

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA PROTECCIÓN COGNITIVA DE LOS POLINIZADORES CONTRA LOS PLAGUICIDAS

REFERENCIA A UNA SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud invoca el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/896.944, presentada el 6 de septiembre de 2015, que se incorpora específicamente y por completo en la presente a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona en general con insectos polinizadores (por ejemplo, abejas melíferas), y más particularmente con composiciones y métodos para proteger de manera profiláctica a los insectos polinizadores contra los efectos negativos de los plaguicidas neurotóxicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los insectos polinizan más de un 70% de los cultivos alimentarios, y se estima que contribuyen con alrededor de 215 mil millones de dólares en la economía global cada año. Además de su aporte en el rendimiento de los cultivos, los insectos polinizadores también pueden mejorar la calidad de las cosechas. La polinización por insectos también provee servicios al ecosistema que respaldan la biodiversidad. Debido a su clara importancia para la seguridad de los alimentos, la economía global y la estabilidad del ecosistema, existe una preocupación en todo el mundo por la disminución de los insectos polinizadores, que incluyen abejas salvajes y criadas.

Los riesgos conocidos para los insectos polinizadores incluyen parásitos, enfermedades, pérdida del hábitat, una nutrición pobre y exposición a plaguicidas. La exposición a plaguicidas es el principal contribuyente en la declinación actual de las poblaciones de insectos polinizadores, que proveen servicios de polinización esenciales para la producción de alimentos. Durante las pasadas décadas, ha habido un aumento rápido en el uso de plaguicidas dirigidos al sistema nervioso de los insectos (neuroplaguicidas) y constituyen el medio principal para controlar los insectos plaga de cultivos, ganado, mascotas y personas. Aunque los neuroplaguicidas, tales como neonicotinoides, se pueden usar como insecticidas sistémicos con una selectividad mejorada por insectos con relación a los vertebrados, los polinizadores que no son la

diana pueden ser afectados adversamente mediante el contacto directo o por consumo de néctar y polen contaminados.

Los neonicotinoides están dirigidos a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Matsuda K., y col., *Mol. Pharmacol.*, 76(1): 1-10. 2009) presentes ampliamente en el sistema nervioso central (SNC) de los insectos (Dupuis J., y col., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 36(6): 1553-64, 2012). Dentro del SNC, los cuerpos pedunculados (MB) (áreas involucradas en el aprendizaje, la memoria, la navegación, el sueño y la marcha) son ricos en nAChR (Revisado en Schuermann FW., *Arthropod Struct. Dev.*, (5): 399-421 2016), y por ello son diana de los neonicotinoides. Es un hecho ampliamente aceptado que hay niveles muy bajos en el néctar (1,9 ppb) y el polen (6,1 ppb) (Moffat C., y col., *FASEB J.*, 29(5): 2112-9. 2015). En tanto una toxicidad completa conduce a la muerte, las dosis subletales deterioran profundamente la conducta. Los efectos subletales constituyen la preocupación principal dado que los visitantes distintos de la diana, tales como los polinizadores, están expuestos a cantidades bajas de neonicotinoides en néctar, polen y la deriva de polvillo, que son suficientes para afectar su fisiología y conducta.

De hecho, la evidencia indica que los niveles subletales de neonicotinoides pueden causar déficits en la función cerebral, el aprendizaje olfatorio, la navegación y el desarrollo de las colonias (Moffat C., y col., *FASEB J.*, 2015), por lo cual su uso está involucrado en la disminución de las abejas. Por ejemplo, la exposición a imidacloprid, un neonicotinoide de primera generación usado en todo el mundo, perjudica el aprendizaje y la memoria (Decourtye A., y col., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57(3): 410-9. 2004; Williamson SM., y col., *Invert. Neurosci.*, 13(1): 63-70. 2013), la actividad motora (Lambin M., y col., *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 48(3): 129-34. 2001; Williamson SM., y col., *Ecotoxicology*, 23(8): 1409-18. 2014), la sensibilidad a la sacarosa (Aliouane Y., y col., *Environ. Toxicol. Chem.*, 28(1): 113-22. 2009) y la habilidad de navegación (Fischer J., y col., *PloS One*, 9(3): e91364, 2014). Estos deterioros cognitivos pueden derivar de la degeneración estructural de los denominados microglomérulos (Peng YC & Yang EC, *Sci. Rep.*, 6: 19298. 2016) probablemente debido a un aumento del estrés oxidativo (Malev y col., *Pesticide biochemistry and*

physiology, 104(3): 178-186. 2012).

Después de conocerse la evidencia de estos efectos negativos, algunos neonicotinoides fueron prohibidos en Europa (Butler D., *Nature*, 555(7695): 150-151. 2018). No obstante, los neonicotinoides cumplen una función importante en el control de plagas y se han manifestado preocupaciones contra una prohibición generalizada del mercado dado que los agricultores podrían volver a utilizar los antiguos plaguicidas, que eran aún más tóxicos para las abejas. También se han planteado preocupaciones que con motivo de estas prohibiciones pueda haber un desarrollo de resistencia de las plagas que son tratadas con dichos otros plaguicidas, tales como piretroides. Por consiguiente, los responsables de las políticas a seguir deben encontrar la manera de lograr un fino equilibrio para la seguridad de los alimentos entre la perspectiva de una desaparición de los polinizadores y los brotes de plagas.

Por lo tanto, persiste la necesidad de composiciones y métodos para evitar el impacto negativo de los plaguicidas sobre los insectos polinizadores y al mismo tiempo para controlar las plagas.

Por ello, un objeto de la invención comprende proveer composiciones y métodos para proteger a los insectos polinizadores contra los plaguicidas.

Otro objeto de la invención comprende proveer composiciones y métodos para mejorar la función cognitiva de los insectos polinizadores.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Se divulgan composiciones y métodos para proteger a los insectos polinizadores contra los efectos neurocognitivos perjudiciales de los plaguicidas. En la presente se proveen composiciones adecuadas para su administración o ingesta por un insecto polinizador que incluyen uno o más compuestos fenólicos en una cantidad eficaz para ofrecer protección contra el deterioro de una función cognitiva del insecto polinizador. Las composiciones también pueden contener una fuente de carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, agua o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de dichas fuentes incluyen néctar natural o artificial, miel, azúcar, jarabe de azúcar, polen o sustituto de polen, harina de soja, fécula de soja, gluten (por ejemplo, soja o maíz), leche descremada, levadura, podas, aceite y combinaciones de los mismos. En algunas

formas de realización, las fuentes pueden ser o pueden derivar de alimentos para abejas disponibles comercialmente, tales como AP23[®], BEE-PRO[®], FEEDBEE, MEGABEE y ULTRA BEE.

En formas de realización preferidas, dichos uno o más compuestos fenólicos comprende flavonoides, por ejemplo, flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, flavanoles (catequinas), chalconas o neoflavonoides. Los flavonoles preferidos incluyen quercetina, rutina, miricetina, kaempferol, fisetina, morina, isorhamnetina y derivados o variantes de los mismos.

En algunas formas de realización, dichos uno o más compuestos fenólicos comprenden isoquercetina, rutina, quercetina, quercitrina, hiperósido, quercimeritrina, baimaside, querciturona, 3-O-metilquercetina, quercetina 3-sambubiósido, miquelianina, espiraeósido, isorhamnetina, quercetina 3'-O-sulfato, quercetina 7-O-glucósido, quercetina 3-O-rhamnosida, quercetina 3,4'-diglucósido, quercetina 3-soforotriósido o una combinación de los mismos.

Las composiciones divulgadas se pueden usar como un alimento, un aditivo o suplemento alimenticio o un nutraceutico. En algunas formas de realización, los insectos polinizadores a quienes se les proveen las composiciones incluyen, pero en un sentido no taxativo, mariposas, polillas, moscas, escarabajos, avispas y abejas (por ejemplo, abejas mieleras, abejorros, abejas carpinteras, abejas cortadoras de hojas, abejas de arándano, abejas calabaza, abejas albañil, abejas de las orquídeas, abejas sin aguijón y abejas sudorosas). En las formas de realización preferidas, los insectos polinizadores a los cuales se administran las composiciones incluyen o consisten en abejas, en particular abejas mieleras y/o abejorros. Las composiciones se pueden administrar o proveer al insecto polinizador con la ingesta.

Las composiciones divulgadas se pueden usar para ofrecer protección contra el deterioro de varias funciones cognitivas, incluyendo pero en un sentido no taxativo, aquellas involucradas en el procesamiento de la información tales como aprendizaje, memoria, navegación, actividad motora, sensibilidad a la sacarosa y combinaciones de los mismos. La cantidad de la composición administrada puede ser eficaz para prevenir o reducir la pérdida o reducción de la memoria, el aprendizaje, las habilidades de

navegación, la actividad motora o combinaciones de los mismos en el insecto polinizador, por ejemplo, tras la exposición a un plaguicida. La cantidad de la composición administrada puede ser eficaz para prevenir o reducir la pérdida o reducción de la memoria, el aprendizaje, las habilidades de navegación, la actividad motora o combinaciones de los mismos en el insecto polinizador en comparación con un insecto polinizador a quien no se le había administrado la composición. La cantidad de la composición administrada puede ser eficaz para prevenir o reducir una disfunción mitocondrial, apoptosis y/o estrés oxidativo en el cerebro, por ejemplo en los cuerpos pedunculados y los lóbulos antenales.

El deterioro de la función cognitiva puede ser inducida por la exposición a un plaguicida. Preferiblemente, el plaguicida se encuentra a una dosis subletal (por ejemplo, una dosis de campo). El plaguicida puede ser neurotóxico. Por ejemplo, el plaguicida puede afectar adversamente la neurotransmisión colinérgica, GABAérgica o glutamatérgica, áreas del cerebro tal como los cuerpos pedunculados, o a niveles menores tal como la función mitocondrial; aumento de la apoptosis; aumento del estrés oxidativo; o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el plaguicida busca como diana (por ejemplo, es un agonista, un agonista parcial, un antagonista o un inhibidor) el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), receptores GABAérgicos, receptores glutamatérgicos o canales de sodio regulados por voltaje (Na^+_v). Los ejemplos de plaguicidas incluyen neonicotinoides (por ejemplo imidacloprid, tiacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, nitenpiram, dinotefuran y nitiazina), fipronilo, derivados de sulfoximinas (por ejemplo sulfoxaflor), piretroides (por ejemplo, deltametrina) y glifosato. En algunas formas de realización, el plaguicida puede ser un carbamato o un organofosfato. En formas de realización preferidas, los polinizadores están expuestos al plaguicida de manera directa (por ejemplo, rociado) o indirecta (por ejemplo, en el néctar o polen después de una exposición a la deriva) después de la administración de uno o más compuestos o una composición de fenólicos.

Las composiciones divulgadas, que incluyen las mencionadas precedentemente y las que se describen con más detalle más adelante, se pueden emplear en varios métodos de uso. Por ejemplo, se proveen métodos de protección de la función cognitiva de un

insecto polinizador mediante la administración de un compuesto fenólico, o una composición que incluye un compuesto fenólico, a un insecto polinizador que lo necesita. Se proveen métodos de protección de las habilidades de aprendizaje y/o memoria de un insecto polinizador mediante la administración de un compuesto fenólico, o de una composición que incluye un compuesto fenólico, al insecto polinizador. Se divulgan métodos para prevenir o reducir el deterioro de la función cognitiva en un insecto polinizador mediante la administración al insecto de un compuesto fenólico, o de una composición que incluyen un compuesto fenólico.

También se divulgan métodos de control de insectos plaga. Los métodos comprenden tratar un área ocupada por los insectos plaga y los insectos polinizadores con un plaguicida, y administrar al insecto polinizador una composición que incluye una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva y/o para aumentar una función cognitiva en el insecto polinizador. El área puede ser tratada con el plaguicida antes de administrar la composición a los insectos polinizadores. Como alternativa, el área puede ser tratada con el plaguicida después de administrar la composición a los insectos polinizadores. En algunas formas de realización, el área es tratada con el plaguicida mediante una aplicación foliar, inyección en el suelo, inyección en árboles, aplicación terrestre como una formulación granulada o líquida, o como un tratamiento de semillas recubiertas con plaguicida. Preferiblemente, el área se trata con una cantidad eficaz del plaguicida para reducir la cantidad de insectos plaga en el área. El plaguicida puede ser letal para los insectos plaga y/o en una cantidad que es subletal para los insectos polinizadores en el área o cerca del área de administración (por ejemplo, dentro de un área afectada por la deriva de polvillo del plaguicida). Los ejemplos de insectos plaga que pueden ser diana incluyen, pero en un sentido no taxativo, uno o más entre áfidos, trips, moscas blancas, ácaros, saltadores de las hojas, gusanos de la harina, chinches espumosas, pulgas, termitas, cochinillas (por ejemplo, cochinillas armadas, cochinillas blandas) y escarabajos.

Otras ventajas adicionales del método y las composiciones divulgadas se describirán en parte en la siguiente descripción, y en parte se comprenderán a partir de

la descripción, o se pueden comprender a partir de la práctica del método y las composiciones divulgadas. Las ventajas del método y de las composiciones divulgadas se comprenderán y adquirirán por medio de los elementos y las combinaciones señaladas particularmente en las reivindicaciones adjuntas. Se debe tener en cuenta que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada solamente se ofrecen a modo de ejemplo y a efectos de una mayor explicación y no restringen la invención reivindicada.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

En las Figuras 1A-1C se muestra la evaluación del aprendizaje y la memoria en la abeja mielera africanizada. La Figura 1A es un gráfico de barras que muestra una medición del aprendizaje (puntaje 0-7); la Figura 1B es un gráfico de barras que muestra una medición de la memoria (puntaje 0-100); y la Figura 1C es un gráfico de barras que muestra una medición de la latencia de respuesta en abejas mieleras alimentadas con agua azucarada, quercetina, rutina, imidacloprid, rutina e imidacloprid, o quercetina e imidacloprid (véase el Ejemplo 1).

Las Figuras 2A-2B son gráficos de barras que muestran una medición del aprendizaje (puntaje 0-10) (Figura 2A) y de la memoria (puntaje 0-100) (Figura 2B) en abejorros alimentados con agua azucarada, rutina, imidacloprid, o rutina e imidacloprid (véase el Ejemplo 2). La Figura 2C es un gráfico lineal que muestra el % de respuesta de extensión de la probóscide (PER) durante la adquisición para abejorros alimentados con agua azucarada, rutina, imidacloprid, o rutina e imidacloprid. La Figura 2D es un gráfico de barras que muestra el log de latencia para abejorros alimentados con agua azucarada, rutina, imidacloprid, o rutina e imidacloprid (véase el Ejemplo 2).

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra el % de moscas por encima del umbral de actividad motora para Control, Imid, 0,1 µl de Rut, 0,1 µl de Rut + Imid, 1 µl de Rut, 1 µl de Rut + Imid, 10 µl de Rut, 10 µl de Rut + Imid (véase el Ejemplo 3).

Las Figuras 4A-4B son gráficos de barras que muestran la evaluación del aprendizaje (Figura 4A) y de la memoria (Figura 4B) en abejorros alimentados *ad libitum* con rutina o agua con sacarosa y a los que luego se les administró imidacloprid o fipronilo (véase el Ejemplo 4). Los números en cada barra indican el tamaño de la

muestra por tratamiento para el aprendizaje y la memoria.

La Figura 5A es un gráfico de barras que muestra el puntaje PER total como una medida de la capacidad de respuesta a agua con sacarosa durante la evaluación del efecto protector de dos flavonoides contra el deterioro producido por un piretroide. Las Figuras 5B-5E son gráficos lineales que muestran el % de respuesta a diferentes concentraciones de agua con sacarosa en todos los tratamientos y los tiempos (véase el Ejemplo 5).

Las Figuras 6A-6B son gráficos de barras que muestran la evaluación del aprendizaje (Figura 6A) y la memoria (Figura 6B) en abejas mieleras por el efecto protector de flavonoides y un ácido fenólico contra el deterioro provocado por fipronilo. Se indican las diferencias significativas con relación a abejas Control (véase el Ejemplo 6).

Las Figuras 7A-7B son gráficos de barras que muestran la evaluación del aprendizaje (Figura 7A) y de la memoria (Figura 7B) en abejorros por el efecto protector de la autoadministración (las abejas bebieron de un bebedero) de un flavonoide contra el deterioro provocado por la administración crónica de fipronilo. Los números en cada barra indican el tamaño de la muestra por tratamiento para el aprendizaje y la memoria (véase el Ejemplo 7).

Las Figuras 8A-8D son curvas que muestran la distribución de los estados conformacionales de nAChR cuando se acopla con imidacloprid, acetilcolina, quercetina, rutina y 4'-fenilflavona.

La Figura 9 es un gráfico lineal que muestra el radio del poro del nAChR. Los puntos marcan la posición de la aparición más frecuente de un estado conformacional del canal cuando se acopla a cada ligando, imidacloprid (IMI), acetilcolina (ACh), quercetina (Quer), rutina (Rut) y 4'-fenilflavona (4-fenilo).

La Figura 10 es un modelo que compara el nAChR reconstruido de *A. mellifera* en estado cerrado y abierto. En la parte inferior izquierda se muestra el dominio intracelular de la proteína.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

Tal como se usa en la presente, el término “abeja” se refiere a miembros de la Familia Apidae, Orden Hymenoptera. Una “abeja mielera” se refiere a miembros del género *Apis*. Por ejemplo, la abeja mielera domesticada es *Apis mellifera*. Un “abejorro” (también denominado en la presente y en otra parte en la presente “abejorro” [*por su diferencia de escritura en inglés*]) se refiere al género ‘*Bombus*’. Por ejemplo, las especies domesticadas de abejorros incluyen el abejorro común, *Bombus terrestris* y el abejorro *Bombus impatiens*.

Tal como se usa en la presente, el término “polinizador” se refiere a un animal que mueve el polen desde la antera masculina de una flor hasta el estigma femenino de una flor, lo cual ayuda en la fertilización de los óvulos de la flor por las gametas masculinas presentes en los granos de polen. Los “insectos polinizadores” son insectos cuyo comportamiento da como resultado la polinización de una de más especies de plantas. El término no abarca una edad o sexo particular.

Tal como se usa en la presente, los términos “plaga” e “insectos plaga” se refieren a un insecto o artrópodo que daña los productos agrícolas o reduce el rendimiento agrícola de los productos agrícolas que son de utilidad económica o que presentan una utilidad deseable para el consumo humano o de animales. Sin embargo, una “plaga” también se interpreta como cualquier artrópodo o insecto que es destructivo por provocar infestación y daños en los insectos polinizadores, colmenas de abejas, o por reducir las poblaciones de abejas mieleras, o por causar una reducción en la producción de miel.

Tal como se usa en la presente, el término “exposición”, cuando se usa en el contexto de un plaguicida, describe el estado de haber tomado contacto con el plaguicida. La exposición se puede lograr por medio de una variedad de mecanismos. Por ejemplo, un insecto polinizador puede quedar expuesto a un plaguicida por la ingesta de alimento o agua, el material de anidación (por ejemplo, resina, cera, etc.), contacto con la deriva del rociado y la deriva del polvillo generado por la aplicación del plaguicida, el contacto con plantas, suelo y agua contaminados, y por inhalación.

Tal como se usa en la presente, el término “subletal” describe la cantidad o concentración de plaguicida que no conduce a una mortalidad aguda. Los efectos

subletales sobre un insecto pueden involucrar modificaciones de la conducta y fisiología (por ejemplo, sistema inmunológico) del insecto (por ejemplo, una abeja mielera). No causan la muerte de manera directa del individuo o el colapso de una colonia pero se puede volver letal en el tiempo y/o puede volver más sensible a la colonia (por ejemplo, más propensa a enfermedades), lo cual puede contribuir en su colapso. Por ejemplo, un individuo con deterioro de la memoria, la orientación o fisiológico podría evitar su retorno a la colmena, y puede morir de hambre o frío. En el contexto de los neonicotinoides, una dosis subletal puede ser una dosis de campo, que es una cantidad o concentración del plaguicida al cual puede estar expuesto un insecto polinizador durante el forrajeo normal. En algunas formas de realización, una dosis de campo de imidacloprid es de aproximadamente 1 µg/l.

Tal como se usa en la presente, el término “función cognitiva”, cuando se usa en el contexto de un insecto polinizador, abarca la adquisición, almacenamiento, procesamiento, recuperación y uso de información, y por ende incluye la percepción, atención, memoria, aprendizaje, habilidades motoras y de navegación.

Tal como se usa en la presente, el término “deteriorar”, en el contexto de una función o parámetro biológico, significa debilitar, reducir o alterar de otra manera dicha función o parámetro.

Tal como se usa en la presente, una “disfunción mitocondrial” describe un estado en el cual cualquiera de los procesos o funciones mitocondriales típicos fueron eliminados, impedidos o reducidos. Por ejemplo, el término abarca un estado mitocondrial caracterizado por un transporte de electrones reducido, una producción reducida de ATP o un potencial de membranas mitocondriales alterado. El término puede hacer referencia a cualquier pérdida de función en la mitocondria. A nivel molecular, una reducción en la función mitocondrial típicamente tiene lugar como resultado de (1) una pérdida de mantenimiento del potencial de transmembrana eléctrico y químico de la membrana mitocondrial interna, (2) alteraciones en la función de la cadena de transporte de electrones o (3) una reducción en el transporte de metabolitos críticos hacia la mitocondria.

Tal como se usa en la presente, el término “neurotóxico” significa venenoso o

perjudicial de otra manera para el sistema nervioso y las funciones asociadas con el mismo, por ejemplo, un control neuromotor.

Tal como se usa en la presente, una “cantidad eficaz” significa que la cantidad de la composición usada es una cantidad/concentración suficiente como para afectar una respuesta pretendida. Por ejemplo, la cantidad de las composiciones neuroprotectoras divulgadas puede ser eficaz para aliviar uno o más síntomas o efectos de un plaguicida sobre un insecto polinizador. Los ejemplos no taxativos de síntomas o efectos de los plaguicidas incluyen reducción en el procesamiento de la información que incluye, por ejemplo, el aprendizaje, la memoria, el control motor, la toma de decisiones y/o la navegación. Dicha mejora solo requiere una reducción o alteración, no necesariamente una eliminación. La dosificación precisa varía de acuerdo con una variedad de factores tales como la especie, variables dependientes del sujeto (por ejemplo, el tamaño, la edad, la salud del sistema inmunológico, etc. del organismo), el plaguicida contra el cual se lo protege, así como la ruta de administración y la farmacocinética y farmacodinámica del agente administrado. Como alternativa, la cantidad de plaguicida puede ser eficaz para reducir la cantidad de insectos plaga en un área tratada. En algunos ejemplos, la cantidad de plaguicida es eficaz para matar (por ejemplo, es letal) a los insectos plaga.

Tal como se usa en la presente, el término “reducir” significa disminuir una actividad, función, respuesta, condición, enfermedad u otro parámetro biológico. Puede incluir, pero en un sentido no taxativo, la ablación completa de la actividad, función, respuesta, condición o enfermedad. También puede incluir, por ejemplo, por lo menos un 5% de disminución de la actividad, función, respuesta, condición o enfermedad u otro parámetro biológico en comparación con un nivel nativo o control (por ejemplo, antes o después de la administración de una composición divulgada o los niveles en un insecto polinizador a quien no se le administró una composición divulgada). Por consiguiente, la reducción puede ser un 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%, o cualquier valor de disminución intermedio, en comparación con los niveles nativos o control.

La indicación de los rangos de valores en la presente sirve meramente como un

método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique de otra manera en la presente, y cada valor separado se incorpora en la Descripción como si estuviera indicado individualmente en la presente.

El uso del término “aproximadamente” pretende describir valores ya sea por encima o por debajo del valor establecido en un rango de aproximadamente $\pm 10\%$; en otras formas de realización, los valores puede variar en un rango de valores ya sea por encima o por debajo del valor establecido en un rango de aproximadamente $\pm 5\%$; en otras formas de realización, los valores pueden variar en valores ya sea por encima o por debajo del valor establecido en un rango de aproximadamente $\pm 2\%$; en otras formas de realización, los valores pueden variar en un rango de valores ya sea por encima o por debajo del valor establecido en un rango de aproximadamente $\pm 1\%$. Los rangos precedentes se pretenden aclarar según contexto, y no implica ninguna limitación adicional.

