

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**FLAVONOIDES EN LA DIETA: EFECTOS EN EL POTENCIAL BIOLÓGICO,  
MECANISMO DE DEFENSA Y COMUNIDAD MICROBIANA INTESTINAL DE  
LAS ABEJAS (*APIS MELLIFERA* L.)**

**POR**

**Valeria Fernanda Henríquez Bocaz**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE  
2023**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**FLAVONOIDES EN LA DIETA: EFECTOS EN EL POTENCIAL BIOLÓGICO,  
MECANISMO DE DEFENSA Y COMUNIDAD MICROBIANA INTESTINAL DE  
LAS ABEJAS (*APIS MELLIFERA* L.)**

**POR**

**Valeria Fernanda Henríquez Bocaz**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE  
2023**

Aprobada por:

Marisol Vargas C.  
Ing. Agrónomo, Dr.

---

Guía

Profesor Asociado, Nolberto Arismendi S.  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs. Vg., Dr.

---

Asesor

Profesor Asociado, Maria Dolores Lopez.  
Ing. Agrónomo, Dr.

---

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

---

Decano

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción.....	2
Materiales y Métodos.....	5
Resultados y Discusión.....	9
Conclusiones.....	28
Referencias.....	29

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Resultados de sobrevivencia de <i>Apis mellifera</i> alimentadas con flavonoides y saponina, a diferentes concentraciones .....	11
Figura 2	Expresión relativa del gen (A) GASTD1 y (B) Cyp6AS7 en abejas que fueron tratadas con flavonoides, saponina y no tratadas (control).....	14
Figura 3	Expresión relativa del gen (A) GASTD1 y (B) Cyp6AS7 en abejas que fueron tratadas con flavonoides, saponina y no tratadas (control).....	15
Figura 4	Expresión relativa de los genes (A) GASTD1 y (B) Cyp6AS7 en abejas que no fueron tratadas (control) y tratadas con flavonoides.....	16
Figura 5	Carga relativa de bacterias totales en abejas que fueron tratadas con flavonoides, saponina y no tratadas (control).....	20
Figura 6	Carga relativa de <i>Bifidobacterium asteroides</i> en abejas que fueron tratadas con flavonoides, saponina y no tratadas (control).....	21
Figura 7	Carga relativa de <i>Lactobacillus kunkeei</i> en abejas que fueron tratadas con flavonoides, saponina y no tratadas (control).....	23
Figura 8	Carga relativa de (A) bacterias totales, (B) <i>Lactobacillus kunkeei</i> , (C) <i>Bifidobacterium asteroides</i> en abejas que no fueron tratadas (control).....	24
Tabla 1	Lista de partidores específicos de genes utilizados en el análisis de qPCR.	8

## **FLAVONOIDES EN LA DIETA: EFECTOS EN EL POTENCIAL BIOLÓGICO, MECANISMO DE DEFENSA Y COMUNIDAD MICROBIANA INTESTINAL DE LAS ABEJAS (*APIS MELLIFERA* L.)**

FLAVONOIDS IN THE DIET: EFFECTS ON THE BIOLOGICAL POTENTIAL, DEFENSE MECHANISM AND GUT MICROBIAL COMMUNITY OF HONEYBEES (*APIS MELLIFERA* L.)

**Palabras índices adicionales:** sistema inmune, metabolitos secundarios, expresión genética, polinizadores.

### **RESUMEN**

Un conjunto de diversos factores bióticos y abióticos causan una importante pérdida de colonias de *Apis mellifera* L., por esto es necesario desarrollar alternativas para potenciar la salud de las abejas melíferas. Los flavonoides, son compuestos naturales que se encuentran presentes en la dieta de las abejas, a los cuales se les atribuye actividades biológicas beneficiosas para la salud. Este estudio, tuvo como objetivo evaluar la toxicidad aguda y crónica de diferentes flavonoides, midiendo los efectos sobre la sobrevivencia, la expresión de los genes del citocromo P<sub>450</sub> y glutatión-s-transferasa, y también su influencia en la comunidad microbiana intestinal indicadora. A las abejas se les administró de forma oral rutina, pinocembrina, galangina y miricetina a diferentes concentraciones. Todos los flavonoides evaluados no causaron efectos letales en las abejas, además mantuvieron el nivel de expresión de genes Cyp6AS7 y GSTD1 similar al control en todos los periodos evaluados. La carga de bacterias totales y específicas de la microbiota intestinal fue más estable y similar al control a los 5, 10, 15 y 20 días después de la exposición oral. Los resultados indican que los flavonoides evaluados no son tóxicos para las abejas, por lo tanto, se puede incorporar a la dieta en dosis adecuadas.

