son muy empleados en Argentina. Entre ellos, el imidacloprid y tiametoxam, dos neonicotinoides que actúan como agonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina sobre los insectos. Se emplean foliarmente, en el

recubrimiento de semillas o mediante aplicación de drenaje de raíces (Brandon & Robinson, 2015; Catchot et al., 2016) y pueden traslocarse a polen y néctar a través del xilema en las plantas en crecimiento (Krupke et al., 2016). Las abejas melíferas podrían estar expuestas inadvertidamente a los compuestos al buscar néctar y polen (Desneux et al., 2007). Al intervenir en el sistema nervioso central, los neonicotinoides interfieren con la transmisión de estímulos compitiendo con el neurotransmisor natural, acetilcolina, generando una unión irreversible en los insectos. Las afecciones en el sistema nervioso central conllevan parálisis y muerte por sobreestimulación. En 2013, la Unión Europea prohibió temporalmente el uso de clotianidina, imidacloprid y tiametoxam (Han et al., 2018). Sin embargo, los neonicotinoides se siguen utilizando ampliamente en América Latina, Asia y América del Norte, representando el 75% de las ventas globales totales (Bass et al., 2015). Aunque las concentraciones de neonicotinoides en las fuentes alimenticias de las abejas son bajas (Sánchez-Bayo et al., 2016), pueden inducir efectos subletales (Decourtye et al., 2004; Gill et al., 2012; Larson et al., 2013; Sánchez Bayo & Goka, 2016). Las abejas obreras pueden pecorear hasta 12km alrededor de su colmena, aunque el radio efectivo de vuelo de la abeja corresponde a 3 km, están expuestas a residuos de pesticidas presentes en el agua, néctar, polen y propóleos (Van Leeuwen et al., 2019).

La implementación generalizada de cultivos transgénicos y la disminución en el uso de algunos plaguicidas, han convertido a algunos insectos considerados plaga secundaria en plaga grave (Greene et al., 1999; Lu et al., 2008). Este cambio, junto con el desarrollo de resistencia en los insectos objetivo (Zhu et al., 2004; Zhu et al., 2012), ha resultado en un mayor uso de agroquímicos para tratamientos de semillas e insecticidas sistémicos aplicados como aerosoles foliares. Del mismo modo, aumentó el riesgo de exposiciones directas de las abejas pecoreadoras a estos productos. Actualmente, hay gran variedad de insecticidas disponibles para el control de plagas de cultivos, incluyendo piretroides y neonicotinoides (Zhu et al., 2017).

En Argentina, la combinación de Thiametoxám + Lambdacialotrina se emplea en cultivos polinizados por abejas melíferas, por ejemplo: *Prunus persica* L. (durazno) y *Medicago sativa* L. (alfalfa). Por otro lado, la combinación de Imidacloprid + Bifentrín + Lambdacialotrina se utiliza en *Glycine max* L. (soja), cultivo que representa el 45 % de la superficie productiva del país, estimada para la campaña 2018-2019 (Copati, 2019). En cuanto al herbicida 2,4 D es utilizado ampliamente en los sistemas agrícolas para el control de malezas de hoja ancha (Mondino, 2020).

Según las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT, Argentina empleó 3.736 Tn de insecticidas en 2017 (FAOSTAT, 2017), de los cuales 591,5 Tn corresponde a piretroides, aunque no se menciona la cantidad de neonicotinoides empleados. En base a estudios científicos sobre los efectos negativos de los plaguicidas neonicotinoides, en 2018 se prohibió su empleo casi en forma total en la Unión Europea (Blake, 2018), pero en nuestro país se emplean en forma sistemática. Por otro lado, los herbicidas para el control de malezas también son utilizados, en particular 2,4 D. Existen estudios que destacan que los herbicidas resultan menos tóxicos para la abeja melífera (Mullin, 2010; Heard et al., 2017). Este Trabajo Final de Carrera se enmarca en el Proyecto de Incentivos 11/A283 “Distintos aspectos de la producción sustentable de la granja” (2016-2019) (SECyT; UNLP). Directora: Dra. Albo G.; Co Directora: Dra. Córdoba S., al cual me incorporé el 1 de enero de 2019 hasta 31 de diciembre de 2019. La línea de trabajo se denomina: “Interacción de contaminantes ambientales y la colmena”. El propósito fue profundizar la investigación sobre la toxicidad de insecticidas combinados y herbicidas en la abeja melífera.

Posteriormente, se continuó trabajando en el marco del Proyecto 11 A/351: Estrategias tecnológicas para mejorar la productividad de los animales de la granja (abejas, aves y porcinos). Tetra anual (2020-2023). Directora: Dra. Albo G.; Co-directora: Córdoba S. En este Proyecto me incorporé en enero como colaboradora, en carácter de estudiante y en octubre 2020, fui incorporada como Becaria, luego de la adjudicación de una beca EVC, en agosto del mismo año.

LA INCIDENCIA DE LOS AGROQUÍMICOS EN LA APICULTURA.

La apicultura es valorada por los productos de alto valor biológico y servicios que presta a la polinización de cultivos, y por su contribución al desarrollo regional a través de la generación de empleo rural. La población de polinizadores – en especial abejas y mariposas– ha disminuido de manera preocupante, debido principalmente a prácticas agrícolas intensivas, cambios en el uso de la tierra, plaguicidas (incluidos los insecticidas neonicotinoides) (Lechenet et al., 2017), especies exóticas invasoras, enfermedades, plagas y el cambio climático (Potts et al. 2010). Casi el 35% de los polinizadores invertebrados –en particular las abejas y las mariposas–, y alrededor del 17% de los polinizadores vertebrados –como los murciélagos– están en peligro de extinción a nivel mundial. Los agricultores y los responsables de las políticas públicas,

a nivel mundial y nacional, desempeñan un papel importante en la protección de los polinizadores (Potts et al., 2016).

Argentina es el 3° productor mundial (Global top producers, 2019) y 3° exportador mundial de miel (Global top exporters, 2019). La producción de miel está traccionada por la demanda internacional del producto. Argentina exporta aproximadamente un 95% de lo que produce y es el país con mayor cantidad de colmenas del Hemisferio Sur.

Durante el periodo enero/mayo 2020 Argentina exportó 32.748 toneladas de miel por un valor FOB de 75.092.314 US\$ con un precio unitario de 2.26 USD/Tn. Se registró un incremento del 20,1% en volumen y del 23.9% en el valor FOB, respecto del mismo periodo del año 2019 (Alimentos Argentinos 2020). El 97% de las exportaciones corresponden a miel natural, casi en su totalidad a granel. Los destinos de las exportaciones están poco diversificados, se concentran en EE.UU. (51,7%) y Alemania (19,4%) (Figura 1 [Aquí](#)). El avance de la frontera agrícola y el uso de agroquímicos representa una fuerte limitación para el sector dado que reduce los espacios de explotación con disponibilidad de flora. La polinización está poco explotada en nuestro país. Este servicio puede potenciar los rendimientos de más del 90 % de los cultivos, aumentar la producción de alimentos y resguardar la biodiversidad.

La producción apícola en nuestro país, se caracteriza por la dispersión geográfica de la actividad, aunque la mayor concentración se da en la Región Centro. El avance de la frontera agrícola y el incremento en la utilización de agroquímicos, ocasionó profundas transformaciones en la configuración regional. Los apicultores se vieron obligados a realizar la práctica de la trashumancia a otras zonas geográficas con mayor oferta de flora apícola, como el noroeste del país; la zona frutícola del Valle de Río Negro y Neuquén; los corredores de los ríos Paraná, Uruguay y de La Plata; el monte pampeano – puntano, entre otros (Campana et al., 2019).

En el resto del país se desarrolla principalmente el eslabón primario con pequeños productores. En muchos casos, es una actividad complementaria que contribuye al desarrollo regional y a la reducción de la pobreza rural. Si bien su producción es de menor escala y de bajos recursos, estas regiones tienen un importante potencial por sus recursos florísticos; algunos ejemplos de estas zonas apícolas lo constituyen las provincias del noroeste y noreste del país (Submitter et al., 2020).

De acuerdo a los últimos datos disponibles, existen 36377 productores y 2,98 millones de colmenas en todo el país (MINAGRI, 2020). Las abejas como agentes polinizadores garantizan las condiciones de biodiversidad y generan un impacto sobre las producciones agrícolas permitiendo mejores rendimientos (INTA, 2016).

La presencia de sustancias tóxicas en el medio ambiente puede ser un factor perjudicial para la salud de las colonias de abejas. Los agroquímicos son de particular interés a causa de los posibles efectos subletales en las abejas individuales y en la colonia, produciendo posiblemente su pérdida e incluso, la de apiarios completos (Desneux et al., 2007; Maini et al., 2010).

ESTUDIOS DE TOXICIDAD REQUERIDOS PARA REGISTRAR UN AGROQUÍMICO

Los productos fitosanitarios se inscriben en el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal de acuerdo a lo establecido por el Decreto N° 3489/58 y el Decreto N° 5769/59, en los términos del Manual de Procedimientos, Criterios y Alcances para el Registro de Productos Fitosanitarios en la República Argentina, aprobado por Resolución SAGPyA N° 350/99.

El registro de agroquímicos requiere que se realicen pruebas toxicológicas específicas en las abejas melíferas, como las requeridas por Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria SENASA (2019) y la Organización Europea para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE, 1998a; OCDE, 1998b) Estas pruebas deben seguir protocolos específicos para (1) evaluar el nivel de selectividad del pesticida para las abejas melíferas y (2) satisfacer los requisitos reglamentarios de plaguicidas de un país determinado. Deben realizarse las Buenas Prácticas de Laboratorio.

La evaluación del riesgo potencial que representa para los insectos polinizadores el uso de productos fitosanitarios (PPP) está compuesta por el estudio de: a) la toxicidad oral aguda; b) la toxicidad de contacto. a) y b) se expresan como Dosis Letal Media (DL₅₀) oral y de contacto y se definen como: “la dosis letal que mata al 50% de la población en estudio, por vía sistémica o de contacto”, c) índice de exposición a la toxicidad (TER) y d) resultados de semi pruebas de campo y de campo (p. ej., mortalidad de abejas directa o diferida), que destacan el impacto en el desarrollo de la cría, las habilidades de alimentación, etc.

Por lo general, un estudio de exposición oral está destinado a determinar la DL₅₀ y los resultados se utilizan para definir la necesidad de una evaluación adicional. Aunque la

DL₅₀ es un objetivo común de estos estudios, las pruebas de exposición oral se pueden usar para determinar NOEL (Nivel sin efecto tóxico observable). Este término se define como la dosis más elevada de una sustancia que no ha mostrado en las pruebas tener efectos perjudiciales para la salud en personas o animales. También conocido como los límites máximos de residuo que puede tener un alimento que sea destinado a consumo humano o animal. De este se desprende el periodo de carencia que está estrechamente relacionado con la vida media útil de la formulación en el vegetal. Es decir, conociendo cuáles son los límites máximos de residuos, se establece, en función de la vida media de la formulación, cuál es el periodo de carencia que debe tener para alcanzar dichos límites y poder comercializar los alimentos sin haberlos superado. Más adelante se menciona un estudio realizado en Francia donde residuos de plaguicidas fueron encontrados en polen causando daños a las abejas, podríamos pensar si estos límites máximos de residuos están establecidos en estos alimentos que consumen los seres vivos que habitan los ecosistemas que el hombre modifica para producir sus alimentos

Los datos de los cálculos de DL₅₀ oral se pueden utilizar para generar el HQ (Hazard Quotient) (inglés) o CR (Coeficiente de Riesgo) para cada compuesto de interés. El cálculo DL₅₀ proporciona un valor bruto solamente. Este resultado tiene que estar relacionado con la exposición de las abejas melíferas en condiciones de campo.

Se define el HQ o Cociente de Riesgo (CR) como la relación entre la exposición potencial a una sustancia y el nivel en el que no se esperan efectos adversos (NOEL) es decir, cuanto mayor sea el nivel sin efecto tóxico observable menor peligrosidad presentará el producto. Es utilizado principalmente por la Agencia de protección ambiental (EPA) de EE. UU. Para evaluar los riesgos para la salud de los tóxicos del aire.

Cuando el CR < 50, el producto puede considerarse de bajo riesgo agudo para las abejas melíferas. El CR no predice la toxicidad del producto para la cría ni la ocurrencia de ningún efecto subletal en adultos o crías.