Se divulgan materiales, composiciones y componentes que se pueden usar, se pueden usar junto con, se pueden usar en la preparación o que son productos del método y las composiciones. En la presente se divulgan estos y otros materiales, y se comprenderá que cuando se divulgan las combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales, si bien la referencia específica a cada una de varias combinaciones individuales y colectivas y la permutación de estos compuestos no se divulga explícitamente, cada uno está contemplado específicamente y se describe en la presente. Por ejemplo, si se divulga y describe un ligando y se describe una cantidad de modificaciones que se pueden efectuar a una cantidad de moléculas, inclusive el ligando, cada una y todas las combinaciones y permutaciones del ligando y las modificaciones posibles están contempladas específicamente a menos que específicamente se indique lo contrario. Por consiguiente, si se divulga una clase de moléculas A, B y C así como una clase de moléculas D, E y F y se divulga un ejemplo de una combinación de las moléculas A-D, entonces aún si cada una no está descrita de manera individual, cada una se contemplará de manera individual y colectiva. Por lo tanto, en este ejemplo, cada una de las combinaciones A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D,

C-E y C-F está contemplada de manera específica y se debe considerar divulgada a partir de la divulgación de A, B y C; D, E y F; y el ejemplo de combinación A-D. Asimismo, también se contempla y divulga de manera específica cualquier subconjunto o combinación de ellos. Así, por ejemplo, los subgrupos de A-E, B-F y C-E están contemplados específicamente y se deben considerar como divulgados a partir de la divulgación de A, B y C; D, E y F; y el ejemplo de combinación A-D. Además, cada uno de los materiales, composiciones, componentes, etc. contemplados y divulgados precedentemente también se puede incluir o excluir de manera específica e independiente de cualquier grupo, subgrupo, lista, conjunto, etc. de dichos materiales.

Estos conceptos se aplican a todos los aspectos de esta solicitud incluyendo, pero en un sentido no taxativo, pasos en los métodos de elaboración y uso de las composiciones divulgadas. Por consiguiente, si hubiera una variedad de pasos adicionales que se pueden llevar a cabo se comprenderá que cada uno de estos pasos adicionales se puede llevar a cabo con cualquier forma de realización específica o combinación de formas de realización de los métodos divulgados, y que cada una de dichas combinaciones está contemplada específicamente y se debe considerar como divulgada.

Todos los métodos que se describen en la presente se pueden realizar en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario o bien que el contexto lo contraindique claramente. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos o el lenguaje de los ejemplos (por ejemplo, “tal como”) que se provee en la presente, tiene simplemente la intención de ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique de otra manera. Ninguna expresión en la memoria descriptiva se debe interpretar como indicativo de que algún elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

II. Composiciones

En años recientes, ha aumentado la preocupación por los efectos subletales de los neuroplaguicidas sobre los insectos polinizadores y las consecuencias sobre la biodiversidad agrícola y la agricultura sustentable, y en última instancia, la seguridad de los alimentos. Por ejemplo, los neonicotinoides afectan a los sistemas neurales e

inmunológicos, lo cual conduce a un deterioro cognitivo y una mayor vulnerabilidad a los parásitos. Los procesos cognitivos afectados incluyen el aprendizaje (Stanley D. y col., *Sci Rep.*, 5: 16508. 2015), la memoria (Wright G. y col., *Sci Rep.*, 5: 15322, 2015) y la navegación (Fischer J. y col., *PloS One*, 9(3): e91364, 2014; Henry M. y col., *Science*, 336(6079): 348-50. 2012) presumiblemente debido a los efectos sobre áreas tales como los cuerpos pedunculados (Palmer MJ. y col., *Nat. Commun.*, 4: 1634. 2013), principales áreas de procesamiento de la información en el cerebro de insectos. Los cuerpos pedunculados son ricos en nAChR y su función y estructura se ven deterioradas por los neonicotinoides (Moffat C. y col., *Sci. Rep.*, 6: 24764, 2016; Buckingham SD. y col., *J. Exp. Biol.*, 200: 2685-2692, 1997).

Cuando se usaron por primera vez los neonicotinoides, los apicultores comenzaron a describir diferentes trastornos y signos que variaban en un rango de: las abejas no retornaban a la colmena, abejas desorientadas, abejas agrupándose en grupos pequeños sobre el suelo, conducta de forrajeo anormal, pérdidas masivas de abejas en primavera, pérdida de las reinas, mayor sensibilidad a enfermedades y desaparición de colonias (Van der Sluijs, JP. y col., *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 5(3-4), 293-305. 2013). Hasta ahora, la mayor parte de los esfuerzos se han centrado en exponer los efectos negativos de los neonicotinoides con el propósito de prohibir la utilización de dichos plaguicidas neonicotinoides y/o promover la transición a alternativas amigables para los polinizadores de los neonicotinoides.

Como alternativa, las composiciones y los métodos divulgados se pueden usar para minimizar el efecto perjudicial de los neonicotinoides y otros neuroplaguicidas sobre los insectos polinizadores, tales como abejas mieleras y abejorros. Se ha descubierto que es posible proteger profilácticamente a los insectos polinizadores contra los efectos subletales sobre el aprendizaje y la memoria del neonicotinoide ampliamente utilizado, imidacloprid. Los datos de los Ejemplos muestran, usando la abeja mielera africanizada *Apis mellifera* como modelo, que los flavonoides rutina y quercetina confieren una protección significativa para el aprendizaje, en tanto la rutina protegía los niveles de memoria. Se observó que, con relación al control, ambos flavonoides mejoran el aprendizaje pero no la memoria en tanto imidacloprid disminuye el

desempeño del aprendizaje y la memoria. Las abejas alimentadas con flavonoides, que subsiguientemente recibieron imidacloprid, mostraron un desempeño de aprendizaje significativamente mayor que las abejas que solo recibieron imidacloprid. De manera similar, como un segundo ejemplo, los abejorros *Bombus impatiens* alimentados profilácticamente con rutina estaban protegidos contra el imidacloprid tanto en cuanto al aprendizaje como a la memoria. Estos resultados establecieron el fundamento del desarrollo de alternativas farmacológicas y/o nutricionales para la protección de polinizadores contra los plaguicidas neurotóxicos.

Por lo tanto, se divulgan composiciones y métodos para proteger a los insectos polinizadores contra los efectos perjudiciales de los plaguicidas. Las composiciones divulgadas típicamente incluyen uno o más compuestos fenólicos en una cantidad eficaz para que ofrezcan protección contra el deterioro de una función cognitiva del insecto polinizador. Las composiciones pueden contener una fuente de carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, agua o combinaciones de los mismos, tales como, por ejemplo, néctar natural o artificial, miel, azúcar, jarabe de azúcar, polen o sustituto de polen, harina de soja, fécula de soja, gluten (por ejemplo, de soja o maíz), leche descremada, levadura, podas, aceite y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, la fuente de carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales o agua pueden ser o pueden derivar de alimentos disponibles comercialmente tales como AP23[®], BEE-PRO[®], FEEDBEE, MEGABEE y ULTRA BEE.

A. *Compuestos fenólicos*

Las composiciones divulgadas típicamente incluyen uno o más compuestos fenólicos en una cantidad eficaz para ofrecer protección contra el deterioro de una función cognitiva del insecto polinizador. Por ejemplo, se proveen composiciones que contienen uno o más compuestos fenólicos en una cantidad eficaz para prevenir una reducción de la memoria, el aprendizaje, las habilidades de navegación, la actividad motora o combinaciones de los mismos en el insecto polinizador tras su exposición a un plaguicida. También se proveen composiciones que contienen uno o más compuestos fenólicos en una cantidad eficaz para reducir o disminuir la pérdida de memoria, el aprendizaje, las habilidades de navegación, la actividad motora o combinaciones de los

mismos en el insecto polinizador tras su exposición a un plaguicida. También se proveen composiciones que contienen uno o más compuestos fenólicos en una cantidad eficaz para mejorar la función cognitiva (por ejemplo, el aprendizaje) en un insecto polinizador.

Tal como se usa en la presente, un compuesto fenólico se refiere a un compuesto que tiene un anillo aromático portador de uno o más grupos hidroxilo, inclusive sus derivados funcionales (Jianmei Y. y col., en: *Polyphenols Agricultural By-Products as Important Food Sources of Polyphenols*, 2014). El término abarca específicamente polifenoles que comprenden compuestos que tienen más de un grupo hidroxilo fenólico unido a uno o más anillos benceno. Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas. Son producidos por el sistema de defensa de las plantas para proteger a las plantas contra insectos y microorganismos invasores, y para conferir a las plantas sus propiedades organolépticas específicas, tales como color, gusto y sabor. Aunque no están clasificados oficialmente como nutrientes humanos, los polifenoles cumplen funciones importantes en la salud humana y, por ello, se denominan nutraceuticos.

Los tipos y el contenido de los compuestos fenólicos en los diferentes alimentos varían mucho, dependiendo del tipo de alimento, las condiciones ambientales de crecimiento del producto y las condiciones de procesamiento/cocción. Las fuentes ricas en polifenoles de la dieta incluyen varias especias y hierbas secas, productos de cacao, algunas bayas de color oscuro, algunas semillas (por ejemplo, semillas de lino) y frutos secos (por ejemplo, castañas, avellanas) y algunas verduras, que incluyen aceitunas y cabezas de alcachofa. Las hierbas medicinales y las especias también contienen diferentes tipos de fenólicos promotores de la salud y algunos productos secundarios/residuos agrícolas tales como pulpa de manzana, pulpa de arándano, pulpa de uva, cáscara de cítricos, piel de maní, pulpa de soja/okra y cáscara de batata, habitualmente contienen niveles altos de polifenoles. Por una revisión, véase Jianmei Y. y col., en: *Polyphenols Agricultural By-Products as Important Food Sources of Polyphenols*, 2014.

En la ciencia de los alimentos, los polifenoles naturales generalmente se clasifican en grupos y subclases en base a la similitud de sus estructuras químicas. Las

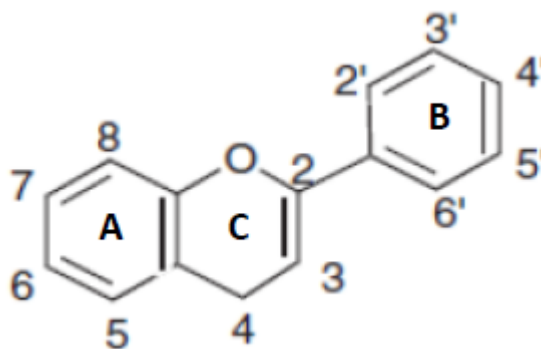
cuatro clases más importantes de polifenoles presentes en los alimentos son ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos. Por lo tanto, en algunas formas de realización, las composiciones divulgadas incluyen uno o más compuestos fenólicos tales como, ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos. En una forma de realización particular, las composiciones divulgadas incluyen uno o más compuestos fenólicos tales como ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos en una cantidad eficaz para ofrecer protección contra el deterioro de una función cognitiva en el insecto polinizador.

Flavonoides

En formas de realización preferidas, dichos uno o más compuestos fenólicos son flavonoides. Todos los flavonoides tienen una estructura central de difenilpropano de tres anillos ($C_6C_3C_6$) (por ejemplo, la Fórmula I o II).

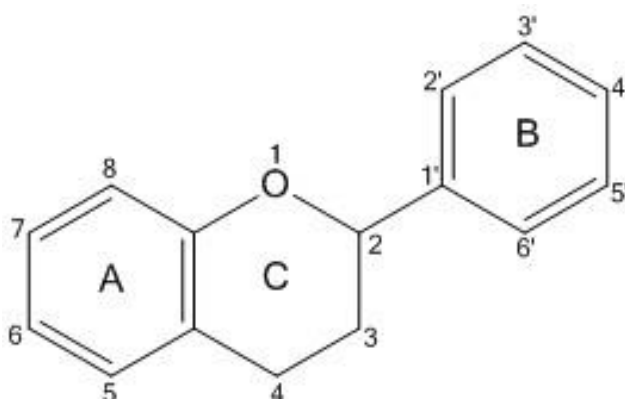
La estructura básica incluye los anillos A y C fusionados, donde el anillo de fenilo B está unido – por su posición 1' a la posición 2 del anillo C (numerado con respecto al oxígeno de pirano).

La estructura general de los flavonoides se representa como las Fórmulas I y II.



Fórmula I

(que se describe en Jianmei Y. y col., en: *Polyphenols Agricultural By-Products as Important Food Sources of Polyphenols*, 2014, que se incorpora específicamente y por completo en la presente a modo de referencia).



Fórmula II

(que se describe en Kumar y Pandey, *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*, volumen 2013 ID del Artículo 162750, 16 páginas, doi.org/10,1155/2013/162750, que se incorpora específicamente y por completo en la presente a modo de referencia).

Las modificaciones típicas de la estructura central básica incluyen hidroxilación y/o metilación en las posiciones C-3, C-5, C-7, C-3', C-4' y/o C-5'. Otras modificaciones incluyen acilaciones, sulfonaciones y prenilaciones. Los flavonoides existen como agliconas, glicósidos y derivados metilados.

Por ejemplo, los flavonoides existen como agliconas, glicósidos y derivados metilados. Con referencia a la Fórmula II, la estructura flavonoide básica es la aglicona. El anillo de seis miembros condensado con el anillo benceno es ya sea una α -pirona (flavonoles y flavanonas) o su derivado dihidro (flavonoles y flavanonas). La posición del sustituyente bencenoide divide a la clase de los flavonoides en flavonoides (posición 2) e isoflavonoides (posición 3). Los flavonoles difieren de las flavanonas por el grupo hidroxilo en la posición 3 y un enlace doble C2-C3 (Narayana, y col. "Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential", *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 33, N° 1, págs. 2–16, (2001)). Los flavonoides a menudo están hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 2, 3', 4' y 5'. Se sabe que en la naturaleza existen los metil éteres y acetil ésteres del grupo alcohol. Cuando se forman los glicósidos, el enlace glicosídico normalmente se ubica en las posiciones 3 o 7 y el carbohidrato puede ser L-ramnosa, D-glucosa, glucoramnosa, galactosa o arabinosa

(Middleton, “The flavonoids”, *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 5, págs. 335–338, (1984)).

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas y se encuentran en varias partes de la planta (por ejemplo, frutos, verduras, granos, corteza, raíces, tallos, flores). Los flavonoides son utilizados por los vegetales para su crecimiento y defensa contra plagas. Los flavonoides protegen a las plantas contra diferentes tipos de estrés biótico y abiótico y actúan como filtros UV únicos, funcionan como moléculas señal, compuestos alopáticos, fitoalexinas, agentes detoxificantes y compuestos defensivos antimicrobianos (Pance AN., y col. *J. Nutr. Sci.*, 5: e47; 2016). Se considera que los flavonoides constituyen un componente indispensable en una variedad de aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas. Esto es atribuido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticarcinogénicas junto con su capacidad para modular las funciones de enzimas celulares clave.

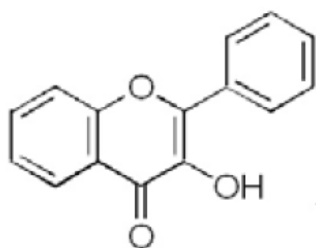
Por ejemplo, la acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima clave en el sistema nervioso central y su inhibición conduce a aumentos de los niveles neurales de acetilcolina. Se han descrito numerosos flavonoides por su actividad anticolinesterasa. Estudios han demostrado que la quercetina y la macluraxantona tienen una capacidad de inhibición dependiente de la concentración contra AChE y butirilcolinesterasa (BChE) (Pance AN. y col., *J. Nutr. Sci.*, 5: e47; 2016; Khan MT. y col., *Chem Biol Interact* 181, 383–389; 2009).

Los flavonoides tienen capacidad para actuar como antioxidantes. Los flavonoides pueden prevenir los daños causados por radicales libres de varias maneras y una manera es el secuestro directo de los radicales libres. Los flavonoides son oxidados por los radicales, dando como resultado un radical más estable, menos reactivo. En otras palabras, los flavonoides estabilizan las especies de oxígeno reactivo mediante reacción con el compuesto reactivo del radical. Debido a la gran reactividad del grupo hidroxilo de los flavonoides, los radicales se vuelven inactivos. En algunas formas de realización, los flavonoides inducen o mejoran la expresión y/o actividad de uno o más componentes de las vías antioxidantes (por ejemplo, la vía Nrf2, la vía AP-1) (Farooqui, T., *Front. Genet.*, 5: 60. 2014). En algunas formas de realización, las composiciones y los métodos

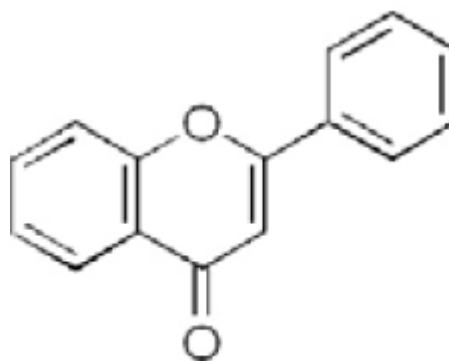
divulgadas aprovechan las propiedades antioxidantes y otras propiedades (por ejemplo, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticarcinogénicas junto con su capacidad para modular las funciones de enzimas celulares clave) de los flavonoides.

Como se mencionó precedentemente, en base a sus estructuras, los flavonoides se pueden dividir en varias subclases que incluyen, flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, flavanoles (catequinas), chalconas, neoflavonoides. Por lo tanto, en formas de realización preferidas, las composiciones divulgadas pueden contener una o más flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, flavanoles (catequinas), chalconas, neoflavonoides o combinaciones de las mismas.

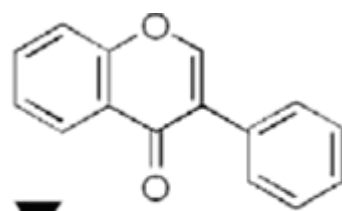
Las estructuras centrales de las subclases de flavonoides incluyen:



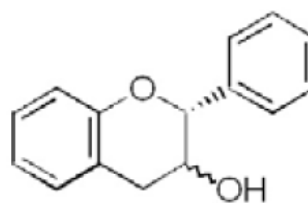
Flavonol



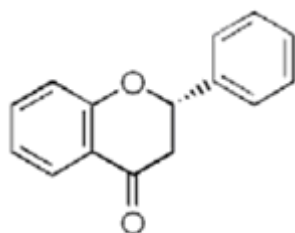
Flavona



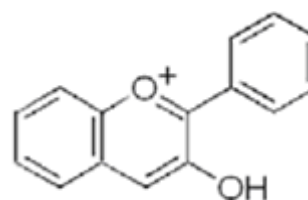
Isoflavona



Flavan-3-ol



Flavanona



Antocianidina

Véase, por ejemplo, Nishiumi y col., “Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors”, *Front Biosci* (Schol Ed); 3: 1332-62 (2011); doi: 10.2741/229, y Kumar y Pandey, *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*, volumen 2013 ID del Artículo 162750, 16 páginas, doi.org/10.1155/2013/162750, que se incorporan específicamente por completo en la presente a modo de referencia).

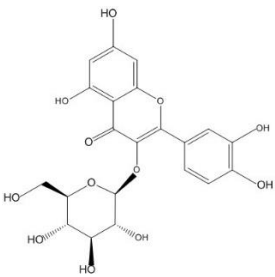
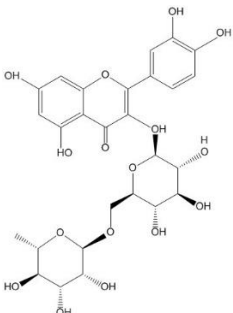
Las flavonas están presentes ampliamente en hojas, flores y frutos como glucósidos. El apio, perejil, pimientos rojos, manzanilla, menta y *Ginkgo biloba* se encuentran entre las principales fuentes de flavonas. Los ejemplos de flavonas incluyen luteolina, apigenina y tangeritina.

Las flavanonas, también denominadas dihidroflavonas, tienen el anillo C saturado; los anillos A y B pueden estar sustituidos por grupos de azúcar o metilo. Las flavanonas generalmente están presentes en todos los frutos cítricos tales como naranjas, limones y pomelos. Las flavanonas representan aproximadamente un 95% de los flavonoides totales en los cítricos. Las flavanonas de los cítricos típicamente están presentes en la forma de glicósidos o agliconas. La hesperitina, naringenina y eriodictiol son ejemplos de flavanonas.

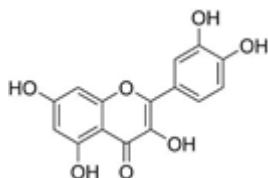
Los flavonoles son una clase de flavonoides caracterizada por la presencia de un esqueleto 3-hidroxiflavona (3-hidroxi-2-fenilcromen-4-ona (IUPAC)). Las cebollas, kale, lechuga, tomates, manzanas, pomelos y bayas son fuentes ricas en flavonoles. Además de las frutas y verduras, el té y vino tinto también son fuentes de flavonoles. Los flavonoles presentan patrones de metilación e hidroxilación muy diversos lo cual da lugar a su diversidad. Los ejemplos de flavonoles incluyen quercetina, rutina, miricetina, kaempferol, fisetina, morina e isorhamnetina. En algunas formas de realización, las composiciones divulgadas contienen uno o más flavonoles tales como quercetina, rutina, miricetina, kaempferol, fisetina, morina, isorhamnetina o derivados o variantes de los mismos. El término “derivado” no significa que el derivado necesariamente sea sintetizado a partir del compuesto parental, ya sea como material de partida o como intermediario, si bien este puede ser el caso. El término “derivado” puede incluir sales (por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables), profármacos o

metabolitos del compuesto parental. En formas de realización preferidas, los compuestos fenólicos comprenden uno o más flavonoles. En formas de realización particularmente preferidas, los compuestos fenólicos comprenden rutina, quercetina y/o un derivado de las mismas tales como hiperósido, quercitrina, 3-O-metilquercetina, quercetina 3'-O-sulfato o cualquier otro indicado en la Tabla 1 (por ejemplo, isoquercetina, rutina, quercetina, quercitrina, hiperósido, quercimeritrina, baimaside, querciturona, 3-O-metilquercetina, quercetina 3-sambubiósido, miquelianina, espiraeósido, isorhamnetina, quercetina 3'-O-sulfato, quercetina 7-O-glucósido, quercetina 3-O-rhamnosida, quercetina 3,4'-diglucósido y quercetina 3-soforotriósido).

Tabla 1: Información estructural de quercetina y derivados de la misma.

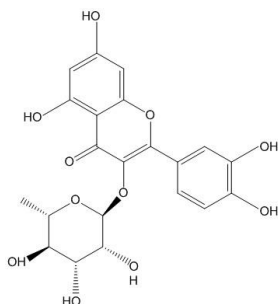
Nombre de la variante	Estructura	Actividad farmacológica
Isoquercetina		Antibacteriana, antihistamínico, antiespasmódica, hepatoprotector, inhibidor de monoamina oxidasa, inhibidor de tirosinasa, inductor de quinona reductasa, anticoagulante, antiinflamatoria, antioxidante, inhibidor de plaguicida.
Rutina		Antioxidante antiinflamatorio antialérgico, actividad antitumoral.

Quercetina



Actividad antioxidante
Efectos neurológicos
Actividad antiviral
Actividad anticáncer
Protección cardiovascular
Actividad antimicrobiana
Actividad antiinflamatoria
Actividad hepatoprotectora

Quercitrina



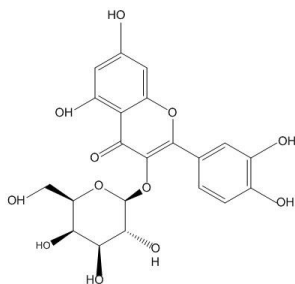
Antiinflamatoria
Antiproliferativa
Proapoptótica en carcinomas
Inhibidor de la diferenciación osteoclástica

Nombre de la variante

Estructura

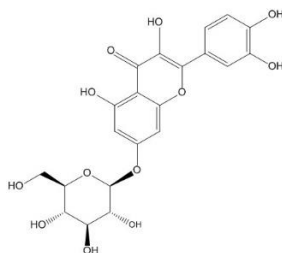
Actividad farmacológica

Hiperósido



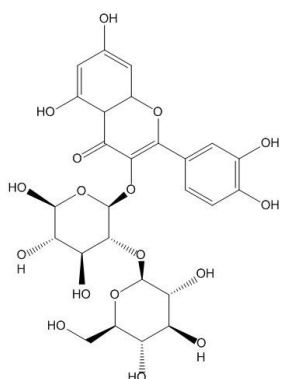
Antiinflamatoria
Antidepresiva
Neuroprotector
Cardioprotector
Antidiabética
Anticáncer
Antifúngica
Gastroprotector
Antioxidante

Quercimeritrina



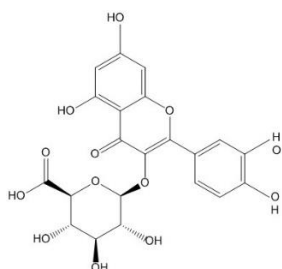
Antimicrobiana
Anticáncer

Baimaside



Citoprotector
Antioxidante

Querciturona

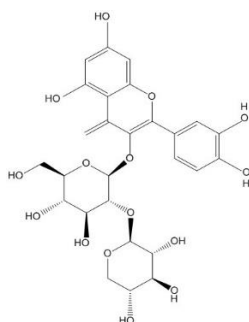


Antioxidante
Antiinflamatoria
Inhibidor de la enzima convertidora
de angiotensina

Nombre de la variante	Estructura	Actividad farmacológica
3-O-metilquercetina		Antibacteriana, anticoagulante, antihistamínico, antiinflamatoria, antiespasmódica, antioxidante, hepatoprotector, inhibidor de monoamina oxidasa, plaguicida, inhibidor de tirosinasa, inductor de quinona reductasa.