### **SUMMARY**

A set of diverse biotic and abiotic factors cause a significant loss of *Apis mellifera* L. colonies, so it is necessary to develop alternatives to enhance the health of honey bees. Flavonoids are natural compounds present in the diet of honey bees, which are attributed with beneficial biological activities for health. The aim of this study was to evaluate the acute and chronic toxicity of different flavonoids by measuring their effects on survival, cytochrome P<sub>450</sub> and glutathione-s-transferase gene expression, and their influence on the gut microbial indicator community. Flavonoids such as rutin, pinocembrin, galangin and myricetin were orally administered at different concentrations on adult bees. All flavonoids tested did not cause lethal effects in bees, and maintained the expression level of Cyp6AS7 and GSTD1 genes similar to the control in all periods evaluated. The total and specific bacteria load of the intestinal microbiota was more stable and similar to the control at 5, 10, 15 and 20 days after oral exposure. Our results indicate that the flavonoids tested are not toxic to bees, therefore, they can be incorporated into the diet at adequate doses.

## INTRODUCCIÓN

El origen de la abeja doméstica *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae), se sitúa en Asia, Europa y África (Han *et al.*, 2012). En la actualidad tienen una amplia distribución, se han diseminado por todos los continentes, debido a que generan valiosos productos como miel, propóleo, cera, polen, jalea real, entre otros; además destacan por su rol en la polinización en sistemas naturales y agrícolas (Nader *et al.*, 2021) por lo que son considerados los principales polinizadores manejados en el mundo, razón por la cual son fundamentales para mantener la estabilidad y maximizar la producción agrícola (Geslin *et al.*, 2017) lo que permite además que tenga un valor ecológico y comercial de gran importancia.

En Chile la abeja melífera se encuentra en todo el territorio nacional, según el Sistema Informático Oficial, SIPEC apícola, se estima un total de 1.353.301 colmenas a nivel nacional, el 37,9 % de las cuales se concentran en las regiones del Maule y O'Higgins. En cuanto a las principales actividades que realiza la apicultura, la más importante es la producción de miel, alcanzando el 97,98 %, seguido de la polinización y venta de material vivo con un 25,73 % y 16,27 %

respectivamente (SAG, 2022). Sus productos y servicios son reconocidos a nivel nacional e internacional, contribuyendo al desarrollo del sector apícola.

Durante los últimos años, se han registrado con frecuencia graves pérdidas en colonias de *A. mellifera*. Las causas en el aumento de mortalidad son multifactoriales: pesticidas, cambio climático, agricultura intensiva, pérdida de diversidad de plantas, introducción de especies invasoras, agentes patógenos, nutrición inadecuada e intervención física o química en prácticas apícolas (Neov *et al.*, 2019). Esta situación atrajo el interés de varios investigadores, desde donde surgió el término "Desorden del Colapso de Colmenas" (CCD), fenómeno donde las abejas obreras adultas abandonan lo que parece una colmena sana, a pesar de la presencia de una reina y crías larvianas (Stankus, 2014). Se han presentado los factores ciertamente implicados como, el ácaro parásito externo *Varroa destructor*, el cual se alimenta del cuerpo graso y hemolinfa de las abejas adultas y pupas (Ramsey *et al.*, 2019), y es el principal transmisor de varios virus, entre ellos el virus de las alas deformadas (DWV) (Barroso-Arévalo *et al.*, 2019), el virus de las crías ensacada (SBV), virus de la parálisis aguda (ABPV) entre otros (Grozinger y Flenniken, 2019). Ahora también expandido por casi todos los continentes los hongos microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Neumann y Carreck, 2010), los otros factores se consideran contribuyentes, que debilitan el sistema inmunitario, causando dificultad para combatir las infecciones (Kluser *et al.*, 2010).