Cuando el CR > 50, se requieren más pruebas en condiciones de campo o semicampo para una mejor evaluación del impacto. Véase el esquema europeo para la evaluación del impacto de las PPP - Pautas comúnmente utilizadas se refieren a EPPO (2010b), OCDE (1998a) y CEB francés (2011)]. Todos son similares, con diferencias principales que ocurren en el número de repeticiones.

GRUPOS QUÍMICOS DE LOS INSECTICIDAS EVALUADOS.

PIRETROIDES (BIFENTRIN Y LAMBDAHALOTRINA)

Son ésteres del ácido crisantémico. Las piretrinas naturales se aislaron de las flores de crisantemo. Debido a su fotosensibilidad se sintetizaron compuestos complejos, basados en la molécula natural aislada, para mejorar esta característica química y poder así utilizarlos en el campo, a mayor escala. La primera generación fue la aletrina, desarrollada en el año 1949. La segunda generación fueron la tetrametrina, 65'; bioaletrina 69', entre otras. La tercera generación, fenvalerato y permetrina 72' 73', y en la cuarta generación encontramos a la lambda-halotrina 75' cuyas dosis resultan muy bajas en comparación con los de la tercera generación 0.1 kg/ha vs 0.01 kg/ha. Además, son fotoestables y tienen baja volatilidad. Su residualidad es de aproximadamente 10 días.

Los piretroides interfieren con la actividad de los canales de Na^+ y K^+ en el axón. Se produce una despolimerización transitoria por un aumento del flujo de Na^+ hacia el interior de la neurona, seguida por una disminución del flujo de K^+ hacia afuera. En el sistema nervioso periférico, se propaga la acción a lo largo del axón hasta que llega a la terminal nerviosa. Allí se produce ingreso de Ca^{2+} y liberación de vesículas cargadas con glutamato (neurotransmisor), actuando sobre el receptor correspondiente de la célula muscular.

Existen 2 tipos. Los Tipo 1, que inducen picos múltiples de descargas en los nervios sensoriales periféricos y motores, y los tipos 2 que reducen la amplitud del potencial de acción y finalmente causan la pérdida de excitabilidad eléctrica. Las acciones diferentes se deben a la duración de las corrientes de sodio. Los tipos 1 duran una décima o centésimas de milisegundos mientras que los del tipo 2 duran minutos o más. (ver figura 2 [aquí](#))

Ambos pertenecen al tipo 2 por lo tanto reducen la intensidad del potencial produciendo ataxia o falta de movimiento y descoordinación como síndrome de envenenamiento. Son insecticidas que actúan por ingestión y por contacto causando desorientación y cese de la actividad de alimentación en minutos, como consecuencia el insecto queda paralizado y muere.

NEONICOTINOIDES (IMIDACLOPRID Y TIAMETOXAM)

La nicotina es un alcaloide que posee la planta de tabaco y que desde hace casi 3 siglos se usa como insecticida. Por su gran actividad de contacto es altamente tóxica para los mamíferos, por lo que numerosos estudios se realizaron para sintetizar compuestos que posean actividad biocida pero que no sean tóxicos para estos. Los primeros intentos para su uso como insecticidas comenzaron en 1978 con la nitiazina nitrometileno, que tenía propiedades insecticidas similares a la nicotina pero que poseía actividad sistémica en la planta y actuaba por ingestión en insectos, por lo que no resultarían una amenaza para los mamíferos. Pero esta resultó poco estable a campo por lo que se introdujo en la molécula un grupo 3-piridilmetil en el nitrometileno heterocíclico y se consiguió mayor estabilidad, este compuesto se llamó imidacloprid. Más adelante se sintetizaron compuestos como el acetamiprid, thiacloprid y thiamethoxam. Estos compuestos, llamados neonicotinoides, actúan, al igual que los piretroides, sobre el sistema nervioso central, aunque en este caso no sobre los canales de iones sino bloqueando de manera irreversible los receptores post sinápticos nicotínicos de acetilcolina. Éste último se forma en la mitocondria y se almacena en las vesículas pre sinápticas de las neuronas hasta que un impulso eléctrico permite que ingrese calcio facilitando la fusión de las vesículas con la membrana plasmática y liberando de éstas los neurotransmisores acetilcolina, los neonicotinoides al unirse de manera irreversible activan el receptor y al no ser degradados por la enzima que degrada la acetilcolina se produce una sobre estimulación de las sinapsis colinérgicas resultando en hiperexcitación, convulsiones, parálisis y muerte del insecto (ver figura 3 [aquí](#)). Cabe destacar que a medida que el vegetal crece, estos insecticidas disminuyen su concentración en la planta y cuando florece, la concentración que se encuentra es baja. Sin embargo, los niveles en néctar y polen, alimento principal de las abejas, pueden ser letales (Azpiazu et al., 2019; Gierer, et al., 2019). Henry et al. hallaron en 2012 residuos de imidacloprid en el 40% de las muestras de polen que analizaron, además, en Francia, observaron que se encontraban en tallos, hojas y panojas de maíz en niveles suficientes como para causar daño en las abejas, especialmente a través del polen que transportan.

CARACTERÍSTICAS DEL PRINCIPIO ACTIVO

PIRETROIDES

BIFENTRIN

Insecticida, de contacto e ingestión que actúa sobre el sistema nervioso de los insectos, provocando hiperexcitación, convulsiones, parálisis, y finalmente su muerte, es utilizado para el control de hemípteros, lepidópteros y homópteros (Jeon et al., 2015).

LAMBDAIALOTRINA

Es un insecticida que pertenece a la nueva generación de piretroides sintéticos que actúa por ingestión y por contacto, su acción de control es muy rápida y tiene efecto repelente. Actúa sobre el sistema nervioso de los insectos y perturba la función neuronal por interacción con los canales de sodio, produciendo una modificación de la membrana de las fibras nerviosas, lo que causa el bloqueo de la transmisión del flujo nervioso. La desorientación y cese de la actividad de alimentación ocurre en minutos, como consecuencia el insecto queda paralizado y muere (de B Pazini et al., 2017).

NEONICOTINOIDES

IMIDACLOPRID

Se trata de una sustancia con actividad insecticida por vía sistémica, por lo que puede ser aplicado tanto vía foliar como vía radicular a través del agua de riego. Tiene efecto residual prolongado en el suelo. Está etiquetado como utilizable para el control de plagas, tratamiento de semillas, insecticida, para el control de termitas y pulgas y como un insecticida sistémico (cucarachas y hormigas) (Jiang et al., 2018)

THIAMETHOXAM

Es un insecticida de la segunda generación del grupo de los neonicotinoides que actúa por contacto e ingestión, presenta una actividad translaminar y una alta sistemicidad en forma ascendente. Tiene una excelente translocación acropétala en el xilema y además una pequeña cantidad de producto es transportado a través del floema (basipétalo). Actúa interfiriendo los receptores acetilcolina nicotínicos postsinápticos, afectando la sinapsis en el sistema nervioso central del insecto. Los insectos tratados muestran inmediatamente los síntomas de envenenamiento con excitación y parálisis.

GRUPO QUÍMICO DEL HERBICIDA EVALUADO

REGULADORES DE CRECIMIENTO. HORMONALES AUXÍNICOS

Se denomina regulador de crecimiento a un compuesto orgánico, natural o sintético, que estando presente en pequeñas concentraciones puede causar modificaciones en el crecimiento y/o desarrollo de las plantas. Una fitohormona crítica para el crecimiento de las plantas es la auxina ácido indol acético que modula diversos procesos como las respuestas trópicas a la luz y la gravedad, la arquitectura radicular y de la parte aérea, el desarrollo vascular y el crecimiento de tejidos. En función de la concentración, las auxinas pueden inhibir al igual que estimular el crecimiento. Hay compuestos sintéticos con actividad auxínica y entre ellos se encuentra el 2,4-D que se emplea como herbicida (Heard et al., 2017).

PRINCIPIO ACTIVO DEL HERBICIDA EVALUADO

2 4 D

Los reguladores de crecimiento incluye 3 grupos: los fenólicos, los benzoicos y los picolinicos. Solo se describe a los fenólicos por pertenecer el 2,4-D a este grupo.

Se distinguen entre sí por la longitud de la cadena alifática, por los que sustituyen y su ubicación en el mismo o por ambos. Hay 2 formulaciones de 2,4-D: el éster y la sal amina, que tienen diferentes características. La formulación que se utilizó en este trabajo es la sal amina. Ésta es menos volátil que el éster, es soluble en agua, por lo que puede ser lavada fácilmente si llueve luego de una aplicación y tienen más dificultades para penetrar la cutícula e ingresar a la planta. Cualquiera sea la forma de aplicación (sal o éster) los fenólicos ejercen su acción dentro de la planta como ácido. El mecanismo de acción de estos herbicidas no es conocido, se ha hecho considerable progreso para elucidar su actividad. Los herbicidas auxínicos actúan de la misma forma que el ácido indol acético en altas concentraciones. Recientemente, se ha logrado evidencia bastante concluyente que la acción es estimular la síntesis de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) activando la ACC sintasa. De esta forma se incrementa la biosíntesis de etileno y consecuentemente del ácido abscísico que conduce los síntomas típicos producidos por estos herbicidas. Hay más de 172 productos que contienen 2,4-D actualmente en Argentina (SENASA, 2017) y es utilizado solo o en combinación con otros herbicidas (CASAFE, 2015).

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la Toxicidad Oral Aguda de los insecticidas combinados Thiamethoxam + Lambdacialotrina (TL); Imidacloprid + Bifentrin + Lambdacialotrina (IBL) y el herbicida 2,4 D sobre abeja melífera obrera adulta (*Apis mellifera.*, L).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) de los insecticidas combinados TL, IBL y el herbicida 2,4 D sobre abeja obrera adulta con el Programa PROBIT 1.5.
- ✓ Determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) de los insecticidas combinados TL, IBL y el herbicida 2,4 D sobre abeja obrera adulta con el Programa PRISMA 6.0.
- ✓ Comparar el Modelo Estadístico de mejor ajuste en la evaluación de la DL₅₀ y la DL₅₀ de los insecticidas combinados TL, IBL y el herbicida 2,4 D, calculado por PROBIT 1,5 Y PRISMA 6.0 en abeja obrera adulta.

HIPÓTESIS

- Los insecticidas combinados Thiamethoxam + Lambdacialotrina; Imidacloprid + Bifentrin + Lambdacialotrina y el herbicida 2,4D presentan alta-toxicidad sobre las abejas melíferas adultas (*Apis mellifera.* L).
- Los modelos estadísticos de regresión lineal presentan menor ajuste que los modelos de tres parámetros.

MATERIALES Y MÉTODOS

CÁLCULO DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀)

Los ensayos de toxicidad oral aguda de los agroquímicos sobre abejas adultas se realizaron en el laboratorio del Curso de Producción Animal I, FCAyF, UNLP, Buenos Aires, Argentina, en septiembre de 2018. La metodología se basó en la técnica propuesta por Medrzycki y col., (2013) con modificaciones, y el resultado fue expresado como DL₅₀ en microgramos de principio activo por abeja (µg p.a./abeja). La clasificación de rangos de toxicidad utilizada en la determinación de DL₅₀, fue la propuesta por la *International Commission for Bee Botany* (ICCB, 1985).

Brevemente, se recolectaron abejas pecoreadoras de colmenas a campo que se anestesiaron durante 5 segundos con CO₂ (Foto 1 [Aquí](#)) para introducirlas en los frascos de prueba (*unidad experimental*) (Foto 2 [Aquí](#)). En cada frasco se incluyeron 10 abejas que se dejaron recuperar espontáneamente y se reemplazaron aquellas que no mostraban signos vitales dentro de los frascos. Se evaluaron 3 tratamientos, cada uno en 5 concentraciones y 5 repeticiones por concentración (Foto 3 [Aquí](#)). Luego de 2 horas de inanición, las abejas fueron alimentadas (alimentador interno) con 200 µL de una solución del principio activo a probar en sacarosa 50 % p/v en agua destilada estéril, en la concentración correspondiente. Cada abeja consumió *ad-libitum* 20 µL de la formulación. Al cabo de 5 horas, para garantizar el consumo total de cada tratamiento, las abejas fueron alimentadas con un alimentador externo que contenía jarabe de sacarosa 50% p/v en agua destilada, hasta finalizar el experimento (72 horas).