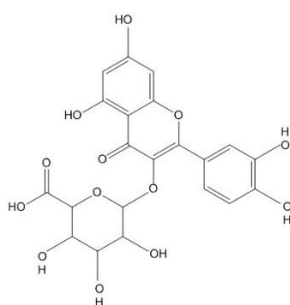
**Quercetina
sambubiósido**

3-



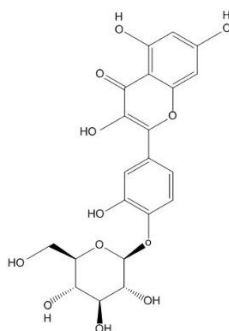
Antioxidante
antiinflamatorio
antialérgico,
actividad antitumoral.

Miquelianina



Actividad antioxidante
Efectos neurológicos
Actividad antiviral
Actividad anticáncer
Protección cardiovascular
Actividad antimicrobiana
Actividad antiinflamatoria
Actividad hepatoprotectora

Espiraeósido

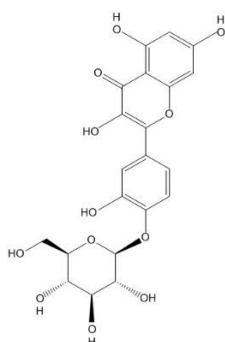


Antiinflamatoria
Antiproliferativa
Proapoptótica en carcinomas
Inhibidor de la diferenciación
osteoclástica

**Nombre de la
variante Estructura**

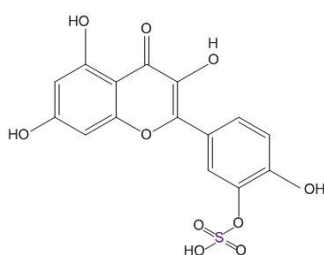
Actividad farmacológica

Isorhamnetina



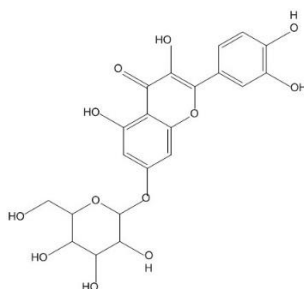
Antibacteriana, anticoagulante, antihistamínico, antiinflamatoria, antiespasmódica, antioxidante, hepatoprotector, inhibidor de monoamina oxidasa, plaguicida, inhibidor de tirosinasa, inductor de quinona reductasa.

Quercetina 3'-O-sulfato



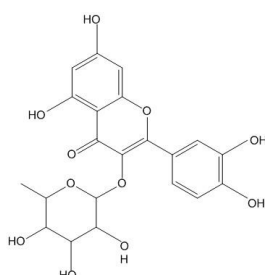
Inhibidor de la oxidación de lipoproteínas

Quercetina 7-O-glucósido



Actividad antioxidante contra radicales peroxilo e hidroxilo

Quercetina 3-O-rhamnosida



Actividad antimicrobiana
Actividad antitumoral

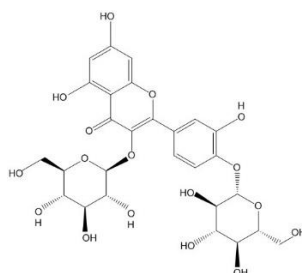
Nombre de la variante

Estructura

Actividad farmacológica

**Quercetina
diglucósido**

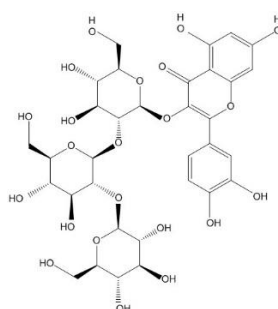
3,4'-



Actividad antioxidante

**Quercetina
soforotriósido**

3-



Antibacteriana, anticoagulante, antihistamínico, antiinflamatoria, antiespasmódica, antioxidante, hepatoprotector, inhibidor de monoamina oxidasa, inhibidor de tirosinasa, inductor de quinona reductasa.

Las isoflavonas son un subgrupo grande y muy distintivo de flavonoides. Su distribución en las plantas es limitada en comparación con los otros flavonoides, y se encuentran predominantemente en legumbres, en particular, soja, garbanzos, maní y alfalfa. Los ejemplos de isoflavonas incluyen gliciteína, genisteína y daidzeína.

Las antocianinas son pigmentos vegetales solubles en agua responsables del color azul, púrpura y rojo de muchos tejidos vegetales. Se encuentran predominantemente en las capas celulares externas de varios frutos tales como arándanos, grosellas negras, uvas rojas, uvas merlot, frambuesas, frutillas, arándanos azules, mirtilos y zarzamoras. El color de la antocianina depende del pH y también por metilación o acilación en los grupos hidroxilos de los anillos A y B. Los ejemplos de antocianinas incluyen cianidina, delphinidina, malvidina, petunidina, pelargonidina y peonidina.

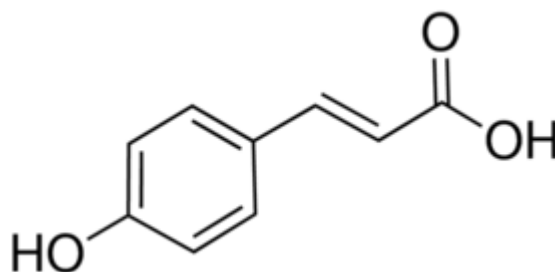
Los flavanoles también denominados dihidroflavonoles o catequinas, son los derivados 3-hidroxilo de las flavanonas. Son un subgrupo altamente diversificado y multisustituido. Los flavanoles también se denominan flavan-3-oles ya que el grupo

hidroxilo siempre está unido en la posición 3 del anillo C. Los flavanoles son abundantes en bananas, manzanas, arándanos azules, duraznos y peras. Los ejemplos no taxativos de flavanoles incluyen (+)- catequina, (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina galato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC) y (-)-epigallocatequina galato (EGCG).

Las chalconas se caracterizan por la ausencia del ‘anillo C’ de la estructura básica del esqueleto flavonoide y también se conocen como flavonoides de cadena abierta. Los ejemplos de chalconas incluyen floridzina, arbutina, floretina y chalconaringenina. Las chalconas están presentes en cantidades significativas en tomates, peras, frutillas, gayuba o uva de oso y algunos productos de trigo.

Los neoflavonoides tienen un esqueleto 4-fenilcromeno sin una substitución por un grupo hidroxilo en la posición 2. Un ejemplo de neoflavonoide es la calofilolida, que se puede encontrar en las semillas de *Calophyllum inophyllum* y la corteza y madera de la planta *Mesua thwaitesii*.

En otra forma de realización, el compuesto fenólico es ácido p-coumárico, que presenta la siguiente estructura:



En algunas formas de realización, las composiciones divulgadas pueden contener, y/o los métodos pueden utilizar, una pluralidad de dos, tres, cuatro o más compuestos fenólicos diferentes, tales como flavonoles incluyendo quercetina y rutina y kaempferol, y/u otros compuestos fenólicos tal como el ácido p-coumárico. Un experto en la materia puede determinar fácilmente las proporciones apropiadas (por ejemplo, molares o en masa) de los compuestos fenólicos en dichas composiciones. Se comprenderá que en algunas formas de realización, la presencia de una pluralidad de compuestos fenólicos puede conferir un efecto sinérgico (por ejemplo, el efecto de la combinación es mayor que la suma de los efectos de cada compuesto fenólico solo). En

formas de realización específicas, la quercetina y rutina están juntas en la misma formulación o en formulaciones diferentes a una relación de quercetina:rutina de 1:1, 0,75:25 o 0,25:0,75.

B. Alimentos, aditivos y suplementos alimenticios

Las composiciones divulgadas que contienen uno o más compuestos fenólicos se pueden usar de manera independiente (por ejemplo, como un alimento o suplemento) y/o en combinación con otros alimentos para animales (por ejemplo, alimentos disponibles comercialmente). Por consiguiente, en algunas formas de realización, las composiciones divulgadas se pueden usar como un alimento, un aditivo o suplemento alimenticio o un nutracéutico.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, las composiciones que contienen uno o más compuestos fenólicos se pueden administrar de manera directa a un sujeto (por ejemplo, un insecto polinizador) con la ingesta (por ejemplo, diluida en agua u otro solvente adecuado, o como un polvo). Sin embargo, en una forma de realización alternativa, se puede hacer que el sujeto ingiera una composición que contiene uno o más compuestos fenólicos mediante el suministro de la composición al sujeto de manera simultánea, separada o sucesiva con la alimentación típica. Se puede hacer que el sujeto ingiera dichos uno o más compuestos fenólicos mediante el suministro de uno o más compuestos fenólicos en la dieta, tal como en o mezclados con un alimento para animales, como un suplemento de la dieta y/o en el agua para beber. Cabe notar que, dependiendo de la solubilidad de dichos uno o más compuestos fenólicos utilizados, puede resultar beneficioso introducir un cosolvente para solubilizar o ayudar en la disolución en agua a una concentración eficaz.

Las composiciones de alimentos son bien conocidas en la materia para varias especies de animales, tales como insectos polinizadores, inclusive abejas mieleras. Las abejas mieleras, al igual que todos los demás animales, requieren nutrientes esenciales para su supervivencia y reproducción. Las abejas mieleras necesitan carbohidratos (por ejemplo, los azúcares en el néctar o la miel), aminoácidos (por ejemplo, proteínas del polen), lípidos (por ejemplo, ácidos grasos, esteroides), vitaminas, minerales (por ejemplo, sales) y agua. Adicionalmente, estos nutrientes deben estar presentes a las

relaciones correctas para que las abejas mieleras sobrevivan y prosperen. Las abejas mieleras y otras especies de abejas recolectan el polen de las flores para obtener proteínas, grasas, esteroides, vitaminas y minerales. También recolectan el néctar de las flores, melaza de áfidos y otras fuentes de azúcares como la savia de árboles, para proveerles de carbohidratos. Tanto las etapas adultas como larvales dependen del polen y del néctar para su nutrición. Las abejas dependen típicamente del forraje natural para que les proporcione el néctar y polen de las flores a fin de suministrarle nutrición a sus colonias.

Sin embargo, en algunos casos las abejas se pueden alimentar de otras fuentes. Por ejemplo, una manera común de alimentar a las abejas mieleras durante los períodos cuando no pueden obtener polen suficiente consiste en agregar sustitutos de polen a la colonia en la forma de una torta o una solución. Estos sustitutos típicamente están compuestos por proteínas vegetales (por ejemplo, gluten de maíz o soja) y/o animales (por ejemplo, huevos completos), aceites y levadura de cerveza.

Las dietas artificiales conocidas actualmente para abejas mieleras incluyen néctares líquidos artificiales que típicamente incluyen una fuente de carbohidratos o azúcares, tortas elaboradas con polen y azúcares, tortas elaboradas con proteínas de soja (habitualmente extraídas con solventes) mezcladas con levadura de cerveza y azúcar, tortas elaboradas con una mezcla de harina de soja, *Torula* o levadura de cerveza, podas, aceite vegetal, mezcla de vitaminas y miel o malta irradiada, tortas elaboradas con una mezcla de harina de expeller de soja, podas, aceite de semillas de algodón, mezcla de vitaminas y miel o malta irradiada, y tortas de la dieta de Haydak elaboradas de fécula de soja, levadura de cerveza, azúcar y leche descremada en polvo. En algunas formas de realización, se puede suplementar cualquiera de las dietas mencionadas precedentemente con las composiciones que contienen una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos antes de su administración a las abejas.

El néctar es la fuente principal de carbohidratos para las abejas mieleras. La cantidad de néctar necesaria por colonia depende de cuán concentrados están los azúcares en el néctar. Una abeja obrera necesita 11 miligramos (mg) de azúcar seco por día. Se puede proveer azúcar suplementario en la forma de miel o como un jarabe de

azúcar a las abejas mieleras según necesidad. Típicamente, el jarabe de azúcar contiene una relación de 1:1 o 2:1 de azúcar a agua (medida en volumen o en peso), pero dichas relaciones pueden variar dependiendo de los requerimientos de la colonia o individuales. En algunas formas de realización, el jarabe de azúcar o miel se suplementa con las composiciones que contienen una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos antes de su administración a las abejas.

En algunas formas de realización, las composiciones que contienen uno o más compuestos fenólicos se pueden mezclar o combinar de otra manera con cualquier fuente de nutrición para el insecto polinizador (por ejemplo, abeja mielera, abejorro). Dichas fuentes incluyen una fuente de carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, agua y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de dichas fuentes incluyen néctar natural o artificial, miel, azúcar, jarabe de azúcar, polen o sustituto de polen, harina de soja, fécula de soja, gluten (por ejemplo, soja o maíz), leche descremada, levadura, podas, aceite y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el polen se puede adquirir de proveedores comerciales o puede ser atrapado por las abejas. En algunas formas de realización, las fuentes pueden ser o pueden derivar de alimentos para abejas disponibles comercialmente, tales como AP23[®], BEE-PRO[®], FEEDBEE, MEGABEE y ULTRA BEE. En formas de realización preferidas, cualquiera de las opciones precedentes se puede mezclar o combinar de otra manera con una composición que contiene uno o más compuestos fenólicos para formar una composición final (por ejemplo, alimento, aditivo o suplemento alimenticio o nutraceutico) que contenga una cantidad eficaz de dichos uno o más compuestos fenólicos.

Dichos uno o más compuestos fenólicos se pueden incluir en un alimento para animales, o en un suplemento o una premezcla de alimentos de animales, para el alimento de los polinizadores comerciales tales como abejas mieleras y abejorros. En una forma de realización, dichos uno o más compuestos fenólicos se pueden incluir o usar para suplementar un sustituto de polen, que puede constituir un alimento completo. Un alimento completo está diseñado para contener todas las proteínas, carbohidratos, vitaminas, lípidos, minerales y otros nutrientes necesarios para lograr un crecimiento, reproducción y salud apropiados del polinizador.

C. *Formulaciones de alimentos*

Un alimento para animales o un suplemento alimenticio para usar en los métodos que se describen en la presente puede incluir uno o más compuestos fenólicos, proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales, agua, otros nutrientes o ingredientes, o combinaciones de los mismos.

Las fuentes de proteínas y lípidos pueden comprender fuentes de gluten de maíz en combinación con fuentes concentrados de soja, harina de cebada, levadura y/o granos de destilería secos de maíz, fuentes de soja y huevos o productos de huevos. La fuente de huevos también es una buena fuente de colesterol. La soja contribuye con uno de los perfiles más completos de aminoácidos esenciales de cualquier material vegetal, y también es una fuente de lipoproteínas, que ayudan a administrar esteroides y ácidos grasos poliinsaturados. Es un material alimenticio naturalmente rico en lípidos. Los ejemplos de fuentes de soja incluyen harina de soja (por ejemplo, prensada en expeller, extraída con solvente), fécula de soja, leche de soja y extracto de soja en suspensión. Los huevos, en especial yemas de huevo, son fuentes de cantidades extremadamente altas de proteínas que constituyen un estándar de la integridad nutricional. Los huevos también son una fuente rica de lípidos, inclusive de colesterol, que, siendo un esteroide, es un nutriente esencial para las abejas mieleras. Los lípidos presentes en la yema de huevo también son ricos en componentes polares tales como lecitina, que es un emulsionante natural, altamente digerible y nutritivo. Los huevos también pueden contribuir en la textura al aumentar la viscosidad. Los huevos son una fuente completa de vitaminas B, vitamina A (en un complejo de carotenoides) y vitamina E, y también una fuente de minerales bastante completa. Además, se pueden usar aceites vegetales como una fuente de lípidos. Los ejemplos de ellos incluyen aceite de soja, aceite de alazor, aceite de maíz, aceite de maní, aceite de girasol, aceite de canola, aceite de colza, aceite de semillas de algodón y aceite de lino.

La fuente de carbohidratos (por ejemplo, azúcares) presente en las formulaciones pueden servir como un estimulante de alimentación, una fuente de carbono para los bloques de construcción para el crecimiento, una fuente de energía, un agente para aumentar la viscosidad (texturizante) y un humectante (agente de retención de agua),

que disminuye la actividad del agua que reduce el crecimiento microbiano e inhibe las reacciones químicas que conducen al deterioro de las dietas. Los ejemplos de fuentes de azúcares incluyen sacarosa, por ejemplo, azúcar cristalina o granulada; otros azúcares cristalinos o granulados, por ejemplo, fructosa, glucosa (también indicada como dextrosa) o maltosa; jarabe de maíz rica en fructosa, por ejemplo, HFCS55, u otro jarabe de azúcar. Se pueden usar en una forma sólida o como un jarabe.

Opcionalmente, se agregan agentes antifúngicos y/o antimicrobianos a las formulaciones para prevenir un deterioro prematuro de las formulaciones. Son deseables porque a las temperaturas típicas de las colmenas, los microorganismos pueden proliferar rápidamente y deteriorar los alimentos, y sirven como patógenos potenciales para las abejas. Los ejemplos de agentes antimicrobianos comprenden ácido sórbico y sus sales, ácido propiónico y sus sales, la serie de parabenos (las formas metilo, etilo, propilo y butilo) y ácido benzoico y sus sales. El sorbato de potasio, un ácido graso, presenta propiedades antifúngicas y antimicrobianas bien demostradas. El propionato de sodio es un agente antimicrobiano eficaz y un conservante aprobado. En la materia se conocen otros agentes antifúngicos y/o antimicrobianos, que incluyen, por ejemplo, propionato de calcio.

Las composiciones se pueden formular en cualquier forma adecuada para su administración (por ejemplo, ingesta) al insecto polinizador. En algunas formas de realización, las composiciones se pueden encontrar en la forma de un líquido (por ejemplo, jarabe de azúcar, jarabe de maíz rica en fructosa). Una formulación líquida puede ser una solución, una suspensión o una emulsión. En algunas formas de realización, las formulaciones líquidas proveen un líquido homogéneamente mezclado, dispersable en agua, sustancialmente homogénea, que sustancialmente no forma grumos, vertible o floable, en donde los nutrientes están disueltos, suspendidos y/o emulsionados en el mismo.

En algunas formas de realización, las composiciones se formulan como un sólido (por ejemplo, un polvo, torta, golosina). Las formulaciones secas se pueden administrar directamente a los insectos polinizadores, tales como abejas, sin adición de líquidos. En algunas formas de realización, las composiciones se pueden formular en una forma seca,

que luego se puede mezclar con agua o un jarabe de azúcar antes de su uso para formar un líquido. Una formulación de torta o semiseca se puede formar usando menos jarabe o una fuente de carbohidratos sólido y luego llevar el producto a una consistencia tipo masa o pulverulento, por ejemplo, que se puede situar en o cerca de una colonia para la alimentación.

Las formulaciones de las diversas composiciones pueden llevarse a un pH equilibrado, por ejemplo, para imitar el pH del polen natural y promover un entorno intestinal saludable en el polinizador. Por lo tanto, la formulación puede incluir uno o más ácidos orgánicos o ácido fosfórico como fuentes acidificantes para lograr el pH deseado (por ejemplo, en el rango de entre 3,5 y 7). El pH preferido es de aproximadamente 4,5. Los ejemplos de compuestos acidificantes son los ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, ácido málico, ácido fumárico o ácido succínico y combinaciones de ácidos orgánicos, tales como ácido málico, ácido fumárico y ácido pirúvico.

En algunas formas de realización, se controla el tamaño de partícula de la formulación para imitar el tamaño de partícula del polen natural. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el tamaño de partícula de la formulación es de aproximadamente 35 micrones o menor. Opcionalmente, se pueden incluir agentes antimicrobianos para prevenir un deterioro prematuro de las formulaciones.

III. Métodos

A. Métodos de uso

Se proveen métodos para usar las composiciones divulgadas. Las composiciones provistas en la presente tal como un compuesto fenólico, o una composición que incluye un compuesto fenólico, se pueden usar como un alimento, un aditivo o suplemento alimenticio o un nutraceutico. Dichos alimentos, aditivos o suplementos alimenticios o nutraceuticos son de utilidad para proteger profilácticamente a los insectos polinizadores contra los efectos negativos de los plaguicidas neurotóxicos (por ejemplo, mediante la administración antes de la exposición a un plaguicida). En algunas formas de realización, las composiciones divulgadas que incluyen alimentos, aditivos alimenticios, suplementos alimenticios o nutraceuticos son de utilidad para tratar a los

insectos polinizadores contra los efectos negativos de los plaguicidas neurotóxicos (por ejemplo, mediante la administración durante y/o después de la exposición a un plaguicida).

Se proveen métodos para proteger una función cognitiva de un insecto polinizador mediante la administración de una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones divulgadas tal como un compuesto fenólico, o una composición que incluye un compuesto fenólico, a un insecto polinizador que lo necesita. Por ejemplo, en algunas formas de realización, los métodos incluyen proteger las habilidades de aprendizaje y/o memoria de un insecto polinizador mediante la administración de una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones divulgadas al insecto polinizador.

También se proveen métodos para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva en un insecto polinizador mediante la administración al insecto polinizador de una composición (por ejemplo, un alimento, aditivo o suplemento alimenticio, o un nutracéutico) que contiene una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva en el insecto polinizador. Preferiblemente, la función cognitiva incluye, pero en un sentido no taxativo, el aprendizaje, la memoria, la atención, la toma de decisiones y otras formas de adquisición, almacenamiento, procesamiento, recuperación y uso de información, la navegación, la actividad motora, la sensibilidad a la sacarosa y combinaciones de los mismos.

Por consiguiente, en algunas formas de realización, los métodos reducen, disminuyen o previenen una reducción o pérdida de la memoria, el aprendizaje, las habilidades de navegación, la actividad motora o una combinación de los mismos en un insecto polinizador tras la exposición a un plaguicida, mediante la administración de cualquiera de las composiciones divulgadas.

También se proveen métodos para controlar insectos plaga. En algunas formas de realización, un método para controlar insectos plaga comprende tratar un área con un plaguicida y administrar al insecto polinizador una composición que incluye una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva y/o aumentar una función cognitiva en el insecto polinizador.

El área puede ser un espacio geográfico (por ejemplo, un campo) o una parte de un organismo (por ejemplo, una planta). En algunas formas de realización, el área está ocupada por insectos plaga y por insectos polinizadores. El área puede ser tratada con el plaguicida en cualquier momento adecuado, por ejemplo, antes o después de administrar la composición a los insectos polinizadores. En algunas formas de realización, el área es tratada con el plaguicida mediante una aplicación foliar, inyección en el suelo, inyección en árboles, aplicación terrestre como una formulación granulada o líquida, o como un tratamiento de semillas recubiertas con plaguicida.

Preferiblemente, el área se trata con una cantidad eficaz del plaguicida para reducir la cantidad de insectos plaga en el área. Por ejemplo, el plaguicida puede ser letal para los insectos plaga y/o en una cantidad que es subletal para los insectos polinizadores. Los ejemplos de insectos plaga que pueden ser diana incluyen áfidos, trips, moscas blancas, ácaros, saltadores de las hojas, gusanos de la harina, chinches espumosas, pulgas, termitas, cochinillas (por ejemplo, cochinillas armadas, cochinillas blandas) y escarabajos.

Típicamente, los métodos divulgados previenen, reducen, disminuyen o inhiben uno o más de los efectos adversos asociados con la exposición a un plaguicida. Por ejemplo, en algunas formas de realización, los métodos divulgados reducen, disminuyen o inhiben uno o más mecanismos de disfunción mitocondrial (por ejemplo, un transporte de electrones reducido, una producción de ATP reducida, un potencial de membranas mitocondriales alterado), por ejemplo, en el cerebro de un insecto polinizador, mediante la administración de cualquiera de las composiciones divulgadas. En algunas formas de realización, los métodos divulgados inducen o mejoran la expresión y/o actividad de uno o más componentes de un antioxidante y las vías de detoxificación globales (por ejemplo, la vía Nrf2, la vía AP-1, las proteínas CYP450) en el cerebro u otros órganos del insecto polinizador mediante la administración de cualquiera de las composiciones divulgadas al insecto polinizador.

En algunas formas de realización, los métodos pueden mejorar la función cognitiva. Por ejemplo, se proveen métodos para mejorar la función cognitiva (por ejemplo, el aprendizaje, la memoria, la velocidad y precisión de las decisiones) en un

insecto polinizador mediante la administración al polinizador de una composición divulgada que contiene una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos.