Cabe considerar, por otra parte, las abejas melíferas para disminuir en cierta medida los daños causados por estos factores, poseen mecanismos de defensa entre ellas la inmunidad social, caracterizada por el comportamiento cooperativo, por ejemplo, el uso de propóleo, sustancia ensamblada compuesta por resinas vegetal, sirve como capa antimicrobiana, protege a las crías y reduce la intensidad de la infección a nivel de colonia (Borba y Spivak, 2017). Este tipo de estrategias disminuye la presión sobre el sistema inmune individual de las abejas, que incluye barreras físicas como cutícula y mucosa, respuestas celulares y humorales (Larsen *et al.*, 2019). Incluso, en comparación con el sistema inmune de otros insectos, el genoma de la abeja tiene un menor número de genes que codifican proteínas, esto se puede notar en las principales superfamilias de enzimas involucradas en el

mecanismos de defensa frente a los efectos adversos de las toxinas naturales y sintéticas, como son la glutatión-S-transferasas (GST), monooxigenasas del citocromo P<sub>450</sub> (P<sub>450</sub>) y carboxilo/colinesterasa (CCE), que se reducen aproximadamente a la mitad en las abejas (Claudianos *et al.*, 2006). Se ha demostrado que grupos de genes de P<sub>450</sub> y GST desempeñan un papel clave en la detoxificación, especialmente de insecticidas (Gong *et al.*, 2017). Además, la inducción de la actividad de GST y P<sub>450</sub> se han utilizado como biomarcadores, un fenómeno en el que la producción de enzimas desintoxicantes aumenta en respuesta a la exposición a toxinas (García *et al.*, 2017).

De igual importancia, se encuentra la microbiota intestinal que contribuye a la digestión de los alimentos, fortalece las barreras contra patógenos, modula el sistema inmune y la comunicación (Engel y Moran, 2013). El sistema digestivo de *A. mellifera* tienen una microbiota distintiva y especializada, dominada por nueve grupos de especies bacterianas que comprenden entre el 95-99.9 % de las bacterias en casi todos los individuos; estos incluyen bacterias como: *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Frischella perrara*, *Bartonella apis* y *Parasaccharibacter apium*, además de otras especies menos frecuentes (Kwong y Moran, 2016). Las bacterias intestinales, provienen de su hábitat natural y de la ingesta de alimentos, néctar, polen y agua (Royan, 2019).

El néctar, polen y propóleo son ricos en diversos fitoquímicos que incluyen polifenoles, ácidos fenólicos y flavonoides, debido a la presencia de estos compuestos, se les atribuye un fuerte potencial antioxidante y antibacteriano (Mohdaly *et al.*, 2015). Algunos trabajos previamente realizados en Chile, demostraron que extractos metanólicos de plantas nativas y propóleos presentaron actividades antimicrobiales para *N. ceranae* (Arismendi *et al.*, 2018) en dicho trabajo se identificaron y cuantificaron flavonoides como la rutina, miricetina, galangina y pinocembrina que se presentaron en mayor proporción, los cuales han sido probados en otros tipos de patologías, dando como resultado un efecto antimicrobiano y antifúngico dependiente de la concentración (Cushnie y Lamb, 2005; Curifuta *et al.*, 2012). Dado que los flavonoides son metabolitos secundarios que las plantas desarrollan como defensa química contra patógenos y herbívoros,

pueden ser compuestos potencialmente tóxicos (Mithöfer y Boland, 2012). Debido a esto, antes de evaluar la capacidad antimicrobiana de estos flavonoides puros sobre patógenos en abejas, ya que puede ser útil, por ejemplo, en el control de *N. ceranae*, es necesario evaluar el efecto que podrían causar sobre las mismas abejas.