Los frascos con abejas se mantuvieron en oscuridad y condiciones ambientales controladas (temperatura ambiente 25°C ± 2 y humedad relativa de 65 %). Los frascos se ubicaron de manera aleatoria sobre las mesadas, sin mezclar los tratamientos, para evitar posibles contaminaciones entre productos.

TRATAMIENTOS Y CONCENTRACIONES

Se analizó la DL₅₀ mediante ensayos de toxicidad oral aguda para dos insecticidas combinados, un herbicida y dos controles: dimetoato, como tóxico estándar y blanco (sacarosa 50 % p/v en ADE)

- Se empleó la combinación de los principios activos de los insecticidas Tiametoxam + Lambdacialotrina (T+L) en proporción: Tiametoxam: 14,1% p/v 3-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5]oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina + Lambdacialotrina: 10,6% p/v mezcla de isómeros (ZR cis S y ZS cis R) del α-ciano-3fenoxibencil-cis-3(Z-2-cloro-3,3,3-trifluoroprop1-enil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato.
- El Imidacloprid + Bifentrín + Lambdacialotrina (IBL) cuya formulación de principios activos puros fue: Imidacloprid 1-(6-cloro-3-piridinil-metil)-N-nitroimidazolidin-2-ilideneamina 20% p/v. Lambdacialotrina:(S)- (-)-ciano-3-fenoxibencil(Z)-

(1R,3R)-3-(2-cloro-3,3,3trifluoropropenil) - 2,2 - dimetilciclopropanocarboxilato; y (R)-
< -ciano-3- fenoxibencil (Z)-(1S,3S)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil-
2,2dimetilciclopropanocarboxilato 2% p/v y Bifentrin: 2-metil[1,1'-bifenil]-3-il)metil 3-[(2-
cloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil]- 2,2-dimetil ciclopropano carboxilato 4% p/v.

- El 2,4-D: el principio activo puro empleado fue la sal dimetilamina del ácido 2,4 dicloro fenoxiacético 60% p/v, equivalente en ácido 2,4- diclorofenoxi acético 50 gr/100 cm³

Los tratamientos se formularon en una solución de sacarosa con agua destilada estéril al 50% (p/v). Se diagramaron 5 concentraciones correspondientes a: 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 µg/L [(correspondiente a 2×10^{-3} , 2×10^{-4} , 2×10^{-5} , 2×10^{-6} y 2×10^{-7} (µg p.a./abeja)]

CÁLCULO DE LAS DILUCIONES:

TRATAMIENTOS

La concentración del producto empleado se encuentra expresada en forma de porcentaje p/v, es decir, gramos de principio activo en 100 ml de formulación. Para la formulación 14.1% Tiametoxam + 10.6% Lambdacialotrina, dando un total de 24,7%. Este valor debe ser expresado en µg/L. Para ello, se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a una solución madre de 247µg/L a partir de la cual se calculó según la fórmula (Figura 3 [Aquí](#)) el volumen necesario a medir para preparar la primera solución (Trabajo) de volumen y concentración conocido (10ml y 100µg/L respectivamente)

A partir de la solución trabajo cuya concentración es de 100 µg/L, se realizaron las diluciones seriadas para preparar las soluciones de 10 µg/L, 1 µg/L, 0.1 µg/L, 0.01 µg/L. Se preparó una solución de sacarosa con agua destilada estéril al 50 % (p/v) para llevar a volumen final cada una de las diluciones. Se efectuaron cinco repeticiones por cada concentración. En la Tabla 1 [Aquí](#) se expone el esquema de diluciones del insecticida Thiametoxam + Lambdacialotrina.

Para el caso del Imidacloprid + Bifentrin + Lambdacialotrina la formulación evaluada constó de 20% de Imidacloprid + 2% de Lambdacialotrina + 4% de Bifentrin, dando un total de 26%. Este valor, al igual que para la formulación anterior, debe ser expresado en µg/L. Para ello, se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a una solución madre

de 260µg/L a partir de la cual se calculó según la fórmula figura 3 [Aquí](#) el volumen necesario a medir para preparar la primera solución (Trabajo) de volumen y concentración. Ver tabla 2 [Aquí](#)

Por último, la formulación de 2-4, D contenía 60% de sal dimetilamina del ácido 2,4 dicloro fenoxiacético, dando un total de 60%. Con el mismo procedimiento se calcularon las soluciones que se muestran en la tabla 3 [Aquí](#)

CONTROLES

A) Dimetoato, como control tóxico estándar (rango de concentraciones 2, 4, 8, 16, 32, 64 µg p.a./abeja)

B) Control blanco (solución de sacarosa al 50 % (p/v) en agua destilada estéril)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se midió la mortalidad diaria de abejas adultas a 24, 48 y 72 h en cada frasco (repetición), concentración y tratamiento. La DL_{50} se calculó por el análisis de regresión PROBIT Versión 1.5 (EPA PROBIT, 1994) y con el Programa PRISMA Versión 6.0. Se efectuaron transformaciones logarítmicas de los valores de dosis para ajustar los modelos no lineales.

CÁLCULO DOSIS LETAL MEDIA (DL_{50}) CON PROBIT

La DL_{50} , se define como la dosis ingerida de una sola vez de principio activo necesario, para que muera la mitad de la población en estudio. El cálculo de la DL_{50} se obtiene trazando una horizontal desde $y=0$ en abscisas y, en el punto de corte es donde se halla el valor buscado. Este modelo de regresión PROBIT para las relaciones entre las distribuciones de mortalidad y las distribuciones del fitosanitario, surge como resultado directo de asumir la condición de normalidad de la distribución de las tolerancias. La DL_{50} se calcula con el 95 % de límite de confianza. Los datos crudos dan valores dispersos por lo cual deben ser corregidos. La corrección se efectuó por la fórmula de Abbot's, porque el parámetro comprendía individuos vivos y un número uniforme de abejas deben ser corregidos (Pirk y col., 2013).

Una vez relevados los datos de mortalidad del experimento se procedió a cargar los valores en PC para su posterior análisis con el software PROBIT (EPA PROBIT, 1994),

El cálculo de la DL₅₀ se realizó luego de ajustar un modelo de regresión logística entre las concentraciones utilizadas y las mortalidades alcanzadas por cada una; a partir de dicho modelo se despejó el valor de concentración que produce el 50% de mortalidad.

Para un mejor ajuste de los modelos algunos autores proponen transformar los datos o aplicar correcciones a los mismos antes de realizar el ajuste del modelo de regresión (Abbot año). En este trabajo se utilizaron datos con y sin transformaciones y correcciones para comparar el efecto del ajuste a los modelos de regresión. Se ensayaron transformaciones logarítmicas (PROBIT) y datos con y sin la corrección de Abbot (Medrzycki et al., 2013; Pirk et al., 2013)

CÁLCULO DE LA DL₅₀ CON PRISMA 6.0

Muchas curvas de log (dosis) vs. respuesta siguen la familiar forma sigmoidea simétrica. El objetivo es determinar la DL₅₀ del agonista: la concentración que provoca una respuesta a medio camino entre la respuesta basal (inferior) y la respuesta máxima (superior).

Este modelo supone que la curva de respuesta a la dosis tiene una pendiente estándar, igual a una pendiente de Hill (o factor de pendiente) de 1.0. Esta es la pendiente esperada cuando un ligando se une a un receptor siguiendo la ley de acción masiva, y es la pendiente esperada de una curva dosis-respuesta cuando el segundo mensajero creado por la estimulación del receptor se une a su receptor por la ley de acción masiva. Si no se tienen muchos puntos de datos, se suele usar el modelo de pendiente estándar. Si se tienen muchos puntos de datos, se elige el modelo de pendiente variable para determinar la pendiente de Hill a partir de los datos.

Esta ecuación a veces se denomina curva de dosis-respuesta de tres parámetros. Si también se ajusta a la pendiente de Hill, entonces es una ecuación de cuatro parámetros (GraphPad Prism versión 6.00 for Windows).

Modelo

$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC50} - X)})$$

Una vez cargados los datos se ensayaron ambos modelos (de 3 y 4 parámetros) para evaluar cuál era el mejor ajuste.

RESULTADOS OBTENIDOS CON PRISMA

Los resultados de DL_{50} se exponen en la Tabla 6 [Aquí](#) y 7 [Aquí](#) y se representan las gráficas obtenidas en las Figuras 5, 6 y 7 [Aquí](#). El insecticida Tiametoxam + Lambdacialotrina resultó “*altamente tóxico*” con un valor de $4,7 \times 10^{-4}$; $2,8 \times 10^{-4}$ y $3,5 \times 10^{-4}$ μg p.a./abeja, a 24, 48 y 72 h, respectivamente. En lo que respecta a la combinación de 3 principios activos Imidacloprid + Bifentrín + Lambdacialotrina, resultaron “*altamente tóxicos*” y los resultados obtenidos fueron: $3,2 \times 10^{-4}$; $1,7 \times 10^{-4}$ y $4,3 \times 10^{-5}$ μg p.a./abeja para las 24, 48 y 72 h, respectivamente. Por último, el herbicida 2,4-D arrojó los siguientes resultados: $1,3 \times 10^{-4}$ y 1×10^{-4} μg p.a./abeja a las 24 y 72 h, por lo que se clasifica “*altamente tóxicos*”. A las 48 h no se obtuvo ajuste. Todos los resultados expuestos corresponden al modelo de 3 parámetros ya que el de 4 parámetros no ajustó.

COMPARACIÓN DE MODELOS / SOFTWARES PROBIT-PRISMA

Probit resultó un modelo eficiente cuando se confirma la normalidad de los datos, pero al fallar este supuesto el modelo no permite buenos ajustes o directamente falla en ajustar un modelo. En cuanto a PRISMA, logró obtener modelos para casi todos los producto-dilución y además aporta el valor de R^2 para dicho ajuste, dato importante al momento de evaluar o comparar modelos. Por lo que resultó mejor utilizar dicho software.

DISCUSIÓN

Las prácticas agrícolas convencionales que se basan principalmente en el uso de insecticidas químicos, dirigidos a plagas que dañan los cultivos, reducen tanto el número como la diversidad de insectos afectando los ecosistemas (Turnbull , 2010; Gibbons et al., 2015). La alteración del hábitat es considerada como el factor responsable más importante de la pérdida de insectos polinizadores. Durante la última década, los residuos de agroquímicos en el polen se han convertido en una gran preocupación y una posible contribución a la disminución de las colonias de abejas melíferas (Gierer et al., 2019). Tanto las abejas silvestres como las manejadas están sujetas a múltiples presiones ambientales que interactúan entre ellas (González-Varo et al., 2013). En los paisajes agrícolas modernos suelen existir exposiciones a varias clases de pesticidas (Mullin et al., 2010), creando oportunidades para múltiples efectos combinados. Si bien, los insectos, pueden no estar expuestos a dosis de insecticidas que generen intoxicaciones agudas letales, se han demostrado efectos adversos subletales e indirectos como los que se evidenciaron en este estudio y, entre los que podemos mencionar descoordinación en los movimientos, parálisis, hiperexcitación y convulsión (Li et al., 2017; Wood et al., 2019).

Las revisiones sobre el efecto de los agroquímicos en las abejas, a menudo se han ocupado específicamente del papel de los neonicotinoides en la disminución o pérdida de colonias de abejas melíferas (Cresswell et al., 2012; Maini et al., 2010; Farooqui et al., 2013, Smith et al., 2013) y en los efectos del uso de neonicotinoides en el medio ambiente en general (Goulson, 2013). Los neonicotinoides que se utilizan ampliamente para el tratamiento de semillas y la pulverización foliar se han implicado como insecticidas clave en este tema. El efecto de los neonicotinoides podría ser aditivo para las abejas en combinación con otras clases de insecticidas como piretroides (Gill et al., 2012; Gill et al., 2014), pesticidas en la colmena (Palmer et al., 2013) o incluso interactuar sinérgicamente con fungicidas (Biddinger et al., 2013).