B. Métodos de administración

Las composiciones y formulaciones divulgadas se pueden administrar al sujeto que lo necesita (por ejemplo, un insecto polinizador) mediante una variedad de medios adecuados. Por ejemplo, las composiciones y formulaciones pueden ser ingeridas por el insecto polinizador receptor.

Típicamente, los métodos proveen la administración de las composiciones y formulaciones divulgadas por medio de ingesta de los alimentos y programas de alimentación normales del insecto polinizador. Las composiciones y formulaciones provistas se pueden suministrar como un alimento, aditivo o suplemento alimenticio o nutracéutico. Las composiciones y formulaciones se pueden situar en un área donde se encuentran las abejas o en la cercanía de alimentación de las abejas, tal como en o adyacente a una colmena de abejas o jaula de abejas, o también dentro de la colmena como una torta o como un líquido. Una “torta” se refiere a una mezcla de jarabe de azúcar y una formulación de dieta de abejas para conformar una consistencia blanda y plegable tipo masa que es prensada como una torta delgada. Las tortas típicamente se proveen en las colonias de abejas mieleras para sustentar las necesidades de proteínas y nutricionales de la colonia.

A modo de ejemplo, los mecanismos para proveer las composiciones y formulaciones divulgadas a las abejas se resumen a continuación. Sin embargo, no pretenden ser limitantes. Un experto en la materia puede determinar fácilmente los métodos apropiados para la administración de la composición a cualquier insecto polinizador de interés. Las cantidades y los tiempos de alimentación apropiados para varios organismos son conocidos por los expertos en la materia y se pueden determinar fácilmente.

Las composiciones y formulaciones pueden ser alimentadas a las abejas o a la colonia de abejas de diversas maneras. Por ejemplo, las composiciones se pueden formular como un líquido y luego se pueden alimentar a la colmena en un comedero horizontal en lugar de un panal. Como alternativa, o además, la composición se puede

colocar en un comedero vertical, que a su vez se coloca encima de un panal dentro de la colmena.

Las composiciones se pueden formular como un líquido, una torta o un biscocho.

En determinadas formas de realización, la composición se provee adyacente a un panal en la colmena, por ejemplo, encima del panal. Las composiciones se pueden proveer sobre una malla a través de la cual pueden pasar las abejas. En determinadas formas de realización, las composiciones formuladas como un líquido se proveen en una jarra invertida insertada en un orificio en el techo de una colmena. En determinadas formas de realización, las composiciones se pueden proveer en un área que rodea a la colmena (por ejemplo, en un apiario). Por lo tanto, las abejas pueden comer la composición como parte de su forrajeo normal. En dichas formas de realización, la composición se puede formular como un líquido o como un polvo.

En algunas formas de realización, la composición se puede proveer, por ejemplo, por medio de un alimentador de cuadro, o se pueden verter o rociar.

En cualquiera de las opciones precedentes, las composiciones y formulaciones se pueden proveer al insecto polinizador antes o después de la exposición a uno o más plaguicidas. Esto puede tener lugar sobre cualquier período de tiempo, por ejemplo, minutos, horas, días o semanas. En algunas formas de realización, las composiciones y formulaciones se proveen al insecto polinizador una o más veces entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 10 días después de la exposición al plaguicida.

Adicionalmente, o como alternativa, en formas de realización preferidas, las composiciones y formulaciones se pueden proveer al insecto polinizador antes de la exposición a uno o más plaguicidas. Por ejemplo, las composiciones y formulaciones se pueden proveer en el rango de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 10 días antes de la exposición a uno o más plaguicidas.

Típicamente, las composiciones y formulaciones se proveen 1-3 días (por ejemplo, 1, 2 o 3 días) antes de la exposición a uno o más plaguicidas. Por ejemplo, los apicultores migratorios que usan sus colmenas para polinizar almendros, manzanos, ciruelos y otras plantaciones pueden proveer las composiciones y formulaciones a sus

colonias antes (por ejemplo, 1, 2 o 3 días) de liberarlas al aire libre para que realicen su forrajeo.

Cuando la administración es por medio de la ingesta, las composiciones y formulaciones típicamente se proveen a los insectos polinizadores *ad libitum*, es decir, el polinizador se alimenta libremente según lo deseara. Por ejemplo, las composiciones que contienen una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos se pueden formular como un líquido (por ejemplo, jarabe de azúcar) que se coloca en una bolsa o jarra en, sobre o cerca de la colmena. Las abejas pueden acceder e ingerir la composición como desean sobre el período de tiempo antes de la exposición a un plaguicida. Por ejemplo, las abejas pueden ser alimentadas con la composición *ad libitum* sobre un período de 1-10 días antes de la exposición a uno o más plaguicidas.

El polinizador puede ingerir una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos fenólicos en una base única, repetida o regular. Por ejemplo, el polinizador puede ingerir una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos una, dos, tres o más veces por semana, día por medio, todos los días o más de una vez por día (por ejemplo, una, dos, tres o más veces por día) durante la realización de los métodos o usos divulgados. Los Ejemplos que se ofrecen más adelante ilustran que en algunas formas de realización, el efecto protector puede durar más de 36 horas después de la última dosis.

En algunas formas de realización, dichos uno o más compuestos fenólicos están incluidos en un alimento, un suplemento alimenticio y/o en el agua para beber y el polinizador ingiere dichos uno o más compuestos fenólicos cuando comen y/o beben, y opcionalmente cada vez que comen y/o beben. Esta ingesta de una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos puede continuar durante un período de tiempo de la vida del animal que puede corresponder a un período de tiempo que comprende como máximo o que comprende por lo menos un 5%, 10%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o sustancialmente el 100% de la vida del animal desde su nacimiento hasta su muerte. La ingesta de una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos puede comenzar el día del nacimiento del animal, o a la edad de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32,

33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 días o más. Después que el polinizador comienza a ingerir o absorber dichos uno o más compuestos, puede continuar haciéndolo en una base regular y repetida por un período de tiempo que puede ser, o puede ser como máximo o por lo menos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 días o más. La ingesta también puede comenzar en las etapas larvales, donde los adultos pueden proveer a la cría una sola carga (especie de aprovisionamiento masivo) o múltiples cargas (aprovisionamiento sucesivo) de alimentos suplementados.

1. Cantidades eficaces

Debido a que la administración de las composiciones que contienen uno o más compuestos fenólicos genera un efecto beneficioso sobre una o más funciones cognitivas del insecto polinizador, la cantidad de la composición administrada se puede expresar como la cantidad eficaz para alcanzar un efecto deseado en el polinizador receptor. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la cantidad de uno o más compuestos fenólicos en las composiciones es eficaz para mejorar la función cognitiva (por ejemplo, aprendizaje, memoria, navegación) en un insecto polinizador.

En algunas formas de realización, la cantidad de uno o más compuestos fenólicos en las composiciones es eficaz para proteger a los insectos polinizadores contra los efectos cognitivos perjudiciales de los plaguicidas (por ejemplo, plaguicidas neurotóxicos). La cantidad de uno o más compuestos fenólicos en las composiciones puede ser eficaz para prevenir una reducción de la memoria, el aprendizaje, las habilidades de navegación, la actividad motora o combinaciones de los mismos en un insecto polinizador tras su exposición a un plaguicida. La cantidad de uno o más compuestos fenólicos en las composiciones puede ser eficaz para reducir o disminuir la pérdida de la memoria, el aprendizaje, las habilidades de navegación, la actividad motora o combinaciones de los mismos en el insecto polinizador tras la exposición a un plaguicida.

La cantidad de una composición administrada a un insecto polinizador típicamente es suficiente para prevenir, reducir, disminuir o inhibir uno o más de los

efectos adversos asociados con la exposición a un plaguicida. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la cantidad de uno o más compuestos fenólicos en las composiciones es eficaz para prevenir, reducir, disminuir o inhibir uno o más mecanismos de disfunción mitocondrial (por ejemplo, transporte de electrones reducido, producción de ATP reducida, potencial de membranas mitocondriales alterado). En otras formas de realización, la cantidad de uno o más compuestos fenólicos en las composiciones es eficaz para inducir o mejorar la expresión y/o actividad de uno o más componentes de las vías antioxidantes (por ejemplo, la vía Nrf2, la vía AP-1) en el cerebro u otros órganos del insecto polinizador.

Las cantidades eficaces se pueden expresar como masa total (por ejemplo, mg), una cantidad por unidad de peso corporal del receptor (por ejemplo, mg/kg), como una dosificación basada en el área de superficie corporal (por ejemplo, mg/m²) y semejantes. En algunas formas de realización, las composiciones divulgadas pueden contener un compuesto fenólico en un rango de concentración de entre aproximadamente 0,1 µM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 0,1 µM y aproximadamente 10 mM o entre aproximadamente 0,1 µM y aproximadamente 10 mM, o entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 10 mM, o entre 0,5 µM y aproximadamente 5 mM, o entre aproximadamente 0,1 µM y aproximadamente 100 µM, o entre aproximadamente 0,1 µM y aproximadamente 10 µM, o entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 1 mM, o entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 100 µM, o cualquier subrango entre cualquiera de los valores precedentes. En algunas formas de realización, la dosificación es una dosis específica entre los rangos y subrangos precedentes, inclusive los puntos de los extremos. Por ejemplo, en los experimentos que se detallan más adelante, las abejas mieleras recibieron rutina 1 mM y quercetina 6 mM. Los abejorros recibieron rutina 1 µM. La dosificación de los otros compuestos fenólicos evaluados también se describen más adelante en los Ejemplos, y dichas dosificaciones se pueden utilizar en las composiciones y los métodos divulgados.

Las cantidades eficaces reales de un agente activo (por ejemplo, un compuesto fenólico) puede variar de acuerdo con factores que incluyen el compuesto fenólico específico, la composición formulada particular, el modo de administración y el peso o

condición del sujeto (por ejemplo, un insecto polinizador) a quien se les administra, así como el parámetro biológico (por ejemplo, aprendizaje, memoria, navegación) evaluado o afectado.

Los flavonoides presentan un efecto hormético (es decir, a menudo las concentraciones bajas son mejores) y las concentraciones altas pueden ser tóxicas. Por lo tanto, típicamente se prefiere una cantidad menor, pero aún una cantidad eficaz, ante una cantidad mayor. Preferiblemente, la cantidad no es tóxica o por lo menos es subletal para los polinizadores, en particular abejas mieleras y/o abejorros.

2. Insectos polinizadores

Las composiciones divulgadas se pueden usar para proteger la función cognitiva de un polinizador (por ejemplo, un insecto polinizador). Por ejemplo, las composiciones se pueden usar para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva (por ejemplo, aprendizaje, memoria, navegación) en un insecto polinizador. La polinización es el proceso por el cual un grano de polen se mueve desde la antera (parte masculina) de una flor hasta el estigma (parte femenina). Este es el primer paso de un proceso que produce semillas, frutos y la siguiente generación de plantas. Esto puede tener lugar mediante una autopolinización, polinización por viento y agua, o por medio del trabajo de vectores (por ejemplo, animales) que mueven el polen dentro de la flor. Notablemente, se estima que entre un 75% y 95% de todas las plantas con flores en todo el mundo necesitan ayuda con la polinización, es decir, necesitan polinizadores (Ollerton J. y col., *Oikos*, 120: 321-326; (2011)).

Muchos cultivos se ven beneficiados por la polinización por animales. Las aves, murciélagos, mariposas, polillas, moscas, escarabajos, avispa, mamíferos pequeños y abejas son polinizadores conocidos. Visitan las flores para beber el néctar o alimentarse del polen y transportan los granos de polen a medida que se mueven de un punto a otro. Los cultivos que se benefician de dichos polinizadores incluyen cultivos de almendras, manzanas, paltas, arándanos azules, canola, melón cantalupa, cerezas, arándanos azules, arándanos rojos, pepinos, kiwis, nectarinas, durazno, pera, pimiento, ciruelas, ciruelas pasas, frambuesas, calabacines (inclusive zapallo y calabaza), frutilla, girasol y tomate; y también cultivos para la producción de semillas, tales como alfalfa, espárrago,

remolacha, coles y otras crucíferas, zanahoria, trébol y cebolla.

En formas de realización preferidas, el polinizador es una especie criada tal como abejas (por ejemplo abejorros, abejas mieleras, abejas calabazas, abejas albañil, abejas sin aguijón, abejas carpinteras, etc.) pero también comprende otras abejas salvajes (abejas de las orquídeas, abejas sudorosas). Adicionalmente o como alternativa, el polinizador incluye o consiste en uno o más insectos polinizadores distintos (por ejemplo mariposas, polillas, moscas, escarabajos, avispa).

Abejas mieleras y abejorros

En algunas formas de realización, el insecto polinizador es un miembro de las familias Apidae (que incluye abejas mieleras y abejorros), Halictidae, Andrenidae, Megachilidae o Colletidae. En formas de realización preferidas, el insecto polinizador es un miembro del género *Apis* dentro de la familia Apidae tal como, pero en un sentido no taxativo, *A. mellifera*, *A. mellifera ligustica*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera caucasica*, *A. mellifera caucasica*, *A. mellifera iberiensis*, *A. mellifera scutellata*, *A. cerana* y *A. dorsata*.

En algunas formas de realización, el insecto polinizador es un abejorro tal como, pero en un sentido no taxativo, abejorro común, abejorro cuco, abejorro de los árboles, abejorro de jardín, abejorro pequeño, abejorro de lengua larga, abejorro de cinturón roto, abejorro de cola blanca, abejorro de cola roja, abejorro temprano, abejorro de tallo rojo y abejorro arándano. En algunas formas de realización, el insecto polinizador es un miembro del género *Bombus* de la familia Apidae tal como, pero en un sentido no taxativo, *Bombus terrestris*, *Bombus impatiens*, *Bombus occidentalis*, *Bombus atratus*, *Bombus vestalis*, *Bombus lucorum*, *Bombus bohemicus*, *Bombus hypnorum*, *Bombus sylvestris*, *Bombus hortorum*, *Bombus barbutellus*, *Bombus jonellus*, *Bombus ruderatus*, *Bombus soroeensis*, *Bombus lapidarius*, *Bombus rupestris*, *Bombus pratorum*, *Bombus ruderarius*, *Bombus monticola*, *Bombus pascuorum*, *Bombus campestris*, *Bombus humilis*, *Bombus muscorum*, *Bombus distinguendus* y *Bombus sylvarum*.

Las composiciones y los métodos divulgados se pueden usar para limitar los efectos perjudiciales de los plaguicidas neurotóxicos en cualquiera de los polinizadores descritos precedentemente.

3. Plaguicidas

Típicamente, el deterioro de una función cognitiva es inducido por la exposición a un plaguicida, por ejemplo, un plaguicida neurotóxico. Por lo tanto, las composiciones divulgadas pueden ser de utilidad para ofrecer protección contra los plaguicidas que son neurotóxicos. Las composiciones divulgadas pueden ser útiles para ofrecer protección contra plaguicidas que pueden afectar adversamente la neurotransmisión colinérgica, GABAérgica o glutamatérgica. En algunas formas de realización, las composiciones divulgadas pueden ser útiles para ofrecer protección contra plaguicidas que son tóxicos para los cuerpos pedunculados (centros más importantes del aprendizaje y la memoria y de integración en el cerebro de los insectos) y los lóbulos antenales (centros más importantes para la integración primaria de la información olfatoria). En algunas formas de realización, las composiciones divulgadas pueden ser útiles para ofrecer protección contra plaguicidas que afectan negativamente la función mitocondrial (por ejemplo, el transporte de electrones, la producción de ATP, el potencial de membranas mitocondriales), el aumento de la apoptosis, el aumento del estrés oxidativo o combinaciones de los mismos en el cerebro, por ejemplo, los cuerpos pedunculados, del insecto polinizador.

Los insecticidas cumplen una función importante en el control de insectos plaga. La mayoría de los insecticidas químicos actualmente en uso son plaguicidas neurotóxicos, y actúan envenenando los sistemas nerviosos de los organismos diana. Los sitios diana de los insecticidas en los insectos también se pueden encontrar en mamíferos, por ende los insecticidas varían en cuanto a sus niveles de selectividad con respecto a las dianas de toxicidad, y los mamíferos, inclusive los humanos, pueden ser sensibles a su toxicidad. Los insecticidas tienen una mayor toxicidad aguda para las especies distintas de las dianas en comparación con otros plaguicidas. Hay varias clases de insecticidas que afectan las terminales pre o postsinápticas (por ejemplo piretroides, neonicotinoides, derivados de sulfomina, fipronilo) así como la dinámica que tiene lugar en la hendidura sináptica (por ejemplo, organofosfatos y carbamatos).

a. Neonicotinoides

En formas de realización preferidas, el deterioro de una función cognitiva es

inducida por la exposición a uno o más plaguicidas que buscan como diana (por ejemplo, son agonistas) al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR). En formas de realización preferidas, el deterioro de una función cognitiva es inducido por la exposición a uno o más neonicotinoides. En formas de realización preferidas, los métodos para controlar insectos plaga comprenden tratar un área con un plaguicida, tal como uno o más neonicotinoides.

La introducción en el mercado a principios de la década de 1990 de imidacloprid y tiacloprid inició la era neonicotinoide del control de insectos plaga. Los neonicotinoides constituyen ahora los plaguicidas más ampliamente utilizados en todo el mundo, con un porcentaje del mercado global de por lo menos un 26% para el mercado de los insecticidas. Dos de ellos —clotianidina y tiametoxam—dominan el mercado global de tratamientos de semillas con insecticidas y se usan para recubrir las semillas de la mayoría de los cultivos anuales sembrados en todo el mundo. De hecho, más del 94% del maíz y más del 30% de la soja sembrada en los EEUU fue pretratada con neonicotinoides. Debido a su acción sistémica, esta clase de insecticidas neurotóxicos es captada por las plantas, primariamente por las raíces, y luego es traslocada a todas las partes de la planta por medio de transporte por el xilema y el floema. Por ello, a diferencia de los plaguicidas más antiguos que se evaporan o dispersan al poco tiempo después de su aplicación, los insecticidas neonicotinoides se incorporan en los tejidos de las plantas, convirtiendo a la propia planta en una pequeña fábrica de veneno que emite toxinas desde sus raíces, hojas, tallos, polen y néctar.

Como lo sugiere su nombre, los neonicotinoides son similares en cuanto a estructura a la nicotina e interactúa con los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) del sistema nervioso central de insectos. Su capacidad para atravesar la barrera impermeable a iones que rodea al sistema nervioso central (BBB, barrera hematoencefálica) y su unión fuerte al nAChR en el sistema nervioso central de las abejas, son responsables de un perfil de toxicidad crónico y subletal único.

Los neonicotinoides actúan fundamentalmente de manera agonista sobre los nAChR sobre la membrana postsináptica, imitando al neurotransmisor natural, acetilcolina, mediante una unión con gran afinidad (Van der Sluijs, JP. y col., *Current*

Opinion in Environmental Sustainability, 5(3-4), 293-305; 2013). Esto induce una hiperexcitación neuronal, que puede conducir a la muerte del insecto en unos pocos minutos. Algunos de los principales metabolitos de los neonicotinoides son igualmente neurotóxicos, que actúan sobre los mismos receptores prolongando de esa manera la efectividad como un insecticida sistémico. Los sitios de unión al nAChR en el sistema nervioso de vertebrados son diferentes de los sitios en los insectos, y en general tienen una cantidad menor de receptores nicotínicos con una gran afinidad por los neonicotinoides, que son las razones por las cuales los neonicotinoides muestran una toxicidad selectiva por los insectos frente a los vertebrados (Van der Sluijs, JP. y col., 2013).

En el momento de su introducción, se suponía que los neonicotinoides eran más eficientes que los organofosfatos y carbamatos a los cuales reemplazaron. Como un tratamiento de semillas, se podían usar en cantidades mucho menores y parecían ser menos contaminantes para el medio ambiente. Sin embargo la cantidad no es relevante sino la potencia para causar daño, que resulta de la toxicidad, persistencia y biodisponibilidad para las especies distintas de la diana. Poco después de la introducción de los neonicotinoides, se volvió evidente la exposición a sus residuos en el polen, néctar, polvillo de siembra, etc., de los insectos polinizadores distintos de la diana.

Los ejemplos de neonicotinoides incluyen imidacloprid, tiacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, nitenpiram, dinotefuran y nitiazina. Hay muchos neonicotinoides disponibles comercialmente, por ejemplo en la forma de varias formulaciones insecticidas. La Tabla 2 provee una lista de ejemplos de neonicotinoides y sus nombres comerciales.

Compuesto	Nombre comercial (productos comerciales)
Imidacloprid	ADMIRE [®] PRO, Advantage [®] o K9 Advantix [®] , ENFORCE 75WSP, IMIDAPRO 4SC, SEPRESTO 75 WS, CONFIDOR SC350
Dinotefurán	ZYLAM [®] , TRANSTECT, SAFARI [®] , VENOM [®]

Clotianidina	ARENA [®] , CLUTCH [®] WDG, PONCHO [®] , SEPRESTO 75 WS
Tiacloprid	CALYPSO, BISCAYA [®]
Tiametoxam	ACTARA [®] , CRUISER [®] , MAXIDE, MERIDIAN [®] , OPTIGARD [®] , DURIVO [®]
Acetamiprid	ASSAIL [®] , RESCATE [®] , TRISTAR [®]

Tabla 2: Lista de ejemplos de productos comerciales que contienen neonicotinoides.

La exposición de los polinizadores a los neonicotinoides puede tener lugar por múltiples vías que incluyen la ingesta, el contacto (por ejemplo, material de anidación contaminado, plantas, tierra, agua) e inhalación (aerosoles). A concentraciones de neonicotinoides bajas se pueden observar efectos subletales. Los efectos subletales involucran modificaciones de la conducta y fisiología de las abejas melíferas (por ejemplo, el sistema inmunológico). No causan la muerte de manera directa del individuo o el colapso de la colonia pero se pueden volver letales en el tiempo y/o pueden volver más sensibles a la colonia (por ejemplo, más propensa a enfermedades), lo cual puede contribuir en su colapso. Por ejemplo, un individuo con deterioro de la memoria, orientación o fisiológico podría evitar su retorno a la colmena, y puede morir de hambre o frío. Se ha informado que hay efectos subletales de los neonicotinoides sobre la neurofisiología, el desarrollo larval, la muda, la longevidad de adultos, la inmunología, fecundidad, proporción de sexos, movilidad, navegación y orientación, la conducta de alimentación, la conducta de oviposición y el aprendizaje.

En algunas formas de realización, puede haber sinergia entre los estresores que afectan negativamente a los insectos polinizadores. El efecto sinérgico se produce cuando el efecto de una combinación de estresores es mayor que la suma de los efectos de cada estresor solo. Cuando los neonicotinoides se combinan con determinados fungicidas (por ejemplo, azoles, tal como procloraz, o anilidas, tal como metalaxilo) u otros agroquímicos que bloquean las enzimas de detoxificación citocromo p450, entonces aumenta la toxicidad en un factor de entre 1,52 y 1141 dependiendo de la combinación. También se ha demostrado sinergia para los neonicotinoides y los agentes

infecciosos. Una exposición prolongada a una dosis no letal de neonicotinoides vuelve a las colmenas de las abejas más susceptibles a los parásitos, tal como *Nosema ceranae*. Por ello, en algunas formas de realización, las composiciones divulgadas pueden ser de utilidad para ofrecer protección contra los efectos sinérgicos de plaguicidas y otros estresores del polinizador (por ejemplo, parásitos).

b. Carbamatos y organofosfatos

El deterioro de una función cognitiva puede ser inducida por la exposición a un carbamato u organofosfato. Por lo tanto, las composiciones divulgadas también pueden ser útiles para ofrecer protección contra los efectos cognitivos perjudiciales producidos por uno o más carbamatos u organofosfatos. En algunas formas de realización, el plaguicida es un carbamato o un organofosfato.

Los organofosfatos comprenden ésteres de ácido fosfórico o ésteres de ácido tiofosfórico. Cuando fueron desarrollados en las décadas de 1930 y 1940, los compuestos originales eran altamente tóxicos para mamíferos. Los organofosfatos elaborados desde entonces son menos tóxicos para mamíferos pero tóxicos para los organismos diana, tales como insectos. Los ejemplos de organofosfatos comprenden malatión, dibromo, clorpirifos, temefos, diazinona y terbufos.

Los carbamatos comprenden ésteres del ácido N-metilcarbámico. Los ejemplos de carbamatos comprenden aldicarb, carbarilo, propoxur, oxamilo y terbucarb. Los carbamatos son estructural y mecanísticamente similares a los insecticidas de organofosfatos pero difieren en su acción de los organofosfatos en que en general es breve el efecto inhibidor sobre la colinesterasa.