Dado los antecedentes expuestos, es necesario explorar nuevas alternativas para mejorar las resistencias de la abeja melífera y atenuar el agotamiento de la colmena. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los flavonoides rutina, miricetina, galangina y pinocembrina sobre la sobrevivencia, en el mecanismo de defensa y la comunidad microbiana intestinal indicadora en las abejas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Ensayos en condiciones controladas**

#### **Recolección de abejas**

Para evaluar sobrevivencia, toxicidad y efectos en comunidad microbiana intestinal de los flavonoides en *A. mellifera*, se realizaron ensayos en condiciones controladas de acuerdo a lo descrito por Arismendi *et al.* (2018). Las abejas melíferas se obtuvieron de colmenas tipo Langstroth, ubicadas en el campo experimental El Nogal, Universidad de Concepción, Chillán. La selección se basó en cantidad de oviposición y estado sanitario, por esta razón se analizaron con anterioridad en función de patologías, microsporidios, virus y tripanosomas de acuerdo con la metodología descrita por Vargas *et al.* (2017). Se retiraron marcos con crías de abejas obreras operculadas de colonias sanas, que fueron llevados al laboratorio de patología apícola, allí se mantuvieron en condiciones controladas (30 °C con 50-60 % de HR) para generar uniformidad en la emergencia de las obreras. Luego, se colectaron las abejas obreras recién emergidas (< 2 días de edad) del marco de cría, las cuales fueron transferidas a jaulas plásticas para su posterior uso en los bioensayos.

#### **Sobrevivencia y efecto tóxico de flavonoides en *Apis mellifera***

Los flavonoides purificados, rutina, miricetina, galangina y pinocembrina, como también saponina que fueron utilizados se adquirieron en Merck Chile SA (Merk

Millipore corporation, EE. UU.). Para evaluar la toxicidad, se mezclaron cada flavonoide por sí solo en porcentajes de 4, 8 y 16 %, en un jarabe de sacarosa al 60 %. Estos porcentajes se determinaron previamente utilizando extractos crudos chilenos semisólidos de hojas de plantas y propóleos (Arismendi *et al.*, 2018). Los tratamientos utilizados en el bioensayo fueron: (1) rutina, (2) miricetina, (3) galangina, (4) pinocembrina, (5) abejas sin exposición a flavonoides (control) y también se consideró un tratamiento con (6) saponina (control tóxico) en porcentajes de 4, 8 y 16 %. Las abejas recién emergidas (2 días de edad) fueron expuestas individualmente a cada tratamiento de acuerdo a metodología descrita por Porrini *et al.* (2013) y luego, se transfirieron a jaulas plásticas (1000 cc) grupos de 65 abejas, con 4 repeticiones por tratamiento. Aquellas abejas que no consumieron en su totalidad la suspensión, fueron descartadas del ensayo. Posteriormente, las abejas en tratamiento fueron alimentadas *ad libitum* con sustituto de polen y jarabe de sacarosa (60 %) hasta final del experimento. La sobrevivencia se revisó diariamente y al mismo tiempo, se retiraron y cuantificaron las abejas muertas de cada jaula. Para ello se cuantificó (sobrevivencia) en el mismo ensayo, un posible efecto tóxico (toxicidad aguda) de los flavonoides dentro de las primeras 72 horas post-exposición, pero también, se evaluó efectos tóxicos a mediano-largo plazo (toxicidad crónica) hasta los 20 días (480 horas) después de la exposición oral a cada uno de los tratamientos.

### **Expresión de genes detoxificantes y carga bacteriana**

En el mismo ensayo antes mencionado, se evaluaron los posibles efectos de toxicidad, utilizando como indicadores genes que participan en la expresión de las enzimas detoxificantes P<sub>450</sub> y GST: gen Cyp6AS7 (P<sub>450</sub>) (Schwarz *et al.*, 2016) y GSTD1 (GST) (Schmehl *et al.*, 2014), así también se evaluaron los efectos en bacterias indicadoras intestinales como *L. kunkeei* y *B. asteroides* en abejas tratadas con flavonoides y tratamiento control. Para ello, se colectaron 5 abejas vivas de cada jaula a las 2, 12, 24, 48 y 72 horas después de la exposición oral (toxicidad aguda) además, se colectaron 5 abejas vivas de cada jaula a los 5, 10, 15 y 20 días después de la exposición oral (toxicidad crónica), considerando que el efecto de los flavonoides pueden ser crónicos, especialmente en el desarrollo

poblacional de las bacterias indicadoras intestinales. Estas abejas seleccionadas fueron en seguida congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADNc**