Los insecticidas neonicotinoides, en particular imidacloprid, clotianidina y tiametoxam, son los principales responsables del aumento de la carga de toxicidad en el ambiente debido a su residualidad. Las exposiciones orales podrían encontrarse dentro de las más preocupantes debido a la mayor toxicidad relativa (DL_{50} baja) y una mayor probabilidad de exposición de residuos en polen, néctar y agua de evisceración entre otros (Alkassab et al., 2017). La exposición a este grupo de agroquímicos, en las

primeras etapas de la vida de las abejas, puede tener tanto efectos letales directos como efectos subletales retardados en los adultos (Yang et al., 2012; Tan et al., 2015). Por otra parte, la toxicidad crónica para las abejas podría estar causada por el retraso y acumulación de tiempo toxicidad del producto (Gill et al., 2012; Rondeau et al., 2015).

Algunas investigaciones se han centrado en las concentraciones de neonicotinoides que se encuentran en el medio ambiente al que las abejas podrían estar expuestas, los efectos en las abejas y la evaluación de riesgos (van der Sluijs et al., 2013; Blacquièrre et al., 2012; Pisa et al., 2014). Recientemente se ha resumido el estado de la base de pruebas científicas de los efectos de los neonicotinoides en las abejas (Godfrayet al., 2014). Los estudios que miden los efectos en el individuo proporcionan conocimientos sobre la toxicidad de estos productos en las abejas (wasa et al., 2004), así como los efectos subletales sobre la longevidad, comportamiento de búsqueda de alimento, alimentación, aprendizaje y memoria (Cresswell et al., 2012; Gill et al., 2014; Decourtye et al., 2004; Decourtye et al., 2004; Schneider et al., 2013).

Wang et al. (2020) estudiaron combinaciones binarias a octogonales del insecticida neonicotinoide acetamiprid (ACT) y siete pesticidas, entre ellos Bifentrín y Lambdacialotrina que mostraron que el 44,90% de las combinaciones presentaron efectos sinérgicos en las abejas. En concordancia, los resultados obtenidos en este trabajo de DL_{50} para Thiamethoxam–Lambdacialotrina, ubican a esta combinación de agroquímicos en el rango “*altamente tóxico*” con un valor de $2 \times 10^{-3}, 1 \times 10^{-3} \mu\text{g p.a./abeja}$, a las 24 - 48 h, respectivamente. Sin embargo, para la combinación de 3 principios activos Imidacloprid-Bifentrín-Lambdacialotrina, los resultados obtenidos no ajustaron al modelo de regresión lineal para ningún horario. Del mismo modo, los valores de DL_{50} obtenidos con el modelo no lineal, ubican a ambas combinaciones de agroquímicos (Tiametoxam+Lambdacialotrina e Imidacloprid+Bifentrín+Lambdacialotrina) en el rango “*altamente tóxico*” a 24, 48 y 72 h.

La hipótesis sobre la cual el modelo lineal no ajusta puede deberse a la alta toxicidad que determinó el modelo no lineal dando los valores más bajos de DL_{50} para el agroquímico IBL así mismo al ser un ensayo por ingestión es probable que las abejas al no percibirlo a dosis bajas lo consuman más y cuando está presente en altas concentraciones estas lo perciben y no lo consumen. Este comportamiento da por resultado mortalidades altas para dosis bajas y mortalidades no tan altas para altas

dosis. Estos resultados producen datos que no son ajustables a los modelos clásicos para analizar las curvas de dosis respuesta. De acuerdo a los análisis realizados por Asmari et al., (2020) que verificaron que las combinación imidacloprid/difernocazole o imidacloprid/glifosato producían mayor mortalidad que los plaguicidas solos, nuestros resultados podrían sugerir la presencia de efectos sinérgicos en las combinaciones estudiadas.

El producto 2,4-D ha sido clasificado por la EPA como “leve” a “moderadamente tóxico” (categoría II-III) (USEPA, 1974), y por la OMS como “moderadamente peligroso” (clase II) (WHO, 2009). En 2015, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó al 2,4-D como un posible “agente cancerígeno” para humanos (Grupo 2B) (Loomis et al, 2015).

Actualmente en Argentina, hay más de 172 productos que contienen 2,4-D (SENASA, 2017) y es utilizado solo o en combinación con otros herbicidas (CASAFE, 2015). En lo que respecta a las abejas, existen pocos estudios sobre el efecto tóxico del 2,4 D.

Burgeon et al.,(2016) evaluaron la toxicidad letal y subletal crónica de varias mezclas binarias de pesticidas identificando que, en *A. mellifera* la toxicidad disminuyó en el orden clotianidina > dimetoato > cadmio > arsénico > tau-fluvalinato > propiconazol > = 2,4-D. Heard et al., (2017) demostraron que este herbicida aplicado a colonias de abejas por vía sistémica con jarabe al 50 % durante 10 días, presentó una reducida toxicidad, con un valor de DL₅₀ mayor a 900 mg/L. Contrariamente, en nuestros análisis, hallamos valores de DL₅₀ con el modelo lineal de 7,137 y 3,2 x 10⁻² µg p.a./abeja a 24 - 48 h, que corresponden a niveles “moderadamente y altamente tóxicos” para las abejas y, una DL₅₀ para 24 y 72 h clasificadas como “altamente tóxicas” con el modelo no lineal.

Las tasas altas de pérdida de colonias afectan directamente al ecosistema, a los apicultores y a la producción. Las posibles relaciones entre la pérdida de colonias de abejas melíferas y los efectos de los residuos de agroquímicos plantean una serie de preocupaciones, desde impactos adversos graves hasta riesgos muy bajos o nulos. En este sentido, las evaluaciones del riesgo de los agroquímicos tienen el potencial de mejorar nuestra base de pruebas sobre los efectos en las abejas, requiriendo especial atención, los posibles riesgos y peligros que las formulaciones de principio activo como sus residuos, pueden generar sobre las abejas y otros organismos participantes del ecosistema.

Si bien, en las abejas melíferas y otras abejas sociales, la colonia es la unidad de reproducción, y las pérdidas de abejas individuales pueden tolerarse hasta cierto nivel sin consecuencias para la supervivencia o reproducción de la colonia, consideramos de suma importancia realizar futuras pruebas a campo que determinen los efectos de los agroquímicos sobre las abejas que pecorean los cultivos, al igual que determinar cuáles son los residuos en polen y néctar para compararlos con las dosis que se probaron en este ensayo y, de este modo, determinar la posible peligrosidad de estos productos.

CONCLUSIÓN:

Los insecticidas evaluados resultaron "*altamente tóxicos*" siendo aún más tóxica la formulación de 3 principios activos. Para el herbicida se obtuvieron valores de toxicidad que hacen necesarios futuros estudios que determinen los efectos en las abejas. En cuanto a los modelos estadísticos, la regresión lineal presenta mayor sensibilidad para este tipo de ensayos por lo que el modelo no lineal tiene un mayor ajuste.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18: 265
2. Alkassab A, Kirchner W. 2017. Sublethal exposure to neonicotinoids and related effects on insect pollinators: honeybees, bumblebees, and solitary bees. *J Plant Dis Prot.*; 124:1–30.
3. Almasri, H., Tavares, D. A., Pioz, M., Sené, D., Tchamitchian, S.; Cousin, M.; ... & Belzunces, L. P. 2020. Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. *Ecotoxicol & Environ Safety*, 203, 111013.
4. Antúnez, K.; Invernizzi, C.; Mendoza, Y.; vanEngelsdorp, D. & Zunino, P. 2017. Honeybee colony losses in Uruguay during 2013-2014. *Apidologie*, 48: 364–370. doi: 10.1007/ s13592-016-0482-2
5. Arregui, M.C., & Puricelli, E. 2008. Mecanismos de acción de plaguicidas. Dow AgroSciences Argentina
6. Auteri, D.; Arena, M.; Barmaz S.; Ippolito, A.; Linguadoca, A.; Molnar ,T.; ... & Verani, A. 2017. Neonicotinoids and bees: The case of the European regulatory risk assessment. *Sci Total Environ.*; 579: 966-71.
7. Azpiazu, C., Bosch, J., Viñuela, E., Medrzycki, P., Teper, D., & Sgolastra, F. 2019. Chronic oral exposure to field-realistic pesticide combinations via pollen and nectar: effects on feeding and thermal performance in a solitary bee. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
8. Bartomeus, I., & Dicks, L. V. 2019. The need for coordinated transdisciplinary research infrastructures for pollinator conservation and crop pollination resilience. *Environ Res Letters*, 14(4), 045017.
9. Bass, C.; Desanholm, 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic Biochem Physiol.*; 121: 78–87 <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
10. Biddinger DJ, Robertson JL, Mullin C, Frazier J, Ashcraft SA, Rajotte EG, et al. 2013. Comparative toxicities and synergism of apple orchard pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). *PLoS One.*; 8: e72587. doi:

- 10.1371/journal.pone.0072587 PMID: 24039783 117.
11. Blake R. 2018. Eu Neonicotinoid Ban Removes Vital Tools in Global Fight Against Pests. *Outlooks Pest Manag.*; 29(5), 197-200./s10393-013-0870-2 PMID: 24496582
 12. Blacquièrre T, Smagghe G, Van Gestel CA, Mommaerts V. 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology.*; 21: 973–992. doi: 10.1007/s10646-012-0863-x PMID: 22350105
 13. Brandon H, Robinson E. 2015. *Delta Agricultural Digest*. Farm Press, Clarksdale, MS.
 14. Calderone NW. 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. *PLoS ONE.*; 7(5): e37235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037235> PMID: 22629374
 15. Campana, C., Peralta, C., Cecconello, J. C., Pons, D. H., Uranga, J., Scavuzzo, M. C., & Ferral, A. 2019. Geospatial tools applied to the generation of an aptitude map for the development of beekeeping activity in San Javier, Córdoba, Argentina. In 2019 XVIII Workshop on Information Processing and Control (RPIC) (pp. 298-302). IEEE..
 16. CASAFE. 2015. Guía on line de fitosanitarios. Disponible en: https://www.casafe.org/?gclid=CjwKCAiAnvj9BRA4EiwAuUMDf2SC2ez9NamW4sekFR95oug4IU4rKH4Q6I4I767eqsV-2QihtrXVxoChOIQAvd_BwE
 17. Catchot A, Allen C, Cook D, Dodds D, Gore J, Irby T, et al. 2016. Insect control guide for agronomic crops. Insect Control Guide Committee, Mississippi State University Extension Service Publication 2471
 18. CEB. 2011. Methode n°230: Method for the evaluation of side effects of plant protection products on honey bees (*Apis mellifera* L.). Association Française de Protection des Plantes. 43pp.
 19. Cedergreen N. 2014. Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS One*; 9(5): e96580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580> PMID: 24794244
 20. Charreton, M., Decourtye, A., Henry, M., Rodet, G., Sandoz, J. C., Charnet, P., & Collet, C. 2015. A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. *PLoS one*, 10(12), e0144879
 21. Copati E. Informe de precampaña. *Panorama Agrícola Semanal (PAS)*. 2019; 26. Disponible en: Bolsa de Cereales.com

22. Cook, S. C. 2019. Compound and dose-dependent effects of two neonicotinoid pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) metabolic physiology. *Insects*, 10(1), 18
23. Cowles, R. S., & Eitzer, B. D. 2017. Residues of neonicotinoid insecticides in pollen and nectar from model plants. *J Environ Hortic*, 35(1), 24-34.
24. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA et al., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science.*; 318:283–87.
25. Cressey D, Europe debates risk to bees. *Nature*. 2013; 496: 408.
26. Cresswell JE, Desneux N, van Engelsdorp D. 2012. Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honey bees: an evaluation by Hill's epidemiological criteria. *Pest Manag Sci.*; 68: 819–827. doi: 10.1002/ps.3290 PMID: 22488890
27. Cresswell JE, Page CJ, Uygun MB, Holmbergh M, Li Y, Wheeler JG, et al. 2012. Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zool*; 115: 365–371. doi: 10.1016/j.zool.2012.05.003 PMID: 23044068
28. de B Pazini, J., Pasini, R. A., Rakes, M., de Armas, F. S., Seidel, E. J., da S Martins, J. F., & Grützmacher, A. D. 2017. Toxicity of pesticide tank mixtures from rice crops against *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygastridae). *Neotrop entomol.*, 46(4), 461-470.
29. Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue M-H, 2003. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Safety* ; 57:410–419. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.001>
30. Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, et al. 2004. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*A. mellifera* L.). *Pestic Biochem Phys*. 2004; 78: 83–92.
31. Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial Arthropods. *Annu Rev Entomol.*; 52: 81-106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440> PMID: 16842032
32. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
33. Ellis, J.D., Evans, J.D. & Pettis, J. 2010. Colony losses, managed colony

population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49:1, 134-136. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.30

34. EPA PROBIT, 1994. PROBIT Versión 1.5.

35. EPPO. 2010b. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 10: Honey bees. *EPPO Bulletin* 40(3):323-331

36. FAOSTAT. 2017. Estadísticas. Usos pesticidas. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/>

37. Fairbrother A, Purdy J, Anderson T, Fell R. 2014. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environ Toxicol Chem.*; 33: 719–731. doi: [10.1002/etc.2527](https://doi.org/10.1002/etc.2527) PMID: [24692231](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24692231/)

38. Farooqui, T. (2013). A potential link among biogenic aminesbased pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochemistry International*, 62: 122–136. Doi: 10.1016/j.neuint.2012.09.020

39. Gallai N, Salles JM, Settele J and Vaissière BE, 2009 Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ.* ; 68: 810–21

40. García, MLG; Plischuk, S; Bravi, CM; Reynaldi, FJ. 2019. An Overview on Honeybee Colony Losses in Buenos Aires Province, Argentina. *Sociobiology* 66(1): 43-48 DOI: 10.13102/sociobiology.v66i1.3366

41. Gibbons D, Morrissey C, Mineau P. 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ Sci Pollut Res.*; 22(1):103–18. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5> Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3180-5>. PMID: 24938819

42. Gierer, F., Vaughan, S., Slater, M., Thompson, H. M., Elmore, J. S., & Girling, R. D. 2019. A review of the factors that influence pesticide residues in pollen and nectar: Future research requirements for optimising the estimation of pollinator exposure. *Environ Poll* 249, 236-247.

43. Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine ME, 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*; 491:105–119. <https://doi.org/10.1038/nature11585> PMID: 23086150

44. Gill RJ, Raine NE. 2014. Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure. *Funct Ecol*; 28: 1459–1471.

45. Global top producers. 2019. Disponible

- en:<https://www.statista.com/statistics/812172/global-top-producers-of-honey>. 2019.
46. Global top exporters. 2019. Disponible en:<https://www.statista.com/statistics/812172/global-top-exporters-of-honey>. 2019.
47. Godfray HCJ, Blacquière T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, et al. 2014. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proc R Soc B*; 281: 20140558. doi: 10.1098/rspb.2014.0558 PMID: 24850927
48. González-Varo JP, Biesmeijer JC, Bommarco R, Potts SG, Schweiger O, Smith HG, et al. 2013. Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends Ecol Evol*; 28: 524–530. doi: 10.1016/j.tree.2013.05.008 PMID: 23746938
49. Gough HJ, McIndoe EC, Lewis GB. 1994. The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L. 1981-1992) *J Apicult Res*; 33(2): 119-125.
50. Goulson D. 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J Appl Ecol*; 50: 977–987.
51. GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com
52. Greene JK, Turnipseed SG, Sullivan MJ, Herzog GA. 1999. Boll damage by southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) and tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) caged on transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton. *J Econ Entomol*; 92: 941–944.
53. Han W, Tian Y, & Shen X. 2018. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere*; 192, 59-65.
54. Heard MS, Baas J, Dorne JL, Lahive E, Robinson AG, Rortais A, ... & Hesketh H. 2017. Comparative toxicity of pesticides and environmental contaminants in bees: Are honey bees a useful proxy for wild bee species? *SciTotal Environ*; 578: 357-65.
55. Human H, Brodschneider R, Dietemann V, Dively G, Ellis J, Forsgren E, Fries I, Hatjina F, Hu F-L, Jaffé R, Jensen AB, Köhler A, Magyar J, Özikrim A, Pirk CWW, Rose R, Strauss U, Tanner G, Tarpy DR, Van Der Steen JJM, Vaudo A, Vejsnæs F, Wilde J, Williams GR, Zheng HQ. 2013. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research*. *J Apicul Res*:

52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>

56. Godfray HCJ, Blacquièrè T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, et al. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proc R Soc B*. 2014; 281: 20140558. doi: 10.1098/rspb.2014.0558 PMID: 24850927

57. Godfray HCJ, Tjeerd Blacquièrè, Linda M. Field, Rosemary S. Hails, Gillian Petrokofsky, Simon G. Potts, Nigel E. Raine, Adam J. Vanbergen y Angela R. McLean

58. ICBB (International Commission for Bee Botany), 1985. 3rd Symposium on the Harmonisation of Methods for Testing the Toxicity of Pesticides to Bees. Rothamsted Experimental Station, England International Commission for Plant-Bee Relationships (ICPBR). Hazard of Pesticides to Bees. Guidelines on test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honeybees. Wageningen, The Netherlands, 1993 ver. 24/10/93 Appendix 22: EPPO G 170. European and Mediterranean Plant Protection Organization.

59. INTA. 2016. La polinización, una problemática con impacto sobre la productividad de los cultivos. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/la-polinizacion-una-problematica-con-impacto-sobre-la-productividad-de-los-cultivos>

60. Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot.*; 2: 371–378.

61. Jeon, S. O., Hwang, J. I., Kim, T. H., Kwon, C. H., Son, Y. U., Kim, D. S., & Kim, J. E. 2015. Residual patterns of insecticides bifenthrin and chlorfenapyr in perilla leaf as a minor crop. *Korean J Environ Agric*, 34(3), 223-229.

62. Jiang, J., Ma, D., Zou, N., Yu, X., Zhang, Z., Liu, F., & Mu, W. 2018. Concentrations of imidacloprid and thiamethoxam in pollen, nectar and leaves from seed-dressed cotton crops and their potential risk to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Chemosphere*, 201, 159-167.

63. Johnson RM, Honey bee toxicology. 2015. *Annu Rev Entomol.*; 60:415–34

64. Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C et al., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc B Biol Sci.*; 274:303–13.

65. Krupke CH, Obermeyer JL, Bledsoe LW. 2016. Corn Insect Control Recommendations— 2016. Purdue University Extension Publication E-219-W..

<https://extension.entm.purdue.edu/publications/E-219.pdf>

66. Larson JL, Redmond CT, Potter DA. 2013. Assessing insecticide hazard to bumble bees foraging on flowering weeds in treated lawns. *PLoS One.*; 8(6): e66375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066375> PMID: 23776667
67. Lechenet, M., Dessaint, F., Py, G., Makowski, D., Munier-Jolain, N., 2017. Reducing pesticide use 1673 while preserving crop productivity and profitability on arable farms. *Nat. Plants* 3, 17008. 1674 <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.8>
68. Li, Z., Li, M., He, J., Zhao, X., Chaimanee, V., Huang, W. F., ... & Su, S. 2017. Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 140, 1-8.
69. Loomis, D., Guyton, K., Grosse, Y., El Ghissasi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., ... & Monograph Working Group. 2015. Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *The Lancet. Oncology*, 16(8), 891.
70. Lu YH, Qiu F, Feng HQ, Li HB, Yang ZC, Wyckhuys KAG, et al. 2008. Species composition and seasonal abundance of pestiferous plant bugs (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in China. *Crop Prot.*;7: 465–472.
71. Maini, R., & Aggarwal, H. 2010. A comprehensive review of image enhancement techniques. arXiv preprint arXiv:1003.4053.
72. Maggi, M., Antúnez, K., Invernizzi, C., Aldea, P., Vargas, M., Negri, P., ... & Barrios, C. 2016. Honeybee health in South America. *Apidologie*, 47(6), 835-854.
73. Manjon, C.; Troczka, B.J.; Zaworra, M.; Beadle, K.; Randall, E.; Hertlein, G.; Singh, K.S.; Zimmer, C.T.; Homem, R.A.; Lueke, B.; et al. 2018. Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Curr. Biol.*, 28, 1137–1143.
74. Meana, A., Llorens-Picher, M., Euba, A., Bernal, J.L., Bernal, J., Garcia-Chao, M., Dagnac, T., Castro-Hermida, J.A., Gonzalez-Porto, A.V., Higes, M. & Martin-Hernández, R. 2017. Risk factors associated with honey bee colony loss in apiaries in Galicia, NW Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15 (1): e0501. doi: 10.5424/sjar/2017151-9652
75. Medrzycki P; Sgolastra F; Bortolotti L; Bogo G; Tosi S; Padovani E; Porrini C; Sabatini AG. 2010. Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning by pesticides. *J Apicul Res.*; 49(1): 52-9.

76. MINAGRI. 2020. Apicultura. Disponible en: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Apicultura/>
77. Mondino M. 2020. Daños del herbicida 2,4 D en el cultivo de algodón. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/dano_del_herbicida_24-d.pdf. Último acceso: febrero 2020.
78. Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, & Pettis JS. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS one.*; 5(3), e9754. ISO 690
79. OECD. 1998a. OECD guideline for testing of chemicals. Test No 213: Honey bees, acute oral toxicity test. OECD 1998b. OECD guideline for testing of chemicals. Test No 214: Honey bees acute contact toxicity test.
80. Palmer MJ, Moffat C, Saranzewa N, Harvey J, Wright GA, Connolly CN. 2013. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nat Commun.*; 4: 1634. doi: [10.1038/ncomms2648](https://doi.org/10.1038/ncomms2648) PMID: [23535655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23535655/)
81. Pirk CWW, de Miranda JR, Kramer M, Murray TE, Nazzi F, Shutler D, van der Steen JJM & van Dooremalen C 2013. Statistical guidelines for Apismellifera research, *J Apicul Res.* 52:4, 1-24, DOI: [10.3896/IBRA.1.52.4.13](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.13)
82. Pisa L, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin J-M, Downs C, Goulson D, et al. 2014. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res.*; 22: 68–102.
83. Poquet Y, Bodin L, Tchamitchian M, Fusellier M, Giroud B, Lafay F, et al. 2014. A pragmatic approach to assess the exposure of the honey bee (*Apis mellifera*) when subjected to pesticide spray. *PLoS One.*;9(11):e113728. Epub 2014/11/21. PONE-D-14-36042 [pii]. pmid:25412103; PubMed Central PMCID: PMC4239102
84. Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global 1825 pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–53.
85. Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H.T., Aizen, M.A., Biesmeijer, J.C., Breeze, T.D., Dicks, L.V., 1827 Garibaldi, L.A., Hill, R., Settele, J., Vanbergen, A.J., 2016. Safeguarding pollinators and their 1828 values to human well-being. *Nature* 540, 220–229.

86. Requier, F., Antúnez, K., Morales, C. L., Aldea Sánchez, P., Castilhos, D., Garrido, P. M., ... & Garibaldi, L. A. 2018. Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America. *J Apicul Res*, 57(5), 657-662.
87. Rondeau G, Sánchez-Bayo F, Tennekes HA, Decourtye A, Ramírez-Romero R, Desneux N. 2014. Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Sci Rep.*; 4: 5566. doi: 10.1038/srep05566 PMID: 24993452
88. Sanchez-Bayo F, Goka K. 2014. Pesticide residues and bees—A risk assessment. *PLoS ONE*; 9(4): e94482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482> PMID: 24718419
89. Sánchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, Nazzi F, Goka K, Desneux N, 2016. Are bee diseases linked to pesticides? —A brief review. *Environ Int.*; 89–90:7–11.
90. SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT® 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc
91. Schneider CW, Tautz J, Grünewald B, Fuchs S. 2012. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *A. mellifera*. *PLoS One.*; 7: e30023. doi: 10.1371/journal.pone.0030023 PMID: 22253863
92. SENASA. 2019. Inscripción en el Registro de Toxicología y Ecotoxicología. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/inscripcion-en-el-registro-de-toxicologia-y-ecotoxicologia>
93. Smith KM, Loh EH, Rostal MK, Zambrana-Torrel CM, Mendiola L, Daszak P. 2013. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *EcoHealth.*; 10: 434–445. doi: 10.1007/s10393-013-0870-2 PMID: 24496582
94. Song, Y. 2014. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4- D) as an herbicide. *J Integr Plant Biology*. doi:10.1111/jipb.12131
95. Submitter, E.S.I.C., Tomás, B., Elena, A., Alberto, G., & José, P. 2020. Typology and Characterization of the Pampean Beekeeping Systems. *ESIC Market Economics and Business Journal*, 51(2), 299-318
- Thapa RB, Honeybees and other insect pollinators of cultivated plants: a review. *J Inst Agric Anim Sci*. 2006; 27:1-23.
96. Tan K, Chen W, Dong S, Liu X, Wang Y, Nieh JC. 2015. A neonicotinoid impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. *Sci Rep.*; 5 10989. doi: 10.1038/srep10989 PMID: 26086769