Aunque los plaguicidas de carbamato y organofosfato difieren químicamente, actúan de manera similar. Cuando se aplican a cultivos o directamente al suelo como insecticidas sistémicos, los organofosfatos y carbamatos en general persisten entre unos pocos y varios meses. Los organofosfatos y carbamatos son inhibidores potentes de la acetilcolinesterasa, con lo cual inhiben la degradación normal de la acetilcolina (ACh). La ACh es un neurotransmisor, una sustancia química producida por una neurona que transmite señales desde dicha neurona a otra neurona, una glándula exócrina o un músculo. Cabe destacar que en tanto la ACh prevalece como un neurotransmisor en la

unión neuromuscular en vertebrados con menos prevalencia en el sistema nervioso central, es el principal neurotransmisor en el sistema nervioso de los invertebrados. La ACh es liberada en la unión (sinapsis) entre dos células (una neurona y un músculo o dos neuronas) donde se une a su receptor sobre la célula diana (la terminal postsináptica), induciendo su activación y transmitiendo la señal. La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima ubicada en el espacio intercelular que es responsable de la degradación de ACh. Los organofosfatos y carbamatos bloquean el sitio donde el neurotransmisor se une a la acetilcolinesterasa lo que conduce a la acumulación de ACh y a la estimulación continua de los receptores sobre las células diana. En vertebrados, esto da como resultado una sobreestimulación parasimpática y simpática y una eventual parálisis muscular. La sobreestimulación también es subyacente de los efectos en invertebrados.

c. Fipronilo

En algunas formas de realización el plaguicida es fipronilo. La diana del fipronilo comprende dos receptores importantes en el cerebro de los insectos. El fipronilo se puede unir a los receptores de GABA o a los receptores ionotrópicos de glutamato (canales de cloro). GABA es un neurotransmisor que activa los canales de cloro, por consiguiente induce una hiperpolarización (es decir, vuelven más negativa a la membrana de la neurona) y deprime la actividad neural. Por otro lado, una población de receptores ionotrópicos de glutamato en el cerebro de los insectos puede permitir el movimiento de cloro, lo cual también conduce a una hiperpolarización. Por consiguiente, estas redes actúan como moduladores de la actividad durante el procesamiento de la información. Dado que el fipronilo busca como blanco a los receptores GABAérgicos y glutamatérgicos actúa, a diferencia de otros plaguicidas, sobre las redes inhibitoras, no excitatorias. El fipronilo puede afectar la red dopaminérgica y por consiguiente el control motor y el valor asignado a una recompensa. Los efectos del fipronilo incluyen deterioro mitocondrial, interrumpiendo el procesamiento de la información.

d. Derivados de sulfoximina

En algunas formas de realización los plaguicidas comprenden un derivado de

sulfoxaminas, tal como sulfoxaflor. De manera similar a los neonicotinoides, el sulfoxaflor busca como diana a los receptores nicotínicos colinérgicos (nAChR), siendo un agonista competidor de la ACh. Los principales deterioros a niveles subletales incluyen el control motor y la reproducción.

C. Controles

Los métodos divulgados en la presente típicamente incluyen la comparación del nivel de un parámetro biológico en el sujeto polinizador con un control. Los controles adecuados son conocidos por un experto en la materia. Los controles pueden incluir, por ejemplo, los estándares obtenidos de sujetos que no fueron expuestos a las composiciones que contienen uno o más compuestos fenólicos. Los controles también pueden incluir el nivel de un parámetro biológico en un punto de referencia específico, por ejemplo, antes de la administración de las composiciones que contienen uno o más compuestos fenólicos. Un control puede comprender un solo valor o valores agrupados o promediados evaluados/ensayados de manera equivalente al sujeto experimental. Los índices de referencia se pueden establecer usando polinizadores que han estado expuestos a uno o más plaguicidas y que exhiben uno o más deterioros cognitivos con diferentes severidades o pronósticos conocidos.

D. Métodos de elaboración

Se proveen métodos para la producción de las composiciones divulgadas que incluyen alimentos, aditivos o suplementos alimenticios y nutracéuticos. Los ejemplos de alimentos incluyen alimentos para abejas mieleras (por ejemplo, jarabe de azúcar, tortas). Los métodos pueden incluir los pasos de incorporar uno o más de los compuestos fenólicos en el producto alimenticio o el producto de suplemento alimenticio durante la preparación del alimento o suplemento. Un alimento para animales o un suplemento alimenticio para usar en los métodos que se describen en la presente puede incluir uno o más compuestos fenólicos, proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales, agua, otros nutrientes o ingredientes, o combinaciones de los mismos.

Dichos uno o más compuestos fenólicos se pueden incorporar en el producto alimenticio en cualquier etapa durante el proceso de producción incluyendo antes de

uno o más pasos de calentamiento o pasos de mezclado.

Los siguientes procesos se pueden usar solos o combinados, según necesidad, para proveer las composiciones y formulaciones divulgadas: agitación, mezclado, reducción del tamaño y calentamiento. Los ingredientes secos se pueden mezclar y combinar en una mezcladora/batidora de gran velocidad para lograr un mezclado completo y una reducción del tamaño de las partículas. El mezclado se lleva a cabo de manera suficiente como para que los componentes se conviertan en una forma bien dispersa que estará disponible de una manera sustancialmente homogénea. Si se deseara, la reducción del tamaño se lleva a cabo de manera suficiente como para que los componentes sean de un tamaño y forma tal que permanezcan suspendidos en la formulación final y sean de un tamaño aceptable para las piezas bucales de un insecto, por ejemplo, una abeja. En los casos donde los ingredientes de la fuente no son mayores que aproximadamente 35 micrones, no sería necesaria una reducción del tamaño. El calentamiento puede servir para aumentar la digestibilidad y absorción potencial de componentes tales como proteínas y para destruir a los microorganismos, en especial aquellos que se encuentran en las fases vegetativas de su ciclo de vida. Preferiblemente el calentamiento se lleva a cabo de manera suficiente como para lograr lo mencionado pero insuficiente para causar una destrucción o degradación excesiva de los nutrientes. Los parámetros de mezclado y calentamiento para un conjunto de circunstancias particular pueden ser determinados fácilmente mediante experimentos de rutina. En algunas formas de realización, las formulaciones secas y/o sólidas se mezclan con agua o formulaciones líquidas para proporcionar el producto alimenticio final.

Las composiciones divulgadas y los métodos de uso de las mismas se comprenderán adicionalmente en los siguientes párrafos numerados.

1. Una composición adecuada para su administración o ingesta por un insecto polinizador que comprende uno o más compuestos fenólicos en una cantidad eficaz para ofrecer protección contra el deterioro de una función cognitiva de dicho insecto polinizador.

2. La composición del párrafo 1 que además comprende una fuente de carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, agua o combinaciones de los

mismos.

3. La composición del párrafo 2, en donde la fuente es néctar natural o artificial, miel, azúcar, jarabe de azúcar, polen o sustituto de polen, harina de soja, fécula de soja, gluten, leche descremada, levadura, podas, aceite o combinaciones de los mismos.

4. La composición del párrafo 2, en donde la fuente se selecciona del grupo que comprende AP23[®], BEE-PRO[®], FEEDBEE, MEGABEE y ULTRA BEE.

5. La composición de cualquiera de los párrafos 1-4, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos comprende uno o más flavonoides, ácido p-coumárico o una combinación de los mismos.

6. La composición del párrafo 5, en donde el flavonoide se selecciona del grupo que comprende flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, flavanoles (catequinas), chalconas y neoflavonoides.

7. La composición del párrafo 6, en donde el flavonol se selecciona entre quercetina, rutina, miricetina, kaempferol, fisetina, morina, isorhamnetina y derivados o variantes de los mismos.

8. La composición de cualquiera de los párrafos 1-7, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos se selecciona entre los compuestos de la Tabla 1 (por ejemplo, isoquercetina, rutina, quercetina, quercitrina, hiperósido, quercimeritrina, baimaside, querciturona, 3-O-metilquercetina, quercetina 3-sambubiósido, miquelianina, espiraeósido, isorhamnetina, quercetina 3'-O-sulfato, quercetina 7-O-glucósido, quercetina 3-O-rhamnosida, quercetina 3,4'-diglucósido, y quercetina 3-soforotriósido) y combinaciones de los mismos.

9. La composición del párrafo 7, en donde el flavonol es quercetina, rutina o una combinación de las mismas.

10. La composición de cualquiera de los párrafos 1-9, para usar como un alimento, aditivo o suplemento alimenticio o nutracéutico.

11. La composición de cualquiera de los párrafos 1-10, en donde el insecto polinizador comprende mariposas, polillas, moscas, escarabajos, avispas o abejas.

12. La composición del párrafo 11, en donde la abeja se selecciona entre

abejas mieleras, abejorros, abejas carpinteras, abejas cortadoras de hojas, abejas de arándano, abejas calabaza, abejas albañil, abejas de las orquídeas, abejas sin aguijón o abejas sudorosas.

13. La composición de cualquiera de los párrafos 1-12, en donde la función cognitiva se selecciona entre el aprendizaje, la memoria, la atención, la precisión de decisiones, la velocidad de decisión, la navegación, actividad motora, sensibilidad a la sacarosa y combinaciones de los mismos.

14. La composición de cualquiera de los párrafos 1-13, en donde el deterioro es inducido por la exposición a un plaguicida.

15. La composición del párrafo 14, en donde el plaguicida es neurotóxico.

16. La composición del párrafo 14 o 15, en donde el plaguicida afecta adversamente la neurotransmisión GABAérgica o glutamatérgica, los cuerpos pedunculados, los lóbulos antenales, los lóbulos ópticos o la función mitocondrial; aumenta la apoptosis; aumenta el estrés oxidativo; o combinaciones de los mismos en el polinizador.

17. La composición de cualquiera de los párrafos 14-16, en donde el plaguicida busca como diana al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

18. La composición de cualquiera de los párrafos 14-17, en donde el plaguicida es un neonicotinoide seleccionado del grupo que consiste en imidacloprid, tiacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, nitenpiram, dinotefuran y nitiazina.

19. Un método para proteger la función cognitiva de un insecto polinizador, donde dicho método comprende administrar a un insecto polinizador que lo necesita una composición de cualquiera de los párrafos 1-18.

20. Un método para proteger las capacidades de aprendizaje y/o de memoria de un insecto polinizador, que comprende administrar al insecto polinizador una composición de cualquiera de los párrafos 1-18.

21. Un método para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva en un insecto polinizador, que comprende administrar al insecto polinizador una composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva en dicho insecto

polinizador.

22. Un método para controlar insectos plaga que comprende tratar un área ocupada por insectos plaga e insectos polinizadores con un plaguicida, y administrar al insecto polinizador una composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva y/o para aumentar una función cognitiva en el insecto polinizador.

23. El método del párrafo 22, en donde el área es tratada con el plaguicida antes de administrar la composición a los insectos polinizadores.

24. El método del párrafo 22, en donde el área es tratada con el plaguicida después de administrar la composición a los insectos polinizadores.

25. El método de cualquiera de los párrafos 22-24, en donde el área es tratada con una cantidad eficaz de un plaguicida para reducir la cantidad de insectos plaga en el área.

26. El método de cualquiera de los párrafos 22-25, en donde el plaguicida es letal para los insectos plaga.

27. El método de cualquiera de los párrafos 22-26, en donde el área es tratada con una cantidad de plaguicida que es subletal para los insectos polinizadores.

28. El método de cualquiera de los párrafos 20-25, en donde el insecto plaga se seleccionan del grupo que consiste en áfidos, ácaros, trips, moscas blancas, saltadores de las hojas, gusanos de la harina, chinches espumosas, pulgas, termitas, cochinillas y escarabajos.

29. El método de cualquiera de los párrafos 20-27, en donde el área es tratada con un plaguicida mediante aplicación foliar, inyección en el suelo, inyección en árboles, aplicación terrestre como una formulación granulada o líquida, o como un tratamiento de semillas recubiertas con plaguicida.

30. El método de cualquiera de los párrafos 21-29, en donde la función cognitiva se selecciona entre el aprendizaje, la memoria, la atención, la precisión de decisiones, la velocidad de decisión, la navegación, actividad motora, sensibilidad a la sacarosa y combinaciones de los mismos.

31. El método de cualquiera de los párrafos 21-30, en donde la cantidad de la

composición administrada es eficaz para prevenir o reducir la pérdida o reducción de la memoria, el aprendizaje, la atención, la precisión de decisiones, la velocidad de decisión, las habilidades de navegación, la actividad motora o una combinación de los mismos en el insecto polinizador tras la exposición a un plaguicida.

32. El método de cualquiera de los párrafos 21-30, en donde la cantidad administrada es eficaz para prevenir o reducir la pérdida o reducción de la memoria, el aprendizaje, las habilidades de navegación, la actividad motora o combinaciones de los mismos en el insecto polinizador en comparación con un insecto polinizador a quien no se le había administrado la composición.

33. El método de cualquiera de los párrafos 21-32, en donde la cantidad administrada es eficaz para prevenir o reducir una disfunción mitocondrial, apoptosis y/o estrés oxidativo en el cerebro.

34. El método del párrafo 33, en donde la cantidad administrada es eficaz para prevenir o reducir una disfunción mitocondrial, apoptosis y/o estrés oxidativo en los cuerpos pedunculados.

35. El método de cualquiera de los párrafos 21-34, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos comprende uno o más flavonoides, ácido p-coumárico o una combinación de los mismos.

36. El método del párrafo 35, en donde el flavonoide se selecciona del grupo que comprende flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, flavanoles (catequinas), chalconas y neoflavonoides.

37. El método del párrafo 36, en donde el flavonol se selecciona entre quercetina, rutina, miricetina, kaempferol, fisetina, morina, isorhamnetina y derivados o variantes de los mismos.

38. El método de cualquiera de los párrafos 21-37, en donde el deterioro es inducido por la exposición a un plaguicida.

39. El método del párrafo 38, en donde el plaguicida se encuentra como una dosis subletal.

40. El método de cualquiera de los párrafos 21-22 y 24-39, en donde la exposición al plaguicida tiene lugar después de la administración de la composición.

41. El método de cualquiera de los párrafos 38-40, en donde el plaguicida es neurotóxico.

42. El método de cualquiera de los párrafos 38-41, en donde el plaguicida afecta adversamente la neurotransmisión GABAérgica o glutamatérgica o la función de los cuerpos pedunculados; aumenta una disfunción mitocondrial, apoptosis o estrés oxidativo en el cerebro; o combinaciones de los mismos.

43. El método de cualquiera de los párrafos 38-42, en donde el plaguicida busca como diana al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

44. El método de cualquiera de los párrafos 38-43, en donde el plaguicida es un neonicotinoide seleccionado del grupo que consiste en imidacloprid, tiacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, nitenpiram, dinotefuran y nitiazina.

45. El método de cualquiera de los párrafos 38-41, en donde el plaguicida es fipronilo, carbamato, un organofosfato, un derivado de sulfoxamina o un piretroide, opcionalmente en donde el piretroide es deltametrina.

46. El método de cualquiera de los párrafos 21-45, en donde el insecto polinizador comprende mariposas, polillas, moscas, escarabajos, avispa o abejas.

47. El método del párrafo 46, en donde la abeja se selecciona entre abejas mieleras, abejorros, abejas carpinteras, abejas cortadoras de hojas, abejas de arándano, abejas calabaza, abejas albañil, abejas sin aguijón, abejas de las orquídeas o abejas sudorosas.

48. El método de cualquiera de los párrafos 21-47, en donde la composición es un alimento, un aditivo o suplemento alimenticio o un nutraceutico.

49. El método del párrafo 48, en donde la composición se administra por medio de la ingesta.

50. El método de cualquiera de los párrafos 21-49, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos se selecciona entre los compuestos de la Tabla 1 (por ejemplo, isoquercetina, rutina, quercetina, quercitrina, hiperósido, quercimeritrina, baimaside, querciturona, 3-O-metilquercetina, quercetina 3-sambubiósido, miquelianina, espiraeósido, isorhamnetina, quercetina 3'-O-sulfato, quercetina 7-O-glucósido, quercetina 3-O-rhamnosida, quercetina 3,4'-diglucósido, y quercetina 3-

soforotriósido) y combinaciones de los mismos.

51. Un método para proteger insectos polinizadores contra un plaguicida, donde dicho método comprende administrar a los insectos polinizadores una composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva y/o aumentar una función cognitiva en el insecto polinizador después de la exposición a un plaguicida.

52. El método del párrafo 51, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos comprende uno o más flavonoides, ácido p-coumárico o una combinación de los mismos.

53. El método del párrafo 52, en donde el flavonoide se selecciona del grupo que comprende flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, flavanoles (catequinas), chalconas y neoflavonoides.

54. El método del párrafo 53, en donde el flavonoide es un favonol.

55. El método de cualquiera de los párrafos 51-54, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos se selecciona entre quercetina, rutina, miricetina, kaempferol, fisetina, morina, isorhamnetina, ácido p-coumárico y derivados o variantes de los mismos, y combinaciones de los mismos.

56. El método de cualquiera de los párrafos 51-54, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos se selecciona entre los compuestos de la Tabla 1 (por ejemplo, isoquercetina, rutina, quercetina, quercitrina, hiperósido, quercimeritrina, baimaside, querciturona, 3-O-metilquercetina, quercetina 3-sambubiósido, miquelianina, espiraeósido, isorhamnetina, quercetina 3'-O-sulfato, quercetina 7-O-glucósido, quercetina 3-O-rhamnosida, quercetina 3,4'-diglucósido, y quercetina 3-soforotriósido) y combinaciones de los mismos.

57. El método de cualquiera de los párrafos 51-55, en donde un área ocupada por los insectos polinizadores ha sido o será tratada con un plaguicida.

58. El método del párrafo 57, en donde el área ocupada por los insectos polinizadores también está ocupada por insectos plaga.

59. El método de cualquiera de los párrafos 51-58, que además comprende tratar el área ocupada por los insectos polinizadores con el plaguicida.

60. El método de cualquiera de los párrafos 57-59, en donde el área ocupada por los insectos polinizadores es tratada con el plaguicida antes de administrar la composición a los insectos polinizadores.

61. El método de cualquiera de los párrafos 57-59, en donde el área ocupada por los insectos polinizadores es tratada con el plaguicida después de administrar la composición a los insectos polinizadores.

62. El método de cualquiera de los párrafos 57-61, en donde se administra la composición a los insectos polinizadores en la misma área que fue tratada con el plaguicida.

63. El método de cualquiera de los párrafos 57-61, en donde se administra la composición a los insectos polinizadores en un área separada del plaguicida.

64. El método de cualquiera de los párrafos 57-63, en donde el área es tratada con una cantidad eficaz de plaguicida para reducir la cantidad de insectos plaga en el área.

65. El método de cualquiera de los párrafos 57-64, en donde el plaguicida es letal para los insectos plaga.

66. El método de cualquiera de los párrafos 57-65, en donde el área es tratada con una cantidad de plaguicida que es subletal para los insectos polinizadores.

67. El método de cualquiera de los párrafos 51-66, en donde los insectos plaga se seleccionan del grupo que consiste en áfidos, ácaros, trips, moscas blancas, saltadores de las hojas, gusanos de la harina, chinches espumosas, pulgas, termitas, cochinillas, escarabajos y combinaciones de los mismos.

68. El método de cualquiera de los párrafos 51-67, en donde los insectos polinizadores se seleccionan entre mariposas, polillas, moscas, escarabajos, avispas, abejas y una combinación de los mismos.

69. El método del párrafo 68, en donde las abejas se seleccionan entre abejas mieleras, abejorros, abejas carpinteras, abejas cortadoras de hojas, abejas de arándano, abejas calabaza, abejas albañil, abejas sin aguijón, abejas de las orquídeas, abejas sudorosas y combinaciones de las mismas.

70. El método de cualquiera de los párrafos 51-69, en donde la función

cognitiva se selecciona entre el aprendizaje, la memoria, la atención, la precisión de decisiones, la velocidad de decisión, la navegación, actividad motora, sensibilidad a la sacarosa y combinaciones de los mismos.

71. El método de cualquiera de los párrafos 51-70, en donde la cantidad de la composición administrada es eficaz para prevenir o reducir una pérdida o reducción de la memoria, el aprendizaje, la atención, la precisión de decisiones, la velocidad de decisión, las habilidades de navegación, la actividad motora o una combinación de los mismos en el insecto polinizador tras la exposición a un plaguicida.

72. El método de cualquiera de los párrafos 51-71, en donde la cantidad administrada es eficaz para prevenir o reducir la pérdida o reducción de la memoria, el aprendizaje, las habilidades de navegación, la actividad motora o combinaciones de los mismos en el insecto polinizador en comparación con un insecto polinizador a quien no se le había administrado la composición.

73. El método de cualquiera de los párrafos 51-72, en donde la cantidad administrada es eficaz para prevenir o reducir una disfunción mitocondrial, apoptosis y/o estrés oxidativo en el cerebro.

74. El método de cualquiera de los párrafos 51-73, en donde la cantidad administrada es eficaz para prevenir o reducir una disfunción mitocondrial, apoptosis y/o estrés oxidativo en los cuerpos pedunculados.

75. El método de cualquiera de los párrafos 51-74, en donde el deterioro es inducido por la exposición al plaguicida.

76. El método de cualquiera de los párrafos 51-75, en donde el plaguicida se encuentra como una dosis subletal.

77. El método de cualquiera de los párrafos 51-76, en donde el plaguicida es neurotóxico para los insectos polinizadores.

78. El método de cualquiera de los párrafos 51-77, en donde el plaguicida afecta adversamente la neurotransmisión GABAérgica o glutamatérgica o la función de los cuerpos pedunculados; aumenta una disfunción mitocondrial, apoptosis o estrés oxidativo en el cerebro; o combinaciones de los mismos.

79. El método de cualquiera de los párrafos 51-77, en donde el plaguicida

busca como diana al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

80. El método de cualquiera de los párrafos 51-79, en donde el plaguicida es un neonicotinoide.

81. El método de cualquiera de los párrafos 51-80, en donde el plaguicida es imidacloprid, tiacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, nitenpiram, dinotefuran, nitiazina, fipronilo, carbamato, un organofosfato, un derivado de sulfoxamina o un piretroide, opcionalmente en donde el piretroide es deltametrina.

82. El método de cualquiera de los párrafos 51-81, en donde la exposición al plaguicida tiene lugar después de la administración de la composición.

83. El método de cualquiera de los párrafos 51-82, en donde la composición es un alimento, un aditivo o suplemento alimenticio o un nutracéutico.

84. El método de cualquiera de los párrafos 51-83, en donde la composición se administra por medio de la ingesta.

85. El método de cualquiera de los párrafos 51-84, en donde el plaguicida es administrado mediante aplicación foliar, inyección en el suelo, inyección en árboles, aplicación terrestre como una formulación granulada o líquida, o como un tratamiento de semillas recubiertas con plaguicida.

86. El método de cualquiera de los párrafos 51-85, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos comprenden quercetina, rutina, kaempferol, ácido p-coumárico o una combinación de los mismos.

87. Una composición adecuada para su administración o ingesta por un insecto polinizador que comprende uno o más compuestos fenólicos en una cantidad eficaz para ofrecer protección contra el deterioro de una función cognitiva de dicho insecto polinizador.

88. La composición del párrafo 87 que además comprende una fuente de carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, agua o combinaciones de los mismos.

89. La composición del párrafo 88, en donde la fuente es néctar natural o artificial, miel, azúcar, jarabe de azúcar, polen o sustituto de polen, harina de soja, fécula de soja, gluten, leche descremada, levadura, podas, aceite o combinaciones de los

mismos.

90. La composición de los párrafos 88 o 89, en donde la fuente se selecciona del grupo que comprende AP23[®], BEE-PRO[®], FEEDBEE, MEGABEE y ULTRA BEE.

91. La composición de cualquiera de los párrafos 87-90, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos comprende uno o más flavonoides, ácido p-coumárico o una combinación de los mismos.

92. La composición del párrafo 91, en donde el flavonoide se selecciona del grupo que comprende flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, flavanoles (catequinas), chalconas y neoflavonoides.

93. La composición del párrafo 92, en donde el flavonol se selecciona entre quercetina, rutina, miricetina, kaempferol, fisetina, morina, isorhamnetina y derivados o variantes de los mismos.

94. La composición de cualquiera de los párrafos 87-93, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos se selecciona entre los compuestos de la Tabla 1 (por ejemplo, isoquercetina, rutina, quercetina, quercitrina, hiperósido, quercimeritrina, baimaside, querciturona, 3-O-metilquercetina, quercetina 3-sambubiósido, miquelianina, espiraeósido, isorhamnetina, quercetina 3'-O-sulfato, quercetina 7-O-glucósido, quercetina 3-O-rhamnosida, quercetina 3,4'-diglucósido, y quercetina 3-soforotriósido) y combinaciones de los mismos.

95. La composición de cualquiera de los párrafos 87-94, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos se selecciona entre quercetina, rutina, miricetina, kaempferol, fisetina, morina, isorhamnetina, ácido p-coumárico y derivados o variantes de los mismos, y combinaciones de los mismos.

96. La composición de cualquiera de los párrafos 87-95, para usar como un alimento, un aditivo o suplemento alimenticio o un nutracéutico.

97. La composición de cualquiera de los párrafos 87-96, en donde el insecto polinizador comprende mariposas, polillas, moscas, escarabajos, avispa o abejas.

98. La composición de cualquiera de los párrafos 87-97, en donde la abeja se selecciona entre abejas mieleras, abejorros, abejas carpinteras, abejas cortadoras de hojas, abejas de arándano, abejas calabaza, abejas albañil, abejas de las orquídeas,

abejas sin aguijón o abejas sudorosas.

99. La composición de cualquiera de los párrafos 87-98, en donde la función cognitiva se selecciona entre el aprendizaje, la memoria, la atención, la precisión de decisiones, la velocidad de decisión, la navegación, actividad motora, sensibilidad a la sacarosa y combinaciones de los mismos.

100. La composición de cualquiera de los párrafos 87-99, en donde el deterioro es inducido por la exposición a un plaguicida.

101. La composición de cualquiera de los párrafos 87-100, en donde el plaguicida es neurotóxico.

102. La composición de cualquiera de los párrafos 87-101, en donde el plaguicida afecta adversamente la neurotransmisión GABAérgica o glutamatérgica, los cuerpos pedunculados, los lóbulos antenales, los lóbulos ópticos o la función mitocondrial; aumenta la apoptosis; aumenta el estrés oxidativo; o combinaciones de los mismos, en el polinizador.

103. La composición de cualquiera de los párrafos 87-102, en donde el plaguicida busca como diana al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

104. La composición de cualquiera de los párrafos 87-103, en donde el plaguicida es un neonicotinoide.

105. La composición de cualquiera de los párrafos 87-104, en donde el plaguicida es imidacloprid, tiacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, nitenpiram, dinotefuran, nitiazina, fipronilo, carbamato, un organofosfato, un derivado de sulfloxamina o un piretroide, opcionalmente en donde el piretroide es deltametrina.

106. Un método para proteger la función cognitiva de un insecto polinizador, donde dicho método comprende administrar a un insecto polinizador que lo necesita una composición de cualquiera de los párrafos 87-105.

107. Un método para proteger las capacidades de aprendizaje y/o de memoria de un insecto polinizador, que comprende administrar al insecto polinizador una composición de cualquiera de los párrafos 87-106.

108. Un método para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva en un insecto polinizador, que comprende administrar al insecto polinizador una

composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más compuestos fenólicos para prevenir o reducir el deterioro de una función cognitiva en dicho insecto polinizador.

109. La composición o el método de cualquiera de los párrafos 1-108, en donde dichos uno o más compuestos fenólicos comprenden quercetina, rutina, kaempferol ácido p-coumárico o una combinación de los mismos.

La presente invención se comprenderá además con referencia a los siguientes ejemplos no taxativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Los flavonoides mejoran el aprendizaje y la memoria y protegen a las abejas mieleras contra el deterioro inducido por neonicotinoides

Materiales y métodos

Recolección y mantenimiento de abejas mieleras

Se capturaron abejas mieleras (*Apis mellifera scutellata*) de colmenas establecidas en el apiario de la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia). Se recolectaron forrajeras y se las dejó forrajear entre las 8:00 am y las 10:00 am (Matsumoto y col., *J Neurosci Methods*; 211(1): 159-67. 2012). Las abejas se mantuvieron en cámaras de plástico individuales en condiciones de laboratorio (el fotoperíodo siguió un patrón estacional; humedad relativa: 63%; temperatura: 18 °C). El alimento se suministró una vez por día en un volumen de 20 µl y la composición varió de acuerdo con los tratamientos experimentales.

Tratamientos experimentales con abejas mieleras

Las abejas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos:

- Control (agua azucarada 2 M): suministrado una vez por día (20 µl) durante tres días consecutivos;
- Quercetina (quercetina 6,6 mM (Sigma-Aldrich: Q4951)-agua con sacarosa con 1% de DMSO (Sigma-Aldrich: D8418): suministrado una vez por día durante tres días;
- Rutina (rutina 1 mM (Sigma-Aldrich R5143)-agua con sacarosa con 1% de DMSO: suministrado una vez por día durante tres días;
- Imidacloprid (imidacloprid 1,16 nM (Bayer)-agua con sacarosa: Suministrada

como una sola dosis (20 µl) 1,5 h antes del entrenamiento;

- Quercetina-imidacloprid: las abejas recibieron el tratamiento con quercetina (véase precedentemente) y fueron alimentadas con imidacloprid 1,5 h antes del entrenamiento; y

- Rutina-imidacloprid: las abejas recibieron el tratamiento con rutina (véase precedentemente) y fueron alimentadas con imidacloprid 1,5 h antes del entrenamiento.

Entrenamiento

Las abejas fueron entrenadas usando el condicionamiento clásico de respuesta de extensión de la probóscide (PER), un método utilizado ampliamente para estudiar el aprendizaje y la memoria en abejas. Brevemente, las abejas recibieron una corriente suave de aire limpio durante 15 segundos para permitir que las abejas se adaptaran. Luego se inyectó una corriente suave de 1-hexanol (Sigma-Aldrich: 471402) durante 10 segundos. Seis segundos después de la inyección de 1-hexanol, se estimuló una de las antenas con agua con sacarosa (50% p/p), que conduce a la extensión refleja de la probóscide, y se dejó que las abejas bebieran durante 4 segundos. De esta manera, la recompensa y el estímulo se superpusieron durante cuatro segundos. Esta secuencia, reconocida como una prueba de entrenamiento, se repitió ocho veces. El tiempo se determinó usando un metrónomo (2 Hz). La retención de la memoria se evaluó 24 horas después de las ocho pruebas de entrenamiento. Durante cada prueba, se registró si las abejas extendieron la probóscide tan solo con la presentación de 1-hexanol y el tiempo hasta que exhibieron la respuesta. Se entrenaron 12 abejas en cada sesión. El entrenamiento fue realizado por un investigador ciego al tratamiento.

Recolección de datos y análisis estadístico

El aprendizaje se evaluó con la cantidad total de respuestas condicionadas en las ocho pruebas. Por lo tanto, cada abeja recibió un puntaje de aprendizaje de entre 0-7 (por definición, las abejas no pueden mostrar una respuesta aprendida en la primera prueba). Después de 24 h, se evaluó la retención de la memoria como la respuesta a la presentación de 1-hexanol sin una recompensa de sacarosa. La latencia de respuesta se cuantificó como el tiempo entre el inicio de la estimulación con 1-hexanol y el inicio de una respuesta que conducía a la extensión completa de la probóscide. Solo se

consideraron las abejas que respondieron al agua con sacarosa en todas las pruebas de entrenamiento y la prueba de retención de la memoria para los análisis. Se compararon los puntajes de aprendizaje de todos los tratamientos usando una prueba de Mann-Whitney ya que los datos no mostraron una distribución normal (prueba W de Shapiro-Wilk para la hipótesis que los datos son de una distribución normal: $P < 0,05$ para todos los tratamientos). Se condujeron comparaciones del puntaje de aprendizaje de las abejas de todos los tratamientos con relación a las abejas Control usando el método Steel ajustado como pruebas de una o dos colas. Se condujeron comparaciones *post hoc* adicionales entre abejas Imid y Quer+Imid y entre abejas Imid y Rut+Imid. Se comparó la retención de la memoria en todos los grupos usando una prueba general de Chi cuadrado y se realizaron pruebas independientes para las comparaciones planificadas usando pruebas de Wald ajustadas para las proporciones. En todos los casos se controló el error debido a comparaciones múltiples usando el método de una etapa de Índice de Falsos Descubrimientos y se muestran los valores p ajustados (valores q) (Benjamini & Hochberg, *Journal of the Royal Statistical Society; Series B (Methodological)*, 57(1): 289-300. 1995; Pike, N., *Methods in Ecology and Evolution*, 2(3): 278-282; 2011). Todos los análisis se condujeron usando JMP v. 14.0 (SAS Institute Inc).

Resultados

Se investigó el efecto protector de dos flavonoides, quercetina y rutina, contra los efectos negativos del neonicotinoide, imidacloprid, en abejas mieleras.

Se evaluó el desempeño de adquisición y retención de la memoria de las abejas mieleras expuestas a imidacloprid, y de abejas mieleras tratadas profilácticamente con quercetina y su derivado, rutina. Durante el primer día, las abejas fueron asignadas aleatoriamente a uno de tres tratamientos: abejas alimentadas con una sola dosis diaria de agua azucarada y abejas alimentadas con una sola dosis diaria de ya sea quercetina o rutina. El cuarto día de este programa, las abejas de cada grupo fueron asignadas aleatoriamente a uno de los dos tratamientos 1,5 horas antes del entrenamiento: abejas alimentadas con agua azucarada y abejas alimentadas con una solución de imidacloprid. Por lo tanto, se compararon seis condiciones de tratamiento: Control (solo recibieron agua con sacarosa), quercetina (Quer), rutina (Rut), quercetina+imidacloprid

(Quer+imid), rutina+imidacloprid (Rut+imid) e imidacloprid (Imid).

Para el aprendizaje y la retención, las abejas fueron evaluadas usando el condicionamiento clásico de la respuesta de extensión de la probóscide (PER), un método utilizado ampliamente para estudiar la cognición de abejas mieleras (Takeda, *J. Insect. Physiol.*, 6: 168–179. 1961; Bitterman, *J. Comp. Psychol.*, 97: 107–119; 1983). Brevemente, un investigador ciego para las asignaciones de tratamiento, entrenó a las ocho presentaciones apareadas de un estímulo (1-hexanol) y una recompensa (agua azucarada). En las presentaciones, las abejas que aprendían la asociación exhibieron una PER después de la simple presentación del estímulo entrenado (una PER ‘condicionada’). Después de 24 horas, las abejas fueron evaluadas por su respuesta a la presentación del estímulo único, evaluando de esa manera la retención de la asociación aprendida. Por ende, las abejas con los mejores desempeños deberían exhibir más PER condicionadas durante el entrenamiento y exhibir una respuesta PER condicionada después de 24 horas.

Se encontró un efecto significativo del tratamiento sobre la adquisición del aprendizaje (prueba de Kruskal-Wallis: $X_5 = 114,74$, $p < 0,0001$; Figura 1A) y la retención de la memoria (Relación de probabilidad: $X_5 = 71,26$, $p < 0,0001$; Figura 1B). Las abejas que recibieron quercetina y rutina mostraron puntajes de aprendizaje significativamente más altos (Rut: $Z = 4,23$, $q = 0,0002$; Quer: $Z = 3,52$, $q = 0,003$) pero no de puntajes de retención de la memoria que las abejas Control (prueba de Wald ajustada: Rut: Diferencia de proporciones = $-0,14$, $q = 0,128$; Quer: Diferencia de proporciones = $-0,13$, $q = 0,1527$).

Por el contrario, las abejas que solo recibieron imidacloprid exhibieron puntajes de aprendizaje significativamente más bajos que las abejas Control (Imid: $Z = -5,91$, $q = 0,0002$). Además, después de 24 h, la probabilidad de exhibir una PER condicionada era significativamente más baja con relación a las abejas Control (Prueba de Wald ajustada: Diferencia de proporciones = $0,49$, $q = 0,0002$). Solo un 20% de las abejas expuestas a imidacloprid exhibieron una PER condicionada; en tanto el 69,4% de las abejas Control respondieron durante la prueba de retención. Se estimó que las probabilidades de recordar eran 9,1 veces mayores (IC 95% = 3,6-22,8) para las abejas Control con

relación a las abejas Imid.

Más importante aún, las abejas alimentadas profilácticamente con rutina o quercetina tenían puntajes de aprendizaje significativamente más altos que las abejas del grupo Imid (Rut: $Z = 2,73$, $q = 0,006$; Quer: $Z = 2,45$, $q = 0,007$; Figura 1A). Además, después de 24 h, las abejas en el grupo Rut+Imid (Prueba de Wald ajustada: Diferencia de proporciones = $-0,33$, $q = 0,0001$) y el grupo Quer+Imid (Prueba de Wald ajustada: Diferencia de proporciones = $-0,16$, $q = 0,017$) tenían una mayor probabilidad de exhibir una PER condicionada con relación a las abejas Imid (Figura 1B). Un 52,6% en el grupo Rut+Imid y un 36,5% en el grupo Quer+Imid exhibieron una respuesta condicionada después de 24 h. Se estimó que las probabilidades de recordar eran 4,4 veces mayores (IC 95% = 1,9-10,6) para las abejas Rut+Imid y 2,3 veces mayores (IC 95% = 0,9-5,6) para las abejas Quer+Imid con relación a las abejas Imid. Sin embargo, las abejas en los grupos Rut+Imid y Quer+Imid exhibieron puntajes de aprendizaje significativamente más bajos que las abejas Control (Rut+Imid: $Z = -3,38$, $q = 0,003$; Quer+Imid: $Z = -3,67$, $q = 0,003$; Figura 1A). Después de 24 h, las abejas en el grupo Quer+Imid pero no en el grupo Rut+Imid tenían una probabilidad significativamente menor de exhibir una PER condicionada que las abejas Control.

También se encontró un efecto significativo del tratamiento sobre la latencia de respuesta durante la adquisición de aprendizaje (prueba de Kruskal-Wallis: $X_5 = 54,72$, $p < 0,0001$; Figura 1C). Las abejas en los grupos Rut+Imid y Quer+Imid exhibieron latencias de respuesta significativamente más prolongadas con relación a las abejas Control (Rut+Imid: $Z = 4,07$, $q = 0,001$; Quer+Imid: $Z = 3,60$, $q = 0,004$; Figura 1C). La latencia de respuesta en todos los otros tratamientos no era significativamente diferente del Control (Rut: $Z = -0,91$, $q = 0,847$; Quer: $Z = -0,95$, $q = 0,847$; Imid: $Z = -0,88$, $q = 0,847$; Figura 1C).

En su conjunto, estos resultados muestran que los flavonoides rutina y quercetina protegen a las abejas mieleras contra el deterioro cognitivo en el aprendizaje y la memoria producido por imidacloprid (que se creía que producía efectos de corto plazo) y sus metabolitos (que se creía que producían efectos a largo plazo).

Ejemplo 2: El flavonoide protege el aprendizaje y la memoria de abejorros contra

el deterioro inducido por neonicotinoides

Materiales y métodos

Recolección de abejorros; mantenimiento y tratamientos experimentales

Se mantuvo una colonia del abejorro *Bombus impatiens* (Koppert Inc) en condiciones de laboratorio. Las abejas recibieron polen en el interior de los nidos y forrajearon en un alimentador con agua azucarada 1 M fuera del nido. Las abejas se recolectaron cuando se encontraban sobre el alimentador y se anestesiaron con hielo para luego ser restringidas en pipetas de plástico. Las abejas se mantuvieron en las pipetas por toda la duración del experimento (cinco días).

Los abejorros fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos:

- Control: agua azucarada 1 M (20 μ l) suministrada dos veces por día durante tres días consecutivos;

- Rutina: Rutina 1 μ M (Sigma-Aldrich R5143) diluida en agua azucarada 1 M (20 μ l) suministrada dos veces por día durante tres días antes del entrenamiento el cuarto día;

- Imid: suministrado con agua azucarada 1 M (20 μ l) dos veces por día durante tres días y suministrado con 20 μ l de imidacloprid 5 nM (Prime Source LLC, IN, EEUU) en agua azucarada 1 M 2 horas antes del entrenamiento el cuarto día; y

- Rutina+Imid: Abejas alimentadas con rutina 1 μ M diluida en agua azucarada 1 M (20 μ l) durante tres días antes del entrenamiento y que reciben 20 μ l de imidacloprid 5 nM en agua azucarada 1 M 2 horas antes del entrenamiento el cuarto día.

Entrenamiento

Todas las abejas fueron entrenadas usando el condicionamiento olfatorio de la respuesta de extensión de la probóscide (PER). Brevemente, las abejas fueron expuestas a una presentación de 1-nonanol (Sigma-Aldrich) durante 10 s. Después de 7 s desde el inicio de la presentación del olor, se estimuló la antena con agua azucarada 1,5 M para generar la PER. Después de la PER, se dejó que las abejas bebieran agua azucarada durante 3 s. Cada presentación apareada era considerada como una prueba de entrenamiento y cada individuo recibió once pruebas de entrenamiento con un intervalo

entre pruebas promedio de 10 minutos. Después del entrenamiento, todas las abejas fueron alimentadas con 20 µl de agua azucarada 1 M y se mantuvieron en cajas de plástico durante 24 h hasta la prueba de retención. Para cada prueba, se registró si había una PER condicionada y su latencia en segundos usando un metrónomo (2 Hz). A las 24 horas después de la última prueba de entrenamiento, a las abejas se les presentó el olor condicionado durante 10 s. Se registró si la abeja exhibía una PER condicionada. Las abejas que no exhibían una PER condicionada fueron estimuladas con agua azucarada con el fin de evaluar la motivación.

Recolección de datos y análisis estadístico

Se cuantificó el desempeño de cada individuo como la cantidad de respuestas PER condicionadas en todas las pruebas. Por lo tanto, para cada abeja se registró un puntaje de entre cero y diez (0-10). Se compararon los puntajes de adquisición en los cuatro tratamientos usando una prueba de Kruskal-Wallis dado que los datos no seguían una distribución normal y no se pudieron normalizar después de las transformaciones.

Luego se corrieron comparaciones múltiples usando pruebas de Wilcoxon entre grupos usando pruebas T de una o dos colas dependiendo de las predicciones (se predijo que las abejas en todos los tratamientos se desempeñaban mejor que las abejas en el grupo de imidacloprid). El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el método de índice de falsos descubrimientos (FDR-método afinado de dos etapas). En todos los casos se presentaron valores p corregidos.

Se comparó el aprendizaje de adquisición (es decir, curvas de aprendizaje) entre abejas alimentadas con imidacloprid versus abejas protegidas usando medidas repetidas.

La retención se cuantificó como una variable nominal (sí/no). Se compararon los datos de los tratamientos usando una prueba de Chi cuadrado, seguido por comparaciones múltiples entre pares de tratamientos. El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el FDR como se indicó precedentemente. En todos los casos se presentaron valores p corregidos.

La latencia se cuantificó como una variable continua entre 0,5 s y 10 s. Se compararon los datos de los tratamientos usando un ANOVA después de una transformación Log para normalizar la distribución (prueba W de Shapiro-Wilk después

de la transformación log: $W = 0,99$, $p = 0,55$), seguido por comparaciones múltiples entre grupos usando una prueba de dos colas. El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el método FDR como se indicó precedentemente. En todos los casos se presentaron valores p corregidos.

Resultados

Se investigó el efecto protector del flavonol rutina contra los efectos subletales negativos de imidacloprid usando el condicionamiento de la respuesta de extensión de la probóscide.

El puntaje del desempeño en los tratamientos no exhibía una distribución normal (prueba W de Shapiro-Wilk: $W: 0,927$, $p < 0,0001$) y no se pudieron normalizar usando una transformación. Por lo tanto, se usaron pruebas no paramétricas para las comparaciones entre tratamientos y para las comparaciones múltiples. Los resultados indicaron que la exposición a los tratamientos afectó significativamente el puntaje de desempeño (Kruskal-Wallis: Chi cuadrado: $15,81$ DF: 1 , $p: 0,0012$; Figura 2A). Las abejas expuestas a imidacloprid tenían puntajes significativamente más bajos que las abejas Control (prueba de Wilcoxon: $Z = -3,37$, $p = 0,0006$; Figura 2A). Más importante aún, las abejas alimentadas profilácticamente con rutina y expuestas subsiguientemente a imidacloprid 5 nM mostraron desempeños que eran significativamente mayores que las abejas que solo estuvieron expuestas a imidacloprid (prueba de Wilcoxon: $Z = 2,0$, $p = 0,024$; Figura 2A) y no diferían significativamente de las abejas Control (prueba de Wilcoxon: $Z = -1,09$, $p = 0,176$; Figura 2A) o de abejas alimentadas solamente con rutina (prueba de Wilcoxon: $Z = 1,41$, $p = 0,126$; Figura 2A). Además, el aprendizaje en las pruebas era significativamente menor en las abejas alimentadas con imidacloprid (grupo imidacloprid) que las alimentadas profilácticamente con rutina y luego expuestas a imidacloprid (rutina + imidacloprid) (mediciones MANOVA repetidas: $F_1: 5,06$, $p = 0,028$; Figura 2C). Notablemente, la latencia de respuesta también era afectada significativamente por los tratamientos (ANOVA de una vía: $F_{3,105} = 3,93$, $p = 0,011$) (Figura 2D). Las abejas expuestas solo a imidacloprid exhibieron latencias significativamente más prolongadas que las abejas Control ($p = 0,042$) y que las abejas alimentadas con rutina ($p = 0,015$), pero no eran diferentes de las abejas alimentadas

profilácticamente con rutina ($p = 0,44$).

Después de 24 h la retención de la memoria también era afectada significativamente por el tratamiento de alimentación (prueba de relación de probabilidad: Chi cuadrado: 21,20, $p < 0,0001$). Las abejas en el grupo de imidacloprid fue el único grupo que mostraba un nivel diferente de retención de la memoria. Las abejas en el grupo de imidacloprid exhibió una retención de la memoria significativamente menor que las abejas alimentadas solamente con agua azucarada (grupo Control; $p = 0,0002$, Figura 2B), las abejas que recibieron profilácticamente rutina (grupo de Rutina+imidacloprid; $p = 0,0002$; Figura 2B) y las abejas alimentadas solamente con rutina (grupo de rutina; $p = 0,0017$; Figura 2B).

Por ende, estos resultados demuestran el efecto protector contra un neonicotinoide tanto del aprendizaje como de la memoria, provisto por la administración profiláctica de un flavonoide, en este caso rutina.

Ejemplo 3: Los flavonoides protegen la actividad motora de vuelo de *Drosophila* contra el deterioro inducido por neonicotinoides

Materiales y métodos

Tratamientos experimentales

Los métodos estándar se basaban en evaluar la actividad motora y los deterioros motores en *Drosophila melanogaster* (Jimenez-Del-Rio y col., 2010. *Neurochem Res* 35: 227-238). El método se basa en la respuesta geotrópica negativa (es decir, la preferencia de caminar hacia arriba cuando está parado en una pared) de los insectos. Se asignaron aleatoriamente hembras de *D. melanogaster* de cuatro días de vida (posteclosión) a uno de cuatro tratamientos: Control (alimentadas con 5% de agua azucarada), rutina 0,1 (alimentadas con una solución de rutina 0,1 μM en 5% de agua azucarada), Rutina 1 (alimentadas con una solución de rutina 1 μM en 5% de agua azucarada), Rutina 10 (alimentadas con una solución de rutina 10 μM en 5% de agua azucarada). Después de tres días, las moscas de cada grupo fueron asignadas aleatoriamente a uno de dos tratamientos: 5% de agua azucarada o Imid 0,1 μM en 5% de agua azucarada. Por lo tanto, las moscas estaban en uno de ocho tratamientos: Control, Imid, Rut 0,1, Rut 0,1 + Imid, Rut 1, Rut 1 + Imid, Rut 10, Rut 10 + Imid. Las

moscas fueron expuestas a su tratamiento específico durante 22 h.

Evaluación de la actividad motora

Usando métodos estándar, las moscas fueron transferidas a un vial limpio y se definió un umbral de 5 cm desde la base en el vial. La base del vial se golpeó sobre la mesa para asegurar que todas las moscas se habían movido a la base. Se contó la cantidad de moscas que cruzaron el umbral dentro del transcurso de 6 segundos. Los datos se analizaron usando Chi cuadrado con predicciones específicas (pruebas de una cola) para comparaciones planificadas. El error asociado con las comparaciones múltiples se corrigió usando el método del Índice de falsos descubrimientos (método afinado de dos etapas).

Resultados

Las moscas que recibieron imidacloprid exhibieron un desempeño menor que las moscas en el grupo control (Chi cuadrado: 7,34, $q = 0,0058$; Figura 3), lo cual demuestra el deterioro neuromotor. Notablemente, todas las moscas alimentadas profilácticamente con rutina estaban protegidas contra el deterioro. Las moscas que recibieron imidacloprid exhibieron un desempeño motor significativamente menor que las moscas que habían recibido profilácticamente rutina $0,1 \mu\text{M}$ (Chi cuadrado: 22,58, $q < 0,0001$), $1 \mu\text{M}$ (Chi cuadrado: 3,91, $q = 0,025$) o $10 \mu\text{M}$ (Chi cuadrado: 4,82, $q = 0,015$) (Figura 3). Los resultados constituyen una fuerte evidencia que un flavonol, en este caso rutina, puede proteger eficazmente una función neuromotora en un insecto, en este caso una mosca de la fruta.