97. Thompson, H., Overmyer, J., Feken, M., Ruddle, N., Vaughan, S., Scorgie, E., ... & Hill, M. 2019. Thiamethoxam: Long-term effects following honey bee colony-level exposure and implications for risk assessment. *Science of the Total Environment*, 654, 60-71.
98. Turnbull L, HA. 2010. Applied ecology: how to get even with pests. *Nature* 2010; 466(7302):36–7. <https://doi.org/10.1038/466036a> Available from: <https://doi.org/10.5167/uzh-35625>. PMID: 20596003
99. Van Leeuwen T, Van Pottelberge S, Tirry L. 2006. Biochemical analysis of a chlorfenapyr-selected resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch. *Pest Manag Sci.*; 62(5):425-33. <https://doi.org/10.1002/ps.1183> PMID: 16550506
100. van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin JM, Belzunces LP. 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr Opin Environ Sustainability*. 5: 293–305.
101. vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK et al., 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One.*; 4:e6481.
102. VanEngelsdorp, D. & Meixner, M.D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invert Pathol*, 103: S80-S95. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.011
103. Wade, A., Lin, C. H., Kurkul, C., Regan, E. R., & Johnson, R. M. 2019. Combined toxicity of insecticides and fungicides applied to California almond orchards to honey bee larvae and adults. *Insects*, 10(1),
104. Wang, Y., Zhu, Y. C., & Li, W. 2020. Interaction patterns and combined toxic effects of acetamiprid in combination with seven pesticides on honey bee (*Apis mellifera* L.). *Ecotoxicology and environmental safety*, 190, 110100.
105. Williams GR, Alaux C, Costa C, Csáki T, Doublet V, Eisenhardt D, Fries I, Kuhn R, McMahon DP, Medrzycki P, Murray TE, Natsopoulou ME, Neumann P, Oliver R, Paxton RJ, Pernal SF, Shutler D, Tanner G, Van Dersteven JJM, Brodschneider R. 2013. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under *in vitro* laboratory conditions. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research*. *J Apicul Res.*; 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04>

106. Wood, S. C., Kozii, I. V., Medici de Mattos, I., de Carvalho Macedo Silva, R., Klein, C. D., Dvylyuk, I., ... & Simko, E. 2020. Chronic High-Dose Neonicotinoid Exposure Decreases Overwinter Survival of *Apis mellifera* L. *Insects*, 11(1), 30.
107. World Health Organization. 2009.
108. Yang EC, Chang HC, Wu WY, Chen YW. 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS One*; 7: e49472. doi: 10.1371/journal.pone.0049472 PMID: 23166680
109. Zhu W, Schmehl DR, Mullin CA, Frazier JL. 2014. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS ONE.*; 9(1): e77547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077547> PMID: 24416121
110. Zhu YC, Guo Z, He Y, Luttrell R. 2012. Microarray analysis of gene regulations and potential association with acephate-resistance and fitness cost in *Lygus lineolaris*. *PLoS ONE.*; 7 (5), e37586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037586> PMID: 22655059
111. Zhu YC, Snodgrass GL, Chen MS. 2004. Enhanced esterase gene expression and activity in a malathion-resistant strain of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Insect Biochem Mol Biol.*; 34: 1175–1186. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.07.008> PMID: 15522613
112. Zhu YC, Yao J, Adamczyk J & Luttrell R. 2017. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS one.*; 12(5), e0176837.

ANEXO

TABLAS

Tabla 1. Diluciones seriadas evaluados del insecticida Tiametoxam y Lambdacialotrina (TL)

Table 1. Dilutions evaluated in the Thiametoxam and Lambdacialotrina insecticide (TL)

	SM ⁽¹⁾	SS ⁽²⁾	ST ⁽³⁾	D2 ⁽⁴⁾	D3 ⁽⁵⁾	D4 ⁽⁶⁾	D5 ⁽⁷⁾
ST ⁽³⁾	4.04ml	5,96ml	100µg/L				
D2 ⁽⁴⁾		9ml	1ml	10 µg/L			
D3 ⁽⁵⁾		9ml		1ml	1µg/L		
D4 ⁽⁶⁾		9ml			1ml	0,1µg/L	
D5 ⁽⁷⁾		9ml				1ml	0,01µg/L

SM (1) (Solución madre 247µg/L), SS (2) (Solución de sacarosa 50%p/v), ST(3) (solución trabajo a probar 100 µg/L), D2(4) (Dilución 2 a probar 10 µg/L), D3(5) (Dilución 3 a probar 1 µg/L), D4(6) (Dilución 4 a probar 0.1 µg/L), D5(7) (Dilución 5 a probar 0.05 µg/L).

SM (1) (247 µg/L stock solution), SS (2) (50% w / v sucrose solution), ST (3) (100 µg/L working solution to be tested), D2 (4) (Dilution 2 to try out 10 µg/L), D3 (5) (Dilution 3 to test 1 µg/L), D4 (6) (Dilution 4 to test 0.1 µg/L), D5 (7) (Dilution 5 to test 0.05 µg/L)

Tabla 2. Diluciones del insecticida Imidacloprid +Bifentrin + Lambdacialotrina (IBL)

Table 2. Dilutions of the insecticide Imidacloprid + Bifenthrin + Lambdacialothrin (IBL)

	SM ⁽¹⁾	SS ⁽²⁾	ST ⁽³⁾	D2 ⁽⁴⁾	D3 ⁽⁵⁾	D4 ⁽⁶⁾	D5 ⁽⁷⁾
ST ⁽³⁾	3,84ml	6,16ml	100 µg/L				
D2 ⁽⁴⁾		9ml	1ml	10 µg/L			
D3 ⁽⁵⁾		9ml		1ml	1 µg/L		
D4 ⁽⁶⁾		9ml			1ml	0,1 µg/L	
D5 ⁽⁷⁾		9ml				1ml	0,01 µg/L

SM (1) (Solución madre 247µg/L), SS (2) (Solución de sacarosa 50%p/v), ST(3) (solución trabajo a probar 100 µg/L), D2(4) (Dilución 2 a probar 10 µg/L), D3(5) (Dilución 3 a probar 1 µg/L), D4(6) (Dilución 4 a probar 0.1 µg/L), D5(7) (Dilución 5 a probar 0.05 µg/L).

SM (1) (247µg / L stock solution), SS (2) (50% w / v sucrose solution), ST (3) (100 µg / L working solution to be tested), D2 (4) (Dilution 2 to test 10 µg / L), D3 (5) (Dilution 3 to test 1 µg / L), D4 (6) (Dilution 4 to test 0.1 µg / L), D5 (7) (Dilution 5 to test 0.05 µg / L)

Tabla 3. Diluciones evaluados del herbicida 2-4, D

Table 3. Dilutions evaluated of herbicide 2-4, D

	SM ⁽¹⁾	SS ⁽²⁾	D1 ⁽³⁾	D2 ⁽⁴⁾	D3 ⁽⁵⁾	D4 ⁽⁶⁾	D5 ⁽⁷⁾
D1 ⁽³⁾	1,6ml	8,4ml	100µg/L				
D2 ⁽⁴⁾		9ml	1ml	10µg/L			
D3 ⁽⁵⁾		9ml		1ml	1µg/L		
D4 ⁽⁶⁾		9ml			1ml	0,1µg/L	
D5 ⁽⁷⁾		9ml				1ml	0,01µg/L

SM (1) (Solución madre 247µg/L), SS (2) (Solución de sacarosa 50%p/v), ST(3) (solución trabajo a probar 100 µg/L), D2(4) (Dilución 2 a probar 10 µg/L), D3(5) (Dilución 3 a probar 1 µg/L),

D4(6) (Dilución 4 a probar 0.1 µg/L), D5(7) (Dilución 5 a probar 0.05 µg/L).

SM (1) (247µg / L stock solution), SS (2) (50% w / v sucrose solution), ST (3) (100 µg / L working solution to be tested), D2 (4) (Dilution 2 to try out 10 µg / L), D3 (5) (Dilution 3 to test 1 µg / L),

D4 (6) (Dilution 4 to test 0.1 µg / L), D5 (7) (Dilution 5 to test 0.05 µg / L) .

Tabla 4. Dosis letal media (DL₅₀) para abeja adulta de insecticidas Tiametoxán+Lambdacialotrina e Imidacloprid + Bifendrin + Lambdacialotrina

Table 4. Mean lethal dose (LD₅₀) for adult bees of insecticides Thiamethoxan + Lambdacialothrin and Imidacloprid + Bifendrin + Lambdacialothrin

Toxicidad oral aguda de abeja adulta (µgr p.a / abeja)							
Tratamiento	T ⁽¹⁾	Intercepción	E.Std. ⁽²⁾	Pendiente	E. Std. ⁽²⁾	DL ₅₀ ⁽³⁾	RT ⁽⁴⁾
TL ⁽⁷⁾	24	6.320803	0.373776	0.488521	0.102184	0.002	At ⁽⁶⁾
TL ⁽⁷⁾	48	6.113245	0.365959	0.373171	0.098120	0.001	At ⁽⁶⁾
TL ⁽⁷⁾	72	6.057204	0.362759	0.234110	0.095238	0.000	At ⁽⁶⁾
IBL ⁽⁸⁾	24	6.537415	0.273200	0.444400	0.065154	0.000	At ⁽⁶⁾
IBL ⁽⁸⁾	48	6.225946	0.264083	0.293618	0.060885	0.000	At ⁽⁶⁾
IBL ⁽⁸⁾	72	6.608334	0.285420	0.246148	0.063895	0.000	At ⁽⁶⁾

(1)T: tiempo (horas); (2) E. Std: Error estándar; (3) DL₅₀: Dosis Letal Media; (4) RT: Rango de Toxicidad. Se emplea la clasificación de rangos de toxicidad para la determinación de DL₅₀ propuesta por ICCB (1985): Vnt: virtualmente no tóxico (> 100 µg p.a./abeja); Lt: levemente tóxico (10 – 100 µg p.a./abeja);(5) Mt: moderadamente tóxico (1 – 10 µg p.a./abeja); (6) At: altamente tóxico (< 1 µg p.a./abeja); (7) TL: Tiametoxán+Lambdacialotrina; (8): Imilacropid+Bifendrin+Lambdacialotrina

(1) T: time (hours); (2) E. Std: Standard error; (3) LD50: Medium Lethal Dose; (4) RT: Toxicity Range. The classification of toxicity ranges is used for the determination of LD50 proposed by ICCB (1985): Vnt: virtually non-toxic (> 100 µg p.a./bee); Lt: slightly toxic (10 - 100 µg p.a. / bee); (5) Mt: moderately toxic (1 - 10 µg p.a./bee); (6) At: highly toxic (<1 µg p.a./bee); (7) TL: Thiamethoxan + Lambdacialothrin; (8): Imilacropid + Bifendrin + Lambdacialothrin

Tabla 5. Dosis letal media (DL₅₀) para abeja adulta del herbicida 2,4 d y dimetoato como control tóxico (PROBIT)
Table 5. Median lethal dose (LD₅₀) for adult bee of the herbicide 2.4 d and dimethoate as toxic control (PROBIT)

Toxicidad oral aguda de abeja adulta (µg p.a / abeja)							
Tratamiento	T ⁽¹⁾	Intercepción	E.Std. ⁽²⁾	Pendiente	E. Std. ⁽²⁾	DL ₅₀ ⁽³⁾	RT ⁽⁴⁾
2,4 D	24	4.770406	0.485969	0.268999	0.134862	7.137	Mt ⁽⁵⁾
2,4 D	48	5.304877	0.370662	0.203134	0.098926	0.032	At ⁽⁶⁾
2,4 D	72	5.874637	0.360446	0.202265	0.094809	0.000	At ⁽⁶⁾
Di	24	5.689643	0.169626	1.307698	0.205887	0,297	At ⁽⁶⁾
Di	48	5.822637	0.178741	1.244334	0.206760	0,218	At ⁽⁶⁾
Di	72	6.578213	0.226975	1.871003	0.265491	0,143	At ⁽⁶⁾

(1)T: tiempo (horas); (2) E. Std: Error estándar; (3) DL50: Dosis Letal Media; (4) RT: Rango de Toxicidad. Se emplea la clasificación de rangos de toxicidad para la determinación de DL50 propuesta por ICCB (1985): Vnt: virtualmente no tóxico (> 100 µg p.a./abeja); Lt: levemente tóxico (10 – 100 µg p.a./abeja); (5) Mt: moderadamente tóxico (1 – 10 µg p.a./abeja); (6) At: altamente tóxico (< 1 µg p.a./abeja); (7) 2,4 D; (8) Di: dimetoato.