Ejemplo 4: Autoadministración *ad libitum* de un flavonoide protege el aprendizaje y la memoria de abejorros contra la administración aguda de un neonicotinoide y fipronilo

Materiales y métodos

Recolección de abejorros; mantenimiento y tratamientos experimentales

Se mantuvo una colonia del abejorro *Bombus impatiens* (Koppert Inc) en condiciones de laboratorio. Las abejas recibieron polen en el interior de los nidos y forrajearon en un alimentador con agua azucarada 1 M fuera del nido. Las abejas se recolectaron sobre el alimentador y se anestesiaron con hielo para luego ser asignadas

aleatoriamente a uno de dos recipientes de plástico donde se permitió una autoadministración *ad libitum* de una de dos soluciones para 10 abejas: i) agua con sacarosa 1 M o ii) rutina 1 μ M (Sigma-Aldrich R5143) diluida en agua con sacarosa 1 M. A la noche del tercer día, se retiró el alimentador para ayunar a las abejas. El cuarto día, las abejas se anestesiaron con hielo y se restringieron en pipetas de plástico. Las abejas se mantuvieron en las pipetas durante el resto del experimento (dos días). Una hora después del aprovechamiento, las abejas fueron asignadas aleatoriamente a uno de tres tratamientos: i) 20 μ l de agua con sacarosa 1 M, ii) 20 μ l de agua con sacarosa 1 M + imidacloprid 5 nM, iii) 20 μ l de agua con sacarosa 1 M + fipronilo 6 nM. Por lo tanto, en general las abejas pertenecían a uno de seis tratamientos:

- Control: agua con sacarosa *ad libitum* durante tres días y 20 μ l de agua con sacarosa antes del entrenamiento

- Rutina: rutina 1 μ M *ad libitum* durante tres días y 20 μ l de agua con sacarosa antes del entrenamiento

- Imid: agua con sacarosa *ad libitum* durante tres días y 20 μ l de imidacloprid 5 nM en agua azucarada 1 M 2 horas antes del entrenamiento

- Rutina+Imid: rutina 1 μ M *ad libitum* durante tres días y 20 μ l de imidacloprid 5 nM en agua azucarada 1 M 2 horas antes del entrenamiento

- Fipronilo: agua con sacarosa *ad libitum* durante tres días y 20 μ l de fipronilo 5 nM en agua con sacarosa 1 M 2 horas antes del entrenamiento

- Rutina+Fipronilo: rutina 1 μ M *ad libitum* durante tres días y 20 μ l de fipronilo 6 nM en agua azucarada 1 M 2 horas antes del entrenamiento

Entrenamiento

Todas las abejas fueron entrenadas de manera ciega para el investigador usando el condicionamiento olfatorio de la respuesta de extensión de la probóscide (PER). Brevemente, las abejas fueron expuestas a una presentación de 1-nonanol (Sigma-Aldrich) durante 10 s. Después de 7 s desde el inicio de la presentación del olor, se estimuló la antena con agua azucarada 1,5 M para generar la PER. Después de la PER, se dejó que las abejas bebieran agua azucarada durante 3 s. Cada presentación apareada era considerada como una prueba de entrenamiento y cada individuo recibió once

pruebas de entrenamiento con un intervalo entre pruebas promedio de 10 minutos. Después del entrenamiento, todas las abejas fueron alimentadas con 20 μ l de agua azucarada 1 M y se mantuvieron en cajas de plástico durante 24 h hasta la prueba de retención. Para cada prueba, se registró si había una PER condicionada y su latencia en segundos usando un metrónomo (2 Hz). A las 24 horas después de la última prueba de entrenamiento, a las abejas se les presentó el olor condicionado durante 10 s. Se registró si la abeja exhibía una PER condicionada. Las abejas que no exhibían una PER condicionada fueron estimuladas con agua con sacarosa con el fin de evaluar la motivación.

Recolección de datos y análisis estadístico

Se cuantificó el aprendizaje de cada individuo como la cantidad de respuestas PER condicionadas en todas las pruebas. Por lo tanto, para cada abeja se registró un puntaje de aprendizaje de entre cero y diez (0-10). Se compararon los puntajes en los seis tratamientos usando una prueba de Kruskal-Wallis dado que los datos no seguían una distribución normal y no se pudieron normalizar después de las transformaciones.

Luego se corrieron comparaciones múltiples que comparan el puntaje de aprendizaje con relación a abejas Control usando un método de Steel no paramétrico de una o dos colas dependiendo de las predicciones. Estas comparaciones ofrecieron información acerca del deterioro predicho producido por los insecticidas, el efecto inocuo predicho del flavonoide y el nivel de protección potencial. El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el método de índice de falsos descubrimientos (FDR-método afinado de dos etapas). En todos los casos se presentaron valores p corregidos (valores q).

La retención de la memoria se cuantificó como una variable nominal (sí/no). Se compararon los datos de los tratamientos usando una prueba de Chi cuadrado, seguido por comparaciones múltiples de todos los tratamientos versus el Control. El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el FDR como se indicó precedentemente. En todos los casos se presentaron valores p corregidos (valores q).

La latencia se cuantificó como una variable continua entre 0,5 s y 10 s. Se compararon los datos de los tratamientos usando un ANOVA después de una

transformación Log para normalizar la distribución (prueba W de Shapiro-Wilk después de la transformación log: $p > 0,05$ de todos los tratamientos para la hipótesis nula que los datos son de una distribución normal), seguido por comparaciones múltiples entre todos los tratamientos y el grupo Control. El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el método FDR como se indicó precedentemente. En todos los casos se presentaron valores p corregidos (valores q).

Resultados

Se investigó el efecto protector del flavonol rutina contra los efectos subletales negativos de imidacloprid -dirigido al nAChR- y fipronilo -dirigido a los receptores dopaminérgicos y GABA- usando el condicionamiento de la respuesta de extensión de la probóscide.

Los datos fueron analizados por los valores atípicos usando las distancias de Mahalanobis que incluyen el puntaje de aprendizaje y de retención de la memoria como variables. Se excluyeron 30 abejas y los análisis finales se condujeron con 145 abejas distribuidas entre los seis tratamientos: Control (N = 28), Rut (N = 26), Imid (N = 23), Rut+Imid (N = 21), Fipro (N = 26), Rut+Fipro (N = 25).

Los resultados muestran que el puntaje de aprendizaje era afectado significativamente por el tratamiento (prueba de Kruskal-Wallis: $X_5 = 42,66$, $p < 0,0001$). Las abejas en el grupo Imid ($z = -5,411$, $q = 0,0001$), el grupo Fipro ($z = -2,829$, $q = 0,008$) y el grupo Rut+Imid ($z = -3,208$, $q = 0,008$) exhibieron un puntaje de aprendizaje significativamente menor que las abejas Control (Figura 4A). Por el contrario, las abejas en el grupo Rut ($z = -2,097$, $q = 0,077$) y el grupo Rut+Fipro ($z = -0,136$, $q = 0,42$) exhibieron puntajes de aprendizaje que no eran significativamente diferentes de las abejas Control (Figura 4A). Estos resultados constituyen una fuerte evidencia del deterioro del aprendizaje producido por imidacloprid y fipronilo y el efecto inocuo de rutina. Además, la respuesta de las abejas Rut+Fipro demostraron una protección completa por el flavonoide. Cabe destacar que la diferencia significativa entre las abejas Rut+Imid y Control indicaron una falta de protección. Sin embargo, una comparación *post-hoc* mostró que las abejas en el grupo Rut+Imid exhibieron puntajes significativamente más altos que las abejas Imid ($z = 4,2$, $p < 0,0001$). Por consiguiente,

la administración profiláctica de rutina ofreció protección parcialmente, pero significativamente, contra el efecto de imidacloprid al tiempo que proporcionaba una protección completa contra fipronilo.

A diferencia de los resultados sobre el aprendizaje, no se observaron diferencias en la latencia de respuesta en abejas con cualquier tratamiento con relación a las abejas Control (prueba de Dunnet: $p > 0,05$ para todos los tratamientos). Sin embargo, se encontró que los tratamientos afectaron significativamente el proceso de toma de decisiones, evaluado como la relación entre la latencia de respuesta y el puntaje de aprendizaje (ANOVA: $F_{5,122}$: 5,477, $p = 0,001$). Con relación a las abejas Control, se encontró un aumento significativo en la relación de toma de decisiones de abejas Imid ($t_{1,40}$: 4,226, $q = 0,0001$), Fipro (prueba t de Student: $t_{1,47}$: 2,148, $q = 0,0166$) y Rutina+Imid (prueba t de Student: $t_{1,47}$: 3,266, $q = 0,0480$).

Después de 24 h, se encontró un efecto significativo del tratamiento administrado sobre la retención de la memoria (Relación de probabilidades: Chi cuadrado: 18,78, $p = 0,0021$). Solo un 13% de las abejas que recibieron imidacloprid y el 34,6% de las abejas que recibieron fipronilo exhibieron una respuesta condicionada, a diferencia del 64,3% de las abejas Control, proporcionando así una fuerte evidencia que la administración de los insecticidas disminuye significativamente la probabilidad de recordar (prueba de Wald ajustada de dos proporciones para una respuesta PER: diferencia de proporciones de Control-Imid: 0,51, $q = 0,0003$; diferencia de proporciones de Control-fipro: 0,30, $q = 0,016$; Figura 4B). Se estimó que la probabilidad de recordar era 12 veces mayor para las abejas Control con relación a las abejas Imid y 3,4 veces mayor con relación a las abejas Fipro.

Cabe destacar que un 42,9% de las abejas en el grupo de Rutina+Imid y un 60% de las abejas en el grupo de Rut+Fipro recordaron después de 24 h, proporcionando así una fuerte evidencia del efecto protector sobre la memoria del flavonoide con relación a las abejas Imid y Fipro (prueba de Wald ajustada de dos proporciones: diferencia de proporciones de Imid-Rutina+Imid para una respuesta PER: -0,30, $q = 0,016$; diferencia de proporciones de Fipro-Rutina+Fipro: -0,25, $q = 0,028$; Figura 4B). Se estimó que la probabilidad de recordar era 5 veces mayor para las abejas Rut+Imid con relación a las

abejas Imid y 2,8 veces mayor para las abejas Rut+Fipro con relación a las abejas Fipro.

En su conjunto, estos resultados constituyen una evidencia fuerte que la administración *ad libitum* del flavonoide rutina ofrece protección contra los deterioros cognitivos del aprendizaje, la memoria y la toma de decisiones de dos insecticidas con una farmacodinámica diferente. El imidacloprid está dirigido primariamente al nAChR en tanto el Fipronilo está dirigido a los receptores GABAérgicos y dopaminérgicos.

Ejemplo 5: Los flavonoides administrados un solo día protege la sensibilidad sensorial de abejas mieleras contra un deterioro inducido por piretroides

Materiales y métodos

Recolección y mantenimiento de abejas mieleras

Se capturaron obreras de abeja mielera (*Apis mellifera scutellata*) de colmenas establecidas en el apiario de la Universidad del Rosario (Bogotá, Colombia) entre las 08:00 h y las 10:00 h. Las abejas se anestesiaron con hielo y se introdujeron en tubos de plástico y se mantuvieron en condiciones de laboratorio por toda la duración del experimento (tres días).

Tratamientos experimentales

El primer día, las abejas fueron asignadas aleatoriamente a uno de cuatro tratamientos administrados a dos dosis (mañana: 20 µl; tarde: 10 µl): i) Control (solución de sacarosa 1 M), ii) Rutina 1 µM (Sigma-Aldrich R5143), iii) Kaempferol 131,7 µM (Sigma-Aldrich K0133), iv) composición de Rutina-Kaempferol (concentración final de rutina 1 µM y kaempferol 131,7 µM). Todas las soluciones se diluyeron en una solución de sacarosa 1 M hasta las concentraciones descritas precedentemente. Al día siguiente, las abejas de cada grupo fueron asignadas aleatoriamente a uno de dos tratamientos: 5 µl de una solución de sacarosa 1 M o deltametrina 17,81 µM (Dinastia Bayer). Por lo tanto, las abejas pertenecían a uno de ocho tratamientos: i) Agua con sacarosa (Control), ii) Rutina (Rut), iii) Kaempferol (Kaemp), iv) Kaempferol + Rutina (Kaemp+Rut), v) Deltametrina (Delta), vi) Rutina + Deltametrina (Rut+Delta), vii) Kaempferol + Deltametrina (Kaemp+Delta), viii) Kaempferol + Rutina + Deltametrina ((Kaemp+Rut)+Delta). Todas las soluciones se diluyeron en agua azucarada 1 M hasta las concentraciones descritas precedentemente.

Capacidad de respuesta a sacarosa de abejas mieleras individuales

La sensibilidad sensorial se evaluó usando la capacidad de respuesta a la sacarosa, un indicador de la explotación de los recursos por las obreras. El segundo día, se evaluaron cinco veces las abejas de los ocho tratamientos descritos precedentemente por su umbral de respuesta (0 h, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h). La primera medición (0 h) se realizó antes de la administración del plaguicida. Las abejas fueron evaluadas con concentraciones ascendentes de sacarosa de 0,1, 0,3, 1, 3, 10 y 30% (p/p). Entre cada concentración, se ofreció agua pura a las abejas como control de una sensibilización o habituación potencial (Pankiw y col., *Behav Ecol Sociobiol* (2000) 47: 265-267). El tiempo entre pruebas entre la presentación de cada concentración de sacarosa era de por lo menos 4 minutos. Para cada presentación, se registró la extensión refleja de la probóscide (lengua) de la abeja, después de estimular la antena con la solución. Después de la última medición (4 h), las abejas fueron alimentadas con 10 µl de una solución de sacarosa 1 M y se mantuvieron hasta el día siguiente para una prueba final (24 horas después de la administración del plaguicida).

Recolección de datos y análisis estadístico

Para cada abeja, se determinó el puntaje de capacidad de respuesta (0-7) 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 24 h, y un puntaje agrupado (0-42). La distribución normal de los puntajes se evaluó usando la prueba W de Shapiro-Wilk para la hipótesis nula que los datos son de una Distribución normal. El puntaje de los tratamientos no mostró una distribución normal (Control: $W = 0,824$, $p < 0,0001$; Ka: $W = 0,821$, $p < 0,0001$; Rut: $W = 0,672$, $p < 0,0001$; Kaemp+Rut: $W = 0,817$, $p < 0,0001$; Delta: $W = 0,944$, $p = 0,024$; Kaemp+Delta: $W = 0,94$, $p = 0,0154$; Rut+Delta: $W = 0,929$, $p = 0,009$; Kaemp+Rut+Delta: $W = 0,91$, $p = 0,0008$) y no se pudieron normalizar usando una transformación. Por lo tanto, se usaron pruebas no paramétricas para las comparaciones entre tratamientos y para las comparaciones múltiples. Los cambios globales de las respuestas a las diferentes concentraciones fueron evaluados usando MANOVA de mediciones repetidas. El error asociado con las comparaciones múltiples se controló usando el Índice de falsos descubrimientos ajustado de dos etapas, y se muestran los valores p corregidos (valores q). Se exploró la existencia de valores atípicos entre los

datos usando una sola corrida de la prueba de atípicos de ajuste robusto. Todos los análisis se condujeron usando JMP v. 14 (SAS Institute Inc).

Resultados

Se investigó el efecto protector de dos flavonoles (rutina y kaempferol), y una composición de una mezcla de los mismos, contra los efectos sensoriales subletales negativos del piretroide deltametrina usando la capacidad de respuesta a sacarosa. Después del examen de los valores atípicos, se excluyeron 70 abejas, y se corrieron análisis finales con 402 abejas distribuidas en ocho tratamientos: Control (N = 50), Kaempferol (N = 50), Rut (N = 56), Kaemp+Rut = 52), Delta (N = 48), Kaemp+Delta = 49), Rut+Delta (N = 45), (Kaemp+Rut)+Delta (N = 52).

Los resultados indicaron que la exposición a deltametrina tenía un efecto perjudicial significativo sobre la capacidad de respuesta a sacarosa. La sensibilidad de las abejas era afectada significativamente por el tratamiento (Kruskal-Wallis: $X^2_7 = 168,87$, $p < 0,0001$) con relación a las abejas Control (Figura 5A), y la sensibilidad era significativamente menor en las abejas Delta ($z = 7,85$, $q < 0,0001$), Kaemp+Delta ($z = 6,38$, $q < 0,0001$), Rut+Delta ($z = 5,31$, $q < 0,0001$) y (Kaemp+Rut)+Delta ($z = 5,96$, $q < 0,0001$). Por el contrario, con relación a las abejas Control, la sensibilidad no era afectada significativamente en las abejas Kaemp ($z = 0,05$, $q = 0,45$), Rut ($z = -0,01$, $q = 0,45$) y Kaemp+Rut ($z = 1,10$, $q = 0,45$). Estos resultados demostraron el deterioro de la sensibilidad sensorial producida por el piretroide y no el efecto inocuo de los flavonoides. Notablemente, después de comparaciones *post hoc* con relación a las abejas Delta, se encontró una sensibilidad significativamente mayor en abejas Kaemp+Delta ($z = -4,11$, $q < 0,0001$), Rut+Delta ($z = 4,24$, $q < 0,0001$) y (Kaemp+Rut)+Delta ($z = -4,02$, $q = 0,0001$). Estos resultados demuestran la protección significativa provista por los flavonoides.

Con respecto a la sensibilidad en el tiempo, para todos los tratamientos, al nivel basal (0 h), la capacidad de respuesta era afectada significativamente por la concentración de agua con sacarosa ($F_{6,389} = 46,911$, $p < 0,0001$). Una estimulación con una concentración mayor de agua con sacarosa condujo a un porcentaje más alto de abejas que exhiben la respuesta refleja (Figura 5B). Este resultado refleja la capacidad

de respuesta normal de las abejas cuando encuentran recursos de concentración variable. Notablemente, la deltametrina tuvo un efecto negativo rápido y duradero sobre la respuesta a sacarosa. Después de la administración del insecticida, se pueden diferenciar tres grupos (Figura 5B para los ejemplos a 1 h, 4 h (última medición del día) y 24 h). Las abejas que recibieron deltametrina mostraron la menor sensibilidad en todos los tiempos de prueba, incluyendo 24 h después de la administración del insecticida con relación a las abejas Control (Delta: $z = 6,95$, $q = 0,0002$; Kaemp+Delta: $z = 4,28$, $q = 0,0002$; Rut+Delta: $z = 3,44$, $q = 0,003$; (Kaemp+Rut)+Delta: $z = 4,21$, $q = 0,0002$). Notablemente, con relación a las abejas Delta, la administración de un flavonoide o de la composición seguido por exposición al insecticida condujo a sensibilidades significativamente mayores después de 24 h (Kaemp+Delta: $z = -3,71$, $q = 0,0006$; Rut+Delta: $z = 3,78$, $q = 0,0006$; (Kaemp+Rut)+Delta: $z = -3,19$, $q = 0,0019$).

La disminución de la sensibilidad observada después de la administración de deltametrina afectó la respuesta a todas las concentraciones de la solución de sacarosa (Figura 5B). Después de una hora, menos de un 40% de las abejas expuestas a deltametrina respondieron a un 30% de agua con sacarosa, la concentración más alta usada en la prueba. Después de 4 horas, menos de un 30% de las abejas respondieron a 30% de agua con sacarosa y después de 24 horas se observó una mejora de tan solo un 10%. Por el contrario, las abejas de los tratamientos con Rut+Delta, Kaemp+Delta o (Kaemp+Rut)+Delta nunca mostraron menos de un 60% de capacidad de respuesta a 30% agua con sacarosa y después de 24 h mostraron por lo menos un 80% de capacidad de respuesta a 30% de agua con sacarosa. De hecho, se estimó que la probabilidad de respuesta a 30% de agua con sacarosa con relación a las abejas Delta era 5,6 veces para las abejas Kaemp+Delta, 7,1 veces mayor para las abejas Rut+Delta y 4,6 veces mayor para las abejas (Kaemp+Rut)+Delta.

Por ende, estos resultados demuestran el efecto protector de la administración profiláctica de los flavonoles rutina y kaempferol, así como de la composición con los mismos, contra el deterioro sensorial inducido por la exposición al piretroide deltametrina. Notablemente, estos resultados demuestran un efecto protector que duró más de 36 horas después de la última dosis de un flavonoide suministrado por un solo

día. Esto indica que la protección se debe, por lo menos parcialmente, a mecanismos de duración prolongada, tal como inducción de CYP450.

A diferencia de los neonicotinoides, dirigidos a nAChR específicos, los piretroides, tal como deltametrina, están dirigidos primariamente a los canales de sodio dependientes del voltaje (Na^+_v), presentes ampliamente en los tejidos excitables (mayormente músculos y neuronas). Por ende, este impacto más amplio debería afectar los sistemas motores, sensoriales y cognitivos. Los resultados de la presente indican deterioros motores y sensoriales, reflejados como PER más lentas y respuestas solo a concentraciones altas de solución de sacarosa. Aunque los piretroides se han propuesto como una alternativa de los neonicotinoides prohibidos, estos resultados muestran que la ingesta de deltametrina conduce a impactos negativos que se pueden extender a la adquisición de energía de la colonia. Además, en su conjunto los resultados muestran que la protección ofrecida por los flavonoides se extiende a los plaguicidas con diferentes mecanismos de acción.

Ejemplo 6: Los flavonoides rutina y kaempferol y el ácido fenólico ácido p-coumárico protegen a las abejas mieleras contra el deterioro inducido por la administración de fipronilo

Materiales y métodos

Recolección y mantenimiento de abejas mieleras

Se capturaron obreras de abeja mielera (*Apis mellifera scutellata*) de colmenas establecidas en el apiario de la Universidad del Rosario (Bogotá, Colombia) entre las 08:00 h y las 10:00 h. Las abejas se anestesiaron con hielo y se introdujeron en tubos de plástico y se mantuvieron en condiciones de laboratorio por toda la duración del experimento (cinco días). El alimento se suministró dos veces por día en un volumen de 10 μl y la composición varió de acuerdo con los tratamientos experimentales.

Tratamientos experimentales

Las abejas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos administrados dos veces por día durante tres días consecutivos (todas las concentraciones son finales):

- Control: agua con sacarosa 1 M (10 μl)

- Rut: rutina 1 μ M (Sigma-Aldrich: R5143)-agua azucarada 1 M (10 μ l)
- Kaemp: kaempferol 131 μ M (Sigma-Aldrich: K0133) + agua azucarada 1 M (10 μ l)
- p-Cou A: ácido p-coumárico 200 μ M (Sigma-Aldrich: C9008) diluido en agua azucarada 1 M (10 μ l)

- Mezcla: rutina 1 μ M, kaempferol 131 μ M y ácido p-coumárico 200 μ M): Abejas alimentadas con composiciones diluidas en agua azucarada 1 M (10 μ l), dos veces por día durante tres días

El cuarto día, las abejas fueron asignadas aleatoriamente a uno de dos tratamientos tres horas antes del entrenamiento:

- Fipronilo: 10 μ l de fipronilo 228 nM (Astuto Invesa) en agua con sacarosa 1 M
- Solución de sacarosa: 10 μ l de agua con sacarosa 1 M

Por lo tanto, las abejas pertenecen a uno de diez tratamientos: Control, Kaemp, Rut, p-Cou A, Mezcla, Fipro, Kaemp+Fipro, Rut+Fipro, p-Cou A+Fipro, Mezcla+Fipro.

Entrenamiento

Las abejas fueron entrenadas usando el condicionamiento clásico de la respuesta de extensión de la probóscide (PER). Brevemente, las abejas recibieron una corriente suave de aire limpio durante 15 segundos para permitir que las abejas se adaptaran. Luego se inyectó una corriente suave de 1-hexanol (Sigma-Aldrich: 471402) durante 10 segundos. Seis segundos después de la inyección de 1-hexanol, se estimuló una de las antenas con agua azucarada (1,5 M), que conduce a la extensión refleja de la probóscide, y se dejó que las abejas bebieran durante 4 segundos. De esta manera, la recompensa y el estímulo se superpusieron durante cuatro segundos. Esta secuencia, reconocida como una prueba de entrenamiento, se repitió once veces. El tiempo se determinó usando un metrónomo (2 Hz). La retención de la memoria se evaluó 24 horas después de las once pruebas de entrenamiento. Durante cada prueba, se registró si las abejas exhibieron una PER condicionada. Se entrenaron 12 abejas en cada sesión. El entrenamiento fue realizado por un investigador ciego al tratamiento.