(1) T: time (hours); (2) E. Std: Standard error; (3) LD50: Medium Lethal Dose; (4) RT: Toxicity Range. The classification of toxicity ranges is used for the determination of LD50 proposed by ICCB (1985): Vnt: virtually non-toxic (> 100 µg p.a./bee); Lt: slightly toxic (10 - 100 µg p.a. / bee); (5) Mt: moderately toxic (1 - 10 µg p.a./bee); (6) At: highly toxic (<1 µg p.a./bee); (7) 2,4 D; (8) Di: dimethoate.

Tabla 6. Concentración efectiva media (CE₅₀) de toxicidad de los insecticidas Tiametoxán + Lambdacialotrina e Imildacloprid + Bifendrín + Lambdacialotrina en abeja adulta

Table 6. Mean effective concentration (CE₅₀) of toxicity of the insecticides Thiamethoxan + Lambdacialothrin and Imildacloprid + Bifendrine + Lambdacialothrin in adult bees

Toxicidad oral aguda de abeja adulta (µg p.a / abeja)								
Tratamiento	(1) T	(2) Bottom	(3) Top	(4) Spam	(5) LogDL ₅₀	(6) DL ₅₀ µg/L	(6) DL ₅₀ µg p.a./abeja	(7) RT
TL ⁽⁸⁾	24	0,2199	0,5516	0,3317	3,165	23,69	4,7 x 10 ⁻⁴	At ⁽¹⁰⁾
TL ⁽⁸⁾	48	0,3599	0,623	0,263	2,633	14,34	2,8 x 10 ⁻⁴	At ⁽¹⁰⁾
TL ⁽⁸⁾	72	0,5399	0,8253	0,2853	2,878	17,78	3,5 x 10 ⁻⁴	At ⁽¹⁰⁾
IBL ⁽⁹⁾	24	0,2397	0,646	0,4064	2,785	16,2	3,2 x 10 ⁻⁴	At ⁽¹⁰⁾
IBL ⁽⁹⁾	48	0,4122	0,7003	0,2881	2,146	8,55	1,7 x 10 ⁻⁴	At ⁽¹⁰⁾
IBL ⁽⁹⁾	72	0,7126	0,8529	0,1403	0,7687	2,16	4,3 x 10 ⁻⁵	At ⁽¹⁰⁾

(1)T: Tiempo (horas); (2) Bottom (punto mínimo); (3) Top: (punto máximo); (4) Spam: (error estándar); (5) LogDL₅₀: (transformación logarítmica); (6) DL₅₀: (Dosis letal media); (7) RT: (Rangos de toxicidad);(8) TL: Tiametoxan+Lambdacialotrina; (9) IBL: Imilacloprid+Bifendría+Lambdacialotrina; (9) At: (Altamente tóxico)

(1) T: Time (hours); (2) Bottom (minimum point); (3) Top: (maximum point); (4) Spam: (standard error); (5) LogDL50: (logarithmic transformation); (6) DL50: (mean lethal dose); (7) RT: (toxicity ranges proposed by IBCC); (8) TL: Thiametoxan+Lambdacialotrine; (9) IBL: Imilacropid+Bifendrin+Lambdacialothrin; (10) AT: (highly toxic).

Tabla 7. Concentración efectiva media (CE₅₀) de toxicidad del herbicida 2,4 D en abeja adulta

Table 7. Mean effective concentration (EC₅₀) of toxicity of herbicide 2,4 D in adult bees

Toxicidad oral aguda de abeja adulta (µg p.a / abeja)								
Tratamiento	T ⁽¹⁾	Bottom ⁽²⁾	Top ⁽³⁾	Spam ⁽⁴⁾	LogDL ₅₀ ⁽⁵⁾	DL ₅₀ ⁽⁶⁾ µg/l	DL ₅₀ ⁽⁷⁾ µg p.a./abeja	RT ⁽⁸⁾
2,4 D	24	0,207	0,14	-0,06695	1,92	6,82	1,3 x 10 ⁻⁴	Mt ⁽⁹⁾
2,4 D	48							
2,4 D	72	0,5681	0,6326	0,0646	1,612	5,01	1 x 10 ⁻⁴	At ⁽¹⁰⁾

⁽¹⁾ T: Tiempo (horas); ⁽²⁾ Bottom (punto mínimo); ⁽³⁾ Top: (punto máximo); ⁽⁴⁾ LogDL50: (transformación logarítmica); ⁽⁵⁾ DL50: (dosis letal media); ⁽⁶⁾ Spam: (error estándar); ⁽⁷⁾ RT: (rangos de toxicidad propuestos por IBCC); ⁽⁸⁾ Mt: (moderadamente tóxico); ⁽⁹⁾ AT: (altamente tóxicos).

T: Time (hours); ⁽²⁾ Bottom (minimum point); ⁽³⁾ Top: (maximum point); ⁽⁴⁾ LogEC50: (logarithmic transformation); ⁽⁵⁾ EC50: (mean lethal dose); ⁽⁶⁾ Spam: (standard error); ⁽⁷⁾ RT: (toxicity ranges proposed by IBCC); ⁽⁸⁾ Mt: (moderately toxic); ⁽⁹⁾ AT: (highly toxic)

FIGURAS

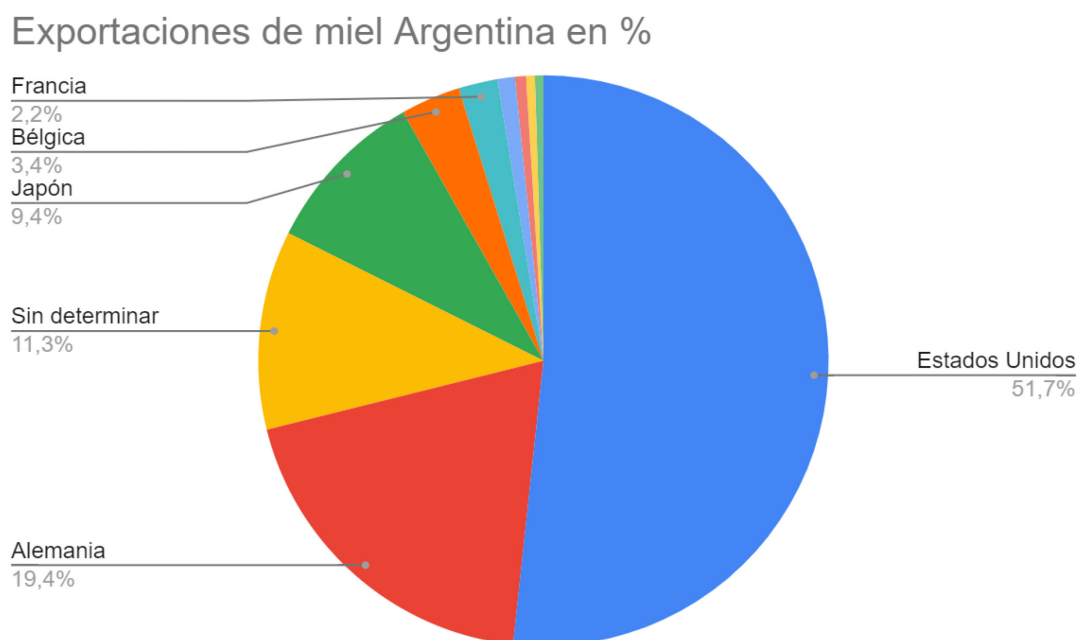


Figura 1. Principales destinos de exportación de las mieles argentinas. Los volúmenes de miel se expresan en toneladas. Creación propia con datos del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca 2020.

Figure 1. Main export destinations of Argentine honeys. The volumes of honey are expressed in tons. Own creation with the Ministry of Agriculture, Livestock and Fisheries 2020.

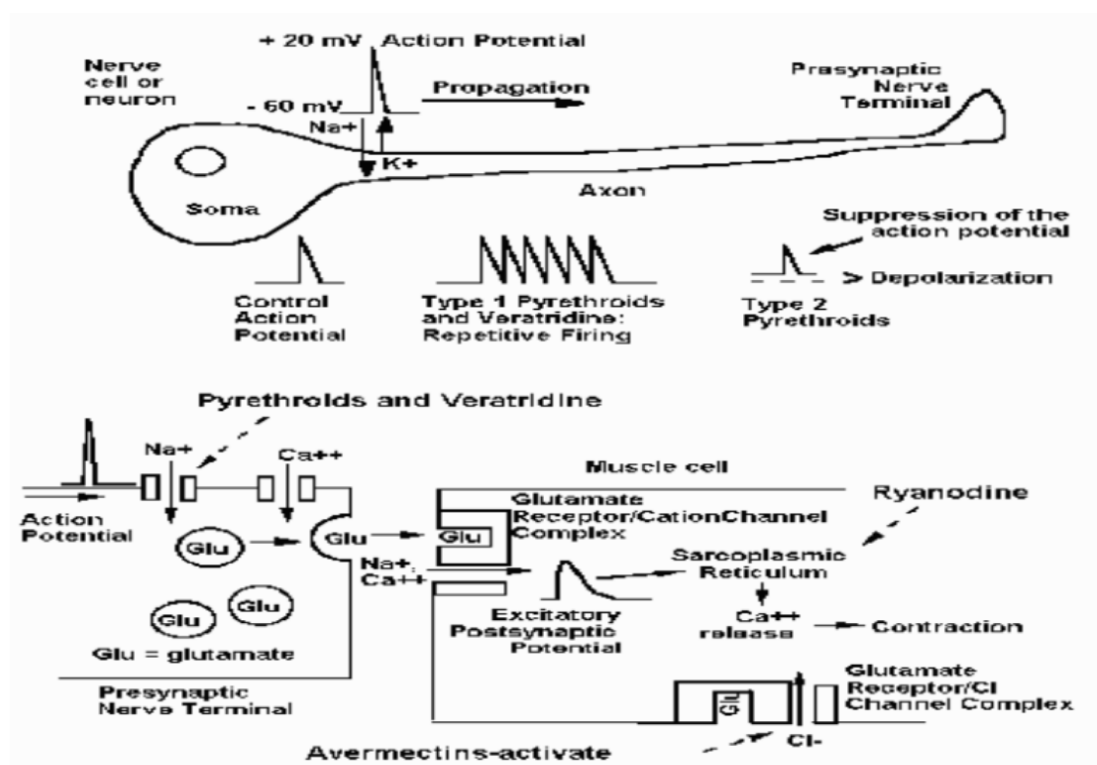


Figura 2. Mecanismo de acción de piretroides

Figure 2. Mechanism of action of pyrethroids

En la parte superior se observa una neurona con su axón y los flujos de K^+ y Na^+ donde intervienen estos insecticidas. Más abajo se ve la representación gráfica de los picos producidos por estas descargas eléctricas. Obsérvese que los del tipo 1 generan picos múltiples mientras que los del tipo 2 no. En la parte inferior se observa la sinapsis neuronal, se destaca como importante al neurotransmisor glutamato cuya producción es consecuencia de los flujos de Na^+ incrementando su concentración en la terminal nerviosa generando un potencial excitatorio que actúa en los músculos produciendo liberación de Ca^{2+} , esto genera una contracción muscular y posterior ataxia, síntoma típico de estos insecticidas

In the upper part, a neuron with its axon and the K^+ and Na^+ fluxes where these insecticides intervene is observed. Below is a graphic representation of the peaks produced by these electrical discharges. Note that type 1s generate multiple peaks while type 2 do not. In the lower part the neuronal synapse is observed, the glutamate neurotransmitter whose production is a consequence of the fluxes of Na^+ is highlighted as important, increasing its concentration in the nerve terminal generating

an excitatory potential that acts in the muscles producing Ca^{2+} release, this generates a muscle contraction and subsequent ataxia, a typical symptom of these insecticides

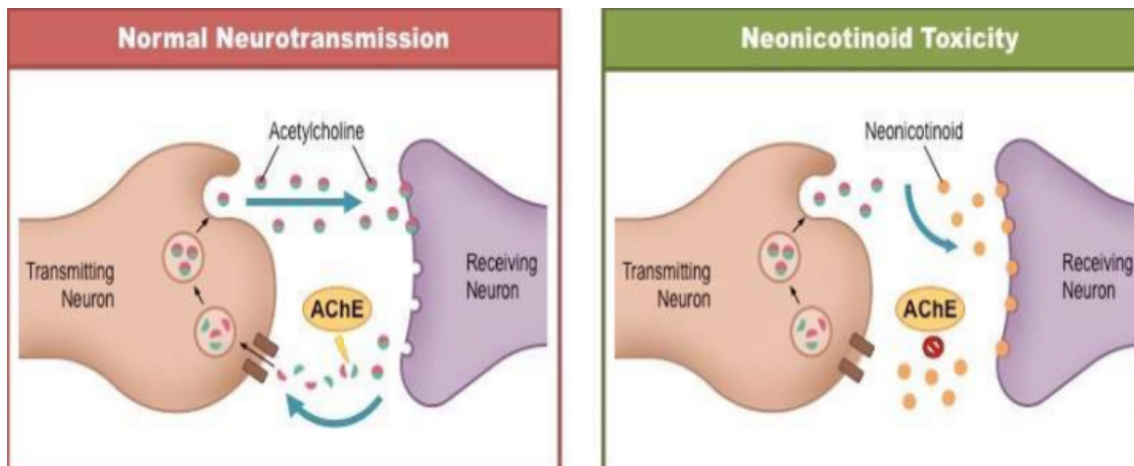


Figura 3 mecanismo de acción de los neonicotinoides

Figure 3 Mechanism of action of neonicotinoids

Se observa en la figura 3 la sinapsis de una neurona de manera esquemática y muy simplificada. Lo que se intenta mostrar en el cuadro izquierdo es el correcto funcionamiento, es decir, cuando no hay presencia de neonicotinoides. Mientras que, en el cuadro derecho, podemos observar como la presencia de este insecticida bloquea de manera irreversible a los receptores postsinápticos nicotínicos de acetilcolinesterasa provocando la liberación de acetilcolina que no puede ser degradado por la enzima ya que se encuentra bloqueada. Esto causa una sobreestimulación síntoma típico de los neonicotinoides.

Figure 3 shows the synapse of a neuron in a very simplified and schematic way. What is tried to show in the left box is the correct operation, that is, when there is no presence of neonicotinoids. While, in the right frame, we can see how the presence of this insecticide irreversibly blocks the postsynaptic nicotinic acetyl choline esterase receptors, causing the release of acetylcholine that cannot be degraded by the enzyme since it is blocked. This causes an overstimulating symptom typical of neonicotinoids.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Figura 4. Fórmula para el cálculo de las diluciones.

Figure 4. Formula for calculating dilutions.

V1: volumen inicial; C1: concentración inicial; V2: volumen final; C2: concentración final.

V1: initial volume; C1: initial concentration; V2: final volume; C2: final concentration.

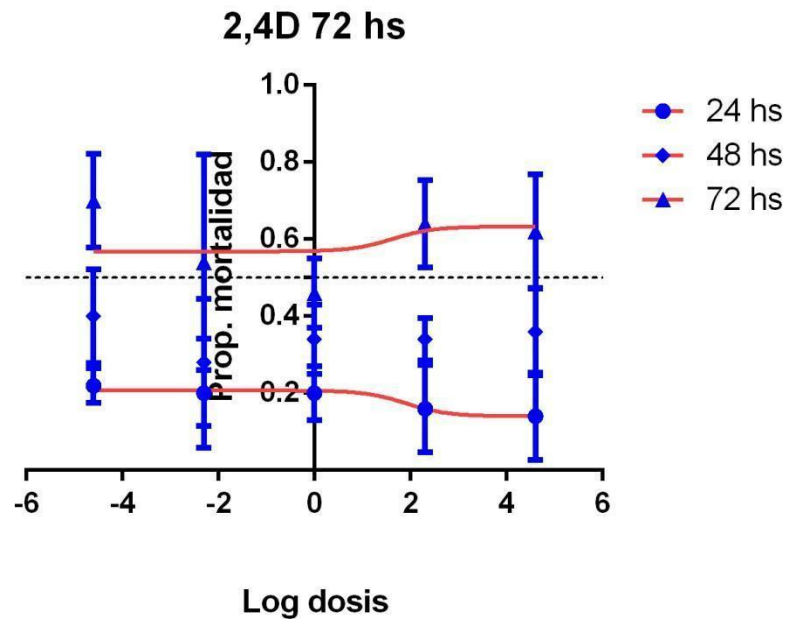


Figura 5. Dosis letal Media (DL_{50}) de exposición de toxicidad en abeja adulta con el herbicida 2,4 D a 24, 48 y 72 h (PRISMA; modelo de 3 parámetros).

Figure 5. Mean Effective Concentration (DL_{50}) of toxicity exposure in adult bees with the herbicide 2.4 D at 24, 48 and 72 h (PRISMA; 3-parameter model).

Ajuste de las curvas de dosis/mortalidad para los 3 tiempos evaluados con 2,4 D. Los altos valores de mortalidad para las dosis bajas, casi equivalentes a los de las dosis altas perjudican el ajuste del modelo. Solo a 72hs se observaron valores de mortalidad superiores al 50% aunque con el mismo comportamiento entre dosis bajas y altas.

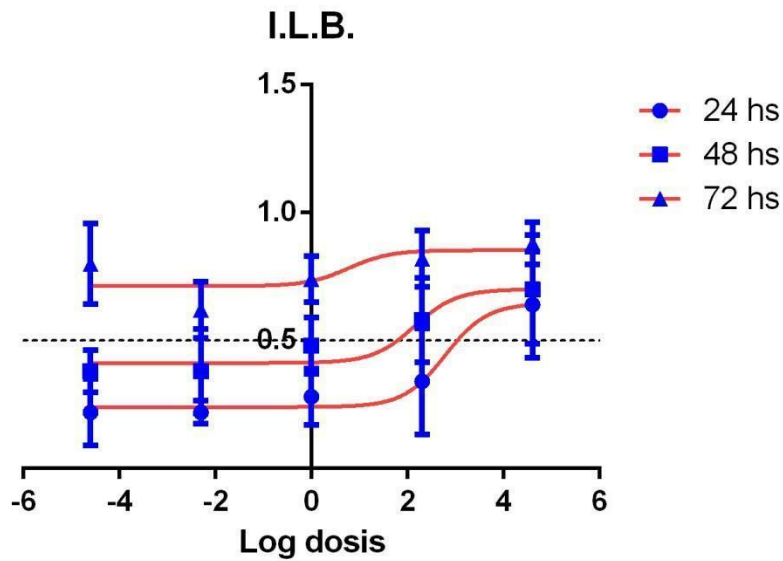


Figura 6. Dosis letal Media (DL_{50}) de exposición de toxicidad en abeja adulta con el insecticida Imidacloprid, Bifendrin y Lambda-cyhalothrin a las 24, 48 y 72 h (PRISMA; modelo de 3 parámetros).

Figure 6. Mean Effective Concentration (DL_{50}) of toxicity exposure in adult bees with the insecticide Imidacloprid, Bifendrin and Lambda-cyhalothrin at 24, 48 and 72 h (PRISMA; 3 parameter model).

Ajuste de las curvas de dosis/mortalidad para los 3 tiempos evaluados con Imidacloprid, Bifendrin y Lambda-cyhalothrin. En todos los tiempos evaluados se llegó a ajustar modelos y estimar la DL_{50} . Se observa que para 72hs. todas las dosis presentan valores de mortalidad por encima de 50% perjudicando el ajuste del modelo.

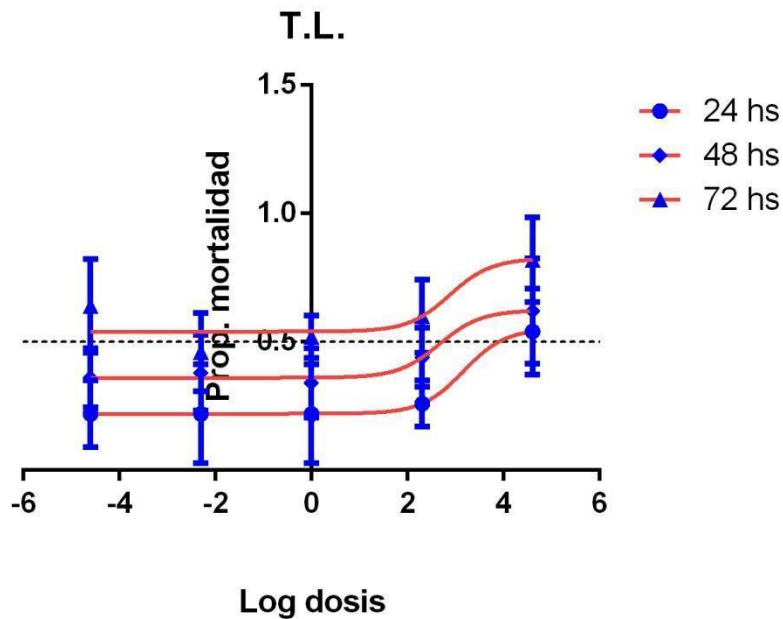


Figura 7. Dosis letal media (DL_{50}) de exposición de toxicidad en abeja adulta con el insecticida Tiametoxán y Lambdacialotrina a las 24, 48 y 72 h (PRISMA; modelo de 3 parámetros).

Figure 7. Mean Effective Concentration (DL_{50}) of toxicity exposure in adult bees with the insecticide Thiamethoxam and Lambdacialotrina at 24, 48 and 72 h (PRISMA; 3 parameter model)

Ajuste de las curvas de dosis/mortalidad para los 3 tiempos evaluados con Tiametoxán y Lambdacialotrina. En todos los tiempos evaluados se llegó a ajustar modelos y estimar la DL_{50} . Se observa que para 72hs. todas las dosis presentan valores de mortalidad casi por encima de 50% aunque con un comportamiento diferencial entre dosis bajas y altas lo cual no perjudicó el ajuste del modelo

FOTOS



Foto 1. Anestesiado con CO₂ de abejas obreras contenidas en bolsa de plástico con para introducirlas en los frascos de prueba "unidad experimental"

Photo 1. CO₂ anesthetized from contained worker bees in plastic bag with to put them in the jars test "experimental unit"



**Foto 2. Unidad experimental con material vivo y alimentador
constituido por un tubo de microcentrífuga (Izquierda: "unidad experimental
" con 10 abejas adultas; recha: tubo alimentador y las perforaciones para
garantizar el intercambio gaseoso).**

**Photo 2. Experimental unit with live material and feeder made up of
a microcentrifuge tube (Left: "experimental unit" with 10 adult bees. Right: feeder
tube and perforations to ensure gas Exchange)**

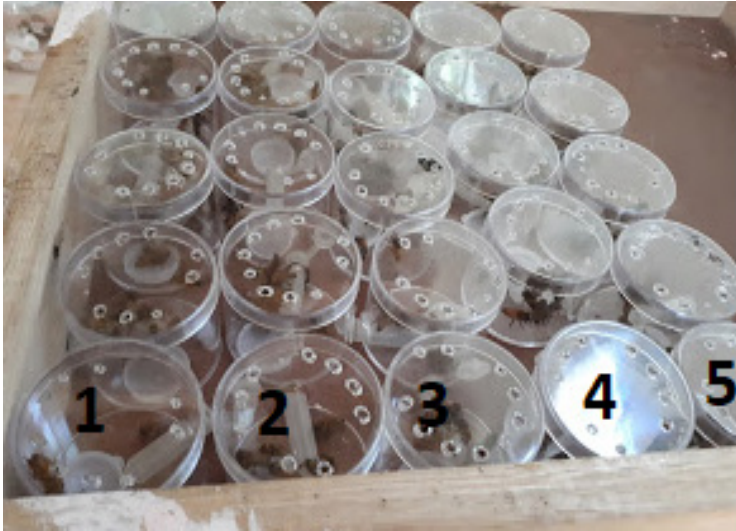


Foto 3. Bloque experimental constituido por 5 tratamientos, 5 concentraciones por tratamiento y 5 repeticiones por concentración

Photo 3. Experimental block consisting of 5 treatments, 5 concentrations by treatment and 5 repetitions by concentration