Recolección de datos y análisis estadístico

Se cuantificó el aprendizaje de cada individuo como la cantidad de respuestas PER condicionadas en todas las pruebas. Por lo tanto, para cada abeja se registró un puntaje de aprendizaje de entre cero y diez (0-10). Se compararon los puntajes en los seis tratamientos usando una prueba de Kruskal-Wallis dado que los datos no seguían una distribución normal y no se pudieron normalizar después de las transformaciones.

Luego se corrieron comparaciones múltiples que comparan el puntaje de aprendizaje con relación a abejas Control usando un método de Steel no paramétrico de una o dos colas dependiendo de las predicciones. Estas comparaciones ofrecieron información acerca del deterioro predicho producido por los insecticidas, el efecto inocuo predicho del flavonoide y el nivel de protección potencial. El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el método de índice de falsos descubrimientos (FDR-método afinado de dos etapas). En todos los casos se presentaron valores p corregidos (valores q).

La retención de la memoria se cuantificó como una variable nominal (sí/no). Se compararon los datos de los tratamientos usando una prueba de Chi cuadrado, seguido por comparaciones múltiples de todos los tratamientos versus el Control. El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el FDR como se indicó precedentemente. En todos los casos se presentaron valores p corregidos (valores q).

La latencia se cuantificó como una variable continua entre 0,5 s y 10 s. Se compararon los datos de los tratamientos usando un ANOVA después de una transformación Log para normalizar la distribución (prueba W de Shapiro-Wilk después de la transformación log: $p > 0,05$ de todos los tratamientos para la hipótesis nula que los datos son de una distribución normal), seguido por comparaciones múltiples entre todos los tratamientos y el grupo Control (método de Dunnett). El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el método FDR como se indicó precedentemente. En todos los casos se presentaron valores p corregidos (valores q).

Resultados

Se diseñaron experimentos para evaluar el efecto de deterioro del fipronilo y el efecto protector de los flavonoides kaempferol y rutina y el fenol ácido p-coumárico en abejas mieleras.

Los datos fueron analizados por los atípicos usando las distancias de Mahalanobis que incluyen el puntaje de aprendizaje y de retención de la memoria como variables. Se excluyeron 41 abejas y los análisis finales se condujeron con 353 abejas en los 10 tratamientos (Figura 6): Control (N = 44), Rut (N = 40), Kaemp (N = 38), p-CouA (N = 40), Mezcla (N = 32), Fipro (N = 21), Rut+Fipro (N = 36), Kaemp+Fipro (N = 38), p-CouA+Fipro (N = 34), Mezcla+Fipro (N = 30).

Los resultados muestran que el puntaje de aprendizaje era afectado significativamente por el tratamiento (prueba de Kruskal-Wallis: $X_9 = 65,97$, $p < 0,0001$; Figura 6). Las abejas en el grupo Fipro exhibieron puntajes de aprendizaje significativamente más bajos que las abejas Control ($z = 5,176$, $q = 0,00042$). Las abejas en todos los demás grupos exhibieron puntajes de aprendizaje que no eran significativamente diferentes de las abejas Control (Rut: $z = -2,179$, $q = 0,526$; Kaemp: $z = -1,235$, $q = 0,933$; p-CouA: $z = -0,0159$, $q = 0,933$; Mezcla: $z = -1,218$, $q = 0,933$; Rut+Fipro: $z = 0,005$, $q = 0,933$; Kaemp+Fipro: $z = 1,121$, $q = 0,933$; p-CouA+Fipro: $z = -2,318$, $q = 0,933$; Mezcla+Fipro: $z = -1,975$, $q = 0,284$). Estos resultados constituyen una fuerte evidencia del deterioro del aprendizaje producido por fipronilo y el efecto inocuo de rutina, kaempferol y ácido p-coumárico. Además, la respuesta de las abejas Rut+Fipro, Kaemp+Fipro, p-CouA+Fipro y Mezcla+Fipro demuestra la protección completa por los flavonoides y el ácido fenólico.

Además, un análisis global de la latencia de respuesta indicó un efecto significativo del tratamiento (prueba de Kruskal-Wallis: $X_8 = 23,137$, $p = 0,0032$). Las abejas del grupo Kaemp+Fipro mostraron latencias significativamente más prolongadas que las abejas Control (método de Dunnett: $LSD = 0,045$, $q = 0,009$). Las abejas de todos los demás grupos exhibieron latencias que no eran significativamente diferentes del Control (método de Dunnett: Rut: $LSD = -0,06$, $q = 0,919$; Kaemp: $LSD = -0,01$, $q = 0,232$; p-CouA: $LSD = -0,01$, $q = 0,232$; Mezcla: $LSD = -0,06$, $q = 0,919$; Rut+Fipro: $LSD = -0,09$, $q = 0,919$; p-CouA+Fipro: $LSD = -0,03$, $q = 0,498$; Mezcla+Fipro: $LSD = -0,01$, $q = 0,232$).

Después de 24 h, se encontró un efecto significativo del tratamiento administrado sobre la retención de la memoria (Relación de probabilidades: Chi

cuadrado: 53,09, $p < 0,0001$; Figura 6B). Ninguna de las abejas que recibieron fipronilo mostró una respuesta condicionada, a diferencia del 54,6% de las abejas Control, proporcionando así una fuerte evidencia que la administración del insecticida disminuye significativamente la probabilidad de recordar (prueba de Wald ajustada de dos proporciones para una respuesta PER: diferencia de proporciones de Control-Fipro: 0,545, $q = 0,0004$).

Notablemente, un 85,3% de las abejas en el grupo p-CouA+Fipro, un 42,1% en el grupo Kaemp+Fipro, un 61,1% en el grupo Rut+Fipro y un 56,2% en el grupo Mezcla+Fipro mostraron una respuesta condicionada después de 24 h proporcionando así una fuerte evidencia del efecto protector sobre la memoria de los flavonoides y el ácido p-coumárico. Vale destacar que las abejas en el grupo p-CouA+Fipro exhibieron una probabilidad significativamente mayor de presentar una respuesta condicionada que las abejas Control (prueba de Wald ajustada de dos proporciones: diferencia de proporciones del Control-p-CouA+Fipro para una respuesta PER: 0,31, $q = 0,01$). Se estimó que la probabilidad de recordar era 4,8 veces mayor para las abejas p-CouA+Fipro con relación a las abejas Control.

En su conjunto, estos resultados constituyen una evidencia fuerte que la administración de los flavonoides rutina y kaempferol y el ácido fenólico ácido p-coumárico ofrece protección contra el deterioro cognitivo de aprendizaje y memoria inducido por la administración de fipronilo.

Ejemplo 7: Autoadministración *ad libitum* de un flavonoide protege el aprendizaje y la memoria de abejorros contra la administración crónica de fipronilo

Materiales y métodos

Recolección de abejorros; mantenimiento y tratamientos experimentales

Se mantuvo una colonia del abejorro *Bombus impatiens* (Koppert Inc) en condiciones de laboratorio. Las abejas recibieron polen en el interior de los nidos y forrajearon en un alimentador con agua azucarada 1 M fuera del nido. Las abejas se recolectaron sobre el sobre el alimentador y se anestesiaron sobre hielo para luego ser asignados aleatoriamente a uno de dos recipientes de plástico donde se permitió una autoadministración *ad libitum* de una de dos soluciones para 10 abejas en los dos

alimentadores (viales de vidrio con 500 µl de cada solución): i) agua con sacarosa 1 M o ii) rutina 1 µM (Sigma-Aldrich R5143) diluida en agua con sacarosa 1 M. Los alimentadores se rellenaron todos los días durante tres días. La noche del tercer día, se reemplazó uno de los viales por uno nuevo con una de dos soluciones: i) agua con sacarosa 1 M o ii) agua con sacarosa 1M + fipronilo 6 nM. Los alimentadores se rellenaron todos los días durante tres días más, proporcionando así una exposición crónica a fipronilo. La noche del cuarto día, las abejas se anestesiaron con hielo y se restringieron en pipetas de plástico. Por lo tanto, las abejas pertenecían a uno de cuatro tratamientos:

- Control: agua con sacarosa autoadministrada durante seis días

- Rut: rutina autoadministrada durante seis días

- Fipro: agua con sacarosa autoadministrada durante tres días seguido por tres días de agua con sacarosa autoadministrada (un alimentador) y fipronilo (un alimentador).

- Rut+Fipro: rutina autoadministrada durante tres días seguido por tres días de rutina autoadministrada (un alimentador) y fipronilo (un alimentador).

Entrenamiento

Todas las abejas fueron entrenadas de manera ciega para el investigador usando el condicionamiento olfatorio de la respuesta de extensión de la probóscide (PER). Brevemente, las abejas fueron expuestas a una presentación de 1-nonanol (Sigma-Aldrich) durante 10 s. Después de 7 s desde el inicio de la presentación del olor, se estimuló la antena con agua azucarada 1,5 M para generar la PER. Después de la PER, se dejó que las abejas bebieran agua azucarada durante 3 s. Cada presentación apareada era considerada como una prueba de entrenamiento y cada individuo recibió once pruebas de entrenamiento con un intervalo entre pruebas promedio de 10 minutos. Después del entrenamiento, todas las abejas fueron alimentadas con 20 µl de agua azucarada 1 M y se mantuvieron en cajas de plástico durante 24 h hasta la prueba de retención. Para cada prueba, se registró si había una PER condicionada y su latencia en segundos usando un metrónomo (2 Hz). A las 24 horas después de la última prueba de entrenamiento, a las abejas se les presentó el olor condicionado durante 10 s. Se registró

si la abeja exhibía una PER condicionada. Las abejas que no exhibían una PER condicionada fueron estimuladas con agua con sacarosa con el fin de evaluar la motivación.

Recolección de datos y análisis estadístico

Se cuantificó el aprendizaje de cada individuo como la cantidad de respuestas PER condicionadas en todas las pruebas. Por lo tanto, para cada abeja se registró un puntaje de aprendizaje de entre cero y diez (0-10). Se compararon los puntajes en los seis tratamientos usando una prueba de Kruskal-Wallis dado que los datos no seguían una distribución normal y no se pudieron normalizar después de las transformaciones.

Luego se corrieron comparaciones múltiples que comparan el puntaje de aprendizaje con relación a abejas Control usando un método de Steel no paramétrico de una o dos colas dependiendo de las predicciones. Estas comparaciones ofrecieron información acerca del deterioro predicho producido por el fipronilo, el efecto inocuo predicho de rutina y el nivel de protección potencial. El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el método de índice de falsos descubrimientos (FDR-método afinado de dos etapas). En todos los casos se presentaron valores p corregidos (valores q).

La retención de la memoria se cuantificó como una variable nominal (sí/no). Se compararon los datos de los tratamientos usando una prueba de Chi cuadrado, seguido por comparaciones múltiples de todos los tratamientos versus el Control. El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el FDR como se indicó precedentemente. En todos los casos se presentaron valores p corregidos (valores q).

La latencia se cuantificó como una variable continua entre 0,5 s y 10 s. Se compararon los datos de los tratamientos usando un ANOVA después de una transformación Log para normalizar la distribución (prueba W de Shapiro-Wilk después de la transformación log: $p > 0,05$ de todos los tratamientos para la hipótesis nula que los datos son de una distribución normal), seguido por comparaciones múltiples entre todos los tratamientos y el grupo Control. El error debido a las comparaciones múltiples se controló usando el método FDR como se indicó precedentemente. En todos los casos se presentaron valores p corregidos (valores q).

Resultados

Se investigó el efecto protector del flavonol rutina contra los efectos subletales negativos de la exposición crónica a fipronilo usando el condicionamiento de la respuesta de extensión de la probóscide.

Los datos de los atípicos fueron analizados usando las distancias de Mahalanobis que incluyen el puntaje de aprendizaje y de retención de la memoria como variables. Se excluyeron 24 abejas y se condujeron análisis con 75 abejas distribuidas entre cuatro tratamientos: Control (N = 16), Rut (N = 20), Fipro (N = 24), Rut+Fipro (N = 15).

Los resultados muestran que el puntaje de aprendizaje era afectado significativamente por el tratamiento (prueba de Kruskal-Wallis: $X_3 = 18,145$, $p = 0,0004$). Las abejas en el grupo Fipro mostraron un puntaje de aprendizaje significativamente menor que las abejas Control ($z = -3,19$, $q = 0,006$; Figura 7A). Por el contrario, las abejas en el grupo Rut ($z = -0,363$, $q = 0,699$) y el grupo Rut+Fipro ($z = 0,109$, $q = 0,699$) exhibieron puntajes de aprendizaje que no eran significativamente diferentes de las abejas Control (Figura 7A). Estos resultados constituyen una fuerte evidencia del deterioro del aprendizaje producido por fipronilo y el efecto inocuo de rutina. Además, la respuesta de las abejas Rut+Fipro demostraron una protección completa por el flavonoide. Además, una comparación *post-hoc* mostró que las abejas en el grupo Rut+Fipro exhibieron puntajes significativamente más altos que las abejas Fipro ($z = 3,198$, $p = 0,0028$). Por lo tanto, la autoadministración profiláctica de rutina ofreció una protección completa contra el efecto de la administración crónica de fipronilo.

Después de 24 h, se encontró un efecto significativo del tratamiento administrado sobre la retención de la memoria (Relación de probabilidades: Chi cuadrado: 11,43, $p = 0,0096$). Solo un 33,3% de las abejas que reciben fipronilo mostraron una respuesta condicionada, a diferencia del 81,2% de las abejas Control, proporcionando así una fuerte evidencia que la administración de este insecticida disminuye significativamente la probabilidad de recordar (prueba de Wald ajustada de dos proporciones para una respuesta PER: diferencia de proporciones del Control-Fipro: 0,48, $q = 0,0007$; Figura 7B). Se estimó que la probabilidad de recordar era 8,7 veces

mayor para las abejas Control con relación a las abejas Fipro.

Más importante aún, un 66,7% de las abejas en el grupo Rut+Fipro recordó después de 24 h, proporcionando así una fuerte evidencia del efecto protector sobre la memoria del flavonoide con relación a las abejas Fipro (prueba de Wald ajustada de dos proporciones: diferencia de proporciones de Fipro-Rut+Fipro para una respuesta PER: -0,33, $q = 0,0108$ Figura 7B). Se estimó que la probabilidad de recordar era 4 veces mayor para las abejas Rut+Fipro con relación a las abejas Fipro.

En su conjunto, estos resultados constituyen una fuerte evidencia que la autoadministración del flavonoide rutina ofrece protección contra el deterioro cognitivo de aprendizaje y memoria del fipronilo.

Ejemplo 8: Los flavonoides protegen a las abejas mediante estabilización del receptor nACh en un rango más amplio de estados conformacionales que imidacloprid y más próximo al agonista natural por períodos de tiempo más cortos.

Materiales y métodos

Creación de un modelo 3D para el receptor nicotínico de acetilcolina de Apis mellifera a partir de un modelo cristalográfico 3D de Apis mellifera.

Con el fin de modelar el nAChR alfa6 de *A. mellifera*, se consultó la secuencia de aminoácidos en la base de datos NCBI (Elisk et al, *BMC genomics*, 15, 86. 2014) y proteínas Blast contra la base de datos ProteinDataBank (pdb) para encontrar las proteínas más próximas en cuanto a estructura cristalina para usar como molde. La secuencia proteica de *A. mellifera* se alineó usando MUSCLE con cada secuencia de manera individual. Se utilizó MODELLER 9.23 con el plugin PyMod PyMol para construir un complejo de moldes de proteínas y modelar la estructura tridimensional del pentámero nAChR alfa6 de *A. mellifera* (Fisher & Šali, en *Methods in Enzymology*, C.W. Carter y R.M. Sweet, eds. Academic Press, San Diego, 374, 463-493, 2003; Janson y col., *Bioinformatics* (Oxford, Inglaterra), 33(3), 444–446; 2017). Se calcularon cinco modelos y se utilizó el que tenía el menor puntaje DOPE en Loop. Se aplicaron algoritmos de refinamiento para refinar los huecos (faltas de coincidencia) en el modelo.

Unión [Docking] molecular

Se unieron acetilcolina (ACh), imidacloprid (IMI), quercetina (Quer), 4'-fenilflavona y rutina (Rut) a su sitio de unión a ACh e IMI informado (Colquhoun & Silvilotti; *Trends in Neurosciences*, 27(6), 337–344; 2004; Le Questel y col., *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 55, 1–12; 2015). Se analizó y comparó la interacción entre ACh, IMI y los flavonoides con nAChR. La unión [*docking*] molecular (herramientas Autodock4 y Autodock; Morris y col., *Journal of Computational Chemistry* 2009, 16:2785-91. 2009) se realizó entre cada uno de los ligandos y el receptor, y se determinó la energía de conformación mínima (Avogadro 1.2.0 con Open Babel 2.3.90). Se usó el campo de fuerza MMFF94 con la máxima pendiente y 2 pasos por actualización como campo de fuerza evitando la sobreestimación de la energía local (Halgren, *Journal of Computational Chemistry*, 20: 720-729; 1999). Con el fin de preparar el ligando y el receptor para la unión molecular se fijaron las coordenadas de los átomos de los ligandos optimizados para evitar el movimiento de los ligandos. Los archivos complejos completos se exportaron en formato PDB.

Dinámica molecular

La trayectoria del estado nAChR se simuló mediante la creación de una topología GROMACS a partir de los archivos PDB de cada complejo ligando-receptor y la creación de un campo de fuerza AMBER general (GAFF) con minimización de la energía del sistema total previo. Luego, se fijó el sistema complejo con el fin de crear una caja de solvente octahédrica que se llenó con moléculas de agua. La proteína se centró con una distancia máxima de 0,8 nm entre ella y el límite más lejano de la caja. La concentración de iones se fijó en 423 mOsm para que coincidiera con la concentración iónica de la hemolinfa de las abejas de acuerdo con Leonhard, B. & Crailsheim (*Amino Acids*, 17(2), 195–205; 1999). Esta energía del sistema complejo se minimizó nuevamente a -500 kJ/mol/nm como se indica en (Berendsen, der Spoel, & Drunen, *Computer Physics Communications*, 91(1), 43–56. 1995) y se equilibró en las condiciones normales (298,37 K y 1 bar). La simulación se corrió durante 2 microsegundos. Se utilizó la biblioteca de bloques de construcción BioExcel Building Blocks (BioBB) para Python 3.7 para ejecutar todos los procedimientos previos (Andrio y col., *Scientific Data*, 6(1), 169; 2019).

Análisis de la trayectoria

La trayectoria de todo el complejo de ligando-receptor se comparó realizando una reducción dimensional de los datos de la trayectoria por medio de análisis del componente principal. El resumen de las diferentes trayectorias y el tiempo de permanencia en cada estado durante el tiempo de la simulación se obtuvo a partir de los componentes principales (PC) cuya varianza acumulada era superior al 85% (de manera regular hasta el quinto PC). Se identificó un estado conformacional activo en el cual el complejo de acetilcolina-receptor pasaba la mayor cantidad de tiempo y en donde el radio del poro era mayor (Dror y col., *Chemical Reviews*, 117(1), 139–155; 2017). El análisis de la trayectoria se realizó usando la biblioteca MDAAnalysis para Python 3.7 (Beckstein y col., *Proceedings of the 15th Python in Science Conference*, páginas 98–105, Austin, TX, 2016, SIPI, 2017; Beckstein y col., *Journal of Computational Chemistry*, 32, 2319–2327; 2011). Para la comparación, se graficaron los estados conformacionales usando VMD v.1.9.3 (Humphrey, Dalke, & Schulten, *Journal of Molecular Graphics*, 14, 33–38; 1996).

Análisis del canal del poro

Se condujo un análisis del canal del poro en nAChR usando el programa HOLE (Smart y col., *Biophysical Journal*, 65(6): 2455–2460, 1993) con una biblioteca MDAAnalysis, con el fin de evaluar la significancia fisiológica de la interacción entre nAChR y los ligandos. Los estados conformacionales asociados con un diámetro de poro más grande se marcaron como estado activo del canal (es decir, una mayor permeabilidad iónica). El análisis se realizó con los archivos de pasos del análisis de la trayectoria.

Análisis estadístico

Se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras para evaluar las diferencias en la distribución del tiempo transcurrido en el rango de estados conformacionales registrados en el primer PC. La significancia se evaluó con $\alpha = 0,05$. El análisis se condujo usando la biblioteca scikitlearn para Python 3.7 (Duschesnay y col., *Journal of Machine Learning Research*, 12, 2825–2830, 2011)

Resultados

Después de la comparación, se encontraron diferencias estadísticas entre el tiempo transcurrido en el rango de estados conformacionales cuando el nAChR se acopla con imidacloprid, acetilcolina y los flavonoides (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados de la prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras para la comparación de la distribución de los estados conformacionales del nAChR cuando se acopla a diferentes ligandos.

Comparación	Estadística K	Valor p
Imidacloprid-Acetilcolina	0,5523	8,49e-30
Imidacloprid-Quercetina	0,2190	7,94e-5
Imidacloprid-Rutina	0,5142	1,12e-019
Imidacloprid-Rutina	0,2809	1,05e-7
Acetilcolina-Quercetina	0,3666	6,02e-13
Acetilcolina-Rutina	0,1476	0,0204
Acetilcolina-4'-Fenilflavona	0,36666	6,02E-13

El componente principal 1 representaba el 68% de la varianza de las trayectorias. La proteína mostró una diferencia significativa en la distribución de los estados conformacionales en el tiempo al ser expuesta al agonista natural (ACh) y a cualquiera de los agonistas (Figura 1). Tanto imidacloprid (IMI) como los flavonoides estabilizan el estado conformacional del receptor que se superpone estrechamente con el del agonista natural. Sin embargo, su posición está desplazada hacia el estado inactivo. A pesar de ser conformacionalmente cercano, el IMI fija el receptor en una posición más estable y duradera que los flavonoides o el agonista natural (Figura 8 A-D). Esto es un indicador del efecto tóxico de IMI por sobreestimulación del receptor. La distribución de frecuencia de IMI es estadísticamente diferente de la de todos los flavonoides y el agonista (Tabla 3). Por ende, las tres moléculas producen un efecto excitatorio similar. A pesar de ser significativamente diferente en su distribución, el efecto de la quercetina es el más similar al de la acetilcolina (Figura 8B) para el estado conformacional y el tiempo transcurrido en las posiciones activas. El efecto de rutina y 4'-fenilflavona comprende un conjunto más disperso de estados conformacionales en un período de

tiempo más corto (Figura 8C y 8D).

Se cree que estos resultados indican que el agonista natural ejerce su función fisiológica mediante desplazamiento del receptor a una posición subóptima durante un período breve, en tanto IMI lo puede desplazar sobre una posición relacionada de actividad máxima por un período más prolongado (Figura 10). Los flavonoides ocupan estados espaciales y temporales intermedios. Por ende, interactúan/se unen al receptor con una menor probabilidad de apertura del canal. Debido a que los flavonoides se unen al mismo sitio que el IMI, se previene la sobreestimulación del receptor por los flavonoides que compiten por el sitio de unión sin producir el mismo grado de activación.

Estos hallazgos son consistentes con la evidencia de que IMI actúa como un agonista (Decourtye y col., *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78(2), 83–92. 2004) o agonista parcial (Déglise, Grünewald, & Gauthier, *Neuroscience Letters*, 321(1), 13–16; 2002). También explica los efectos neuroprotectores de algunos flavonoides contra el deterioro cognitivo desarrollado por las abejas cuando se las expone a los neonicotinoides (véase, por ejemplo, los Ejemplos anteriores), cuando se observa una interacción de unión competitiva (Wong, Liao, & Berenbaum, *PloS One*, 13(11), 1–15; 2018). Además, es factible un patrón similar en diferentes niveles tal como la interacción de la mitocondria con ambas moléculas. En resumen, estos hallazgos proveen un efecto mecanístico del efecto protector dependiente de la dosis de los flavonoides mencionados. Se cree que los flavonoides con características estructurales similares proveen el efecto observado de la quercetina, rutina o 4'-fenilflavona, dependiendo de su nivel de similitud; por ello, se cree que los resultados se pueden extender a tales moléculas.

A menos que se los defina de otra manera, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente tienen el mismo significado que les da un experto en la materia a la que pertenece la invención divulgada. Las publicaciones citadas en la presente y los materiales por los cuales se citan se incorporan específicamente a modo de referencia.

Los expertos en la materia podrán reconocer o determinar, tan solo con

experimentos de rutina, numerosos equivalentes de las formas de realización específicas que se describen en la presente. Se considera que dichos equivalentes están comprendidos en las siguientes reivindicaciones.