Para determinar la carga natural de bacterias indicadoras intestinales y la expresión de genes indicadores de toxicidad en abejas tratadas con flavonoides y control, se utilizaron las 5 abejas removidas por jaula, previamente congeladas, se separó el abdomen (5 abdómenes por muestra) del resto del cuerpo, para luego ser triturado y homogenizado en un mortero esterilizado con 5 mL de solución salina (PBS 1X). Luego 200  $\mu\text{L}$  del macerado se traspasaron a un tubo de 1,5 mL, agregando 600  $\mu\text{L}$  de Trizol, seguido de una centrifugación a 10.000 g durante 1 minuto. Del sobrenadante, 200  $\mu\text{L}$  fueron utilizados para la extracción de ARN de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el kit I de ARN total de EZNA (Omega Bio-Tek, Norcross, Georgia, EE. UU.). El ARN extraído se utilizó para la síntesis de ADN copia (ADNc) mediante la enzima transcriptasa inversa M-MLV de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.). Para la extracción de ADN se utilizaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto precipitado, siguiendo las instrucciones del kit de ADN de insectos EZNA (Omega, Bio-Tek). Las muestras de ADN y ADNc se mantuvieron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### **PCR en tiempo real**

Para cuantificar la carga de bacterias indicadoras y la expresión de genes de detoxificación se utilizó ADN y ADNc, respectivamente. Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se llevaron a cabo en 15  $\mu\text{L}$ , que contenían 20 ng de ADN o ADNc, 1X de KAPA SYBR FAST Universal 2X (Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, EE. UU.), 530 nM de partidores específicos (Tabla 1) y completado con agua purificada de grado molecular. Las condiciones térmicas de reacción fueron un ciclo a  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, seguido de 40 ciclos a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 s y  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 s. Se realizó un análisis de disociación para detectar los problemas de dímeros y amplicones inespecíficos por parte de los partidores utilizados y así detectar falsos positivos en cada reacción. Las reacciones de qPCR se realizaron en un termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.) y los datos se analizaron utilizando

el software MxPro (Stratagene). La cuantificación de ADN bacterial se realizó con partidores específicos desarrollados en el Laboratorio de Virología y Patología Apícola, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción.

Tabla 1. Lista de partidores específicos de genes utilizados en el análisis de qPCR

Nombre	Partidores (5' → 3')	Referencias
GSTD1 F	GCCGCTTCAAAAGAAGTACG	Schmehl <i>et al.</i> , 2014
GSTD1 R	GTGGCGAAAACAAGGATGAT	Schmehl <i>et al.</i> , 2014
Cyp6AS7 (P <sub>450</sub> ) F	GCCAACCGCGGAATTCCTAT	Schwarz <i>et al.</i> , 2016
Cyp6AS7 (P <sub>450</sub> ) R	GCCAGATGTGAATACTGGCGA	Schwarz <i>et al.</i> , 2016
16SrRNA F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Schwarz <i>et al.</i> , 2016
16SrRNAR	CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	Schwarz <i>et al.</i> , 2016
LactKun3F	GAGGAAGTGCAGTGGAACTACA	En presente estudio
LactKun3R	CGGAAACCCTCCAACACCTAGTAT	En presente estudio
Bast-F	AAGCTTGCTTGCTTGGCGGTGAGA	En presente estudio
Bast-R	CATCCCATGCCGGTAAACCCTTTC	En presente estudio

### Análisis estadístico

La diferencia en la sobrevivencia de las abejas tratadas y no tratadas con los flavonoides y medidas en el tiempo fue estimada mediante ANOVA de medidas repetidas en el tiempo, siendo las variables independientes los flavonoides (y los respectivos controles) según concentración evaluada, siendo además, la sobrevivencia (%), la variable de respuesta. Las medias entre los tratamientos fueron separadas mediante la prueba de Dunnett ( $p < 0,05$ ). En forma similar, la diferencia en la expresión de los genes de detoxificación (Cyp6AS7 y GSTD1) y la carga total y de bacterias indicadoras intestinales (*L. kunkeei* y *B. asteroides*) fueron estimados a través de un análisis de varianza 1-vía considerando las variables independientes los flavonoides y las dosis en función a los tiempos de evaluación.

A continuación, se separaron las medias de los tratamientos y comparadas con el grupo control mediante la prueba de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados con el programa Statistica 7.0 (Statsoft).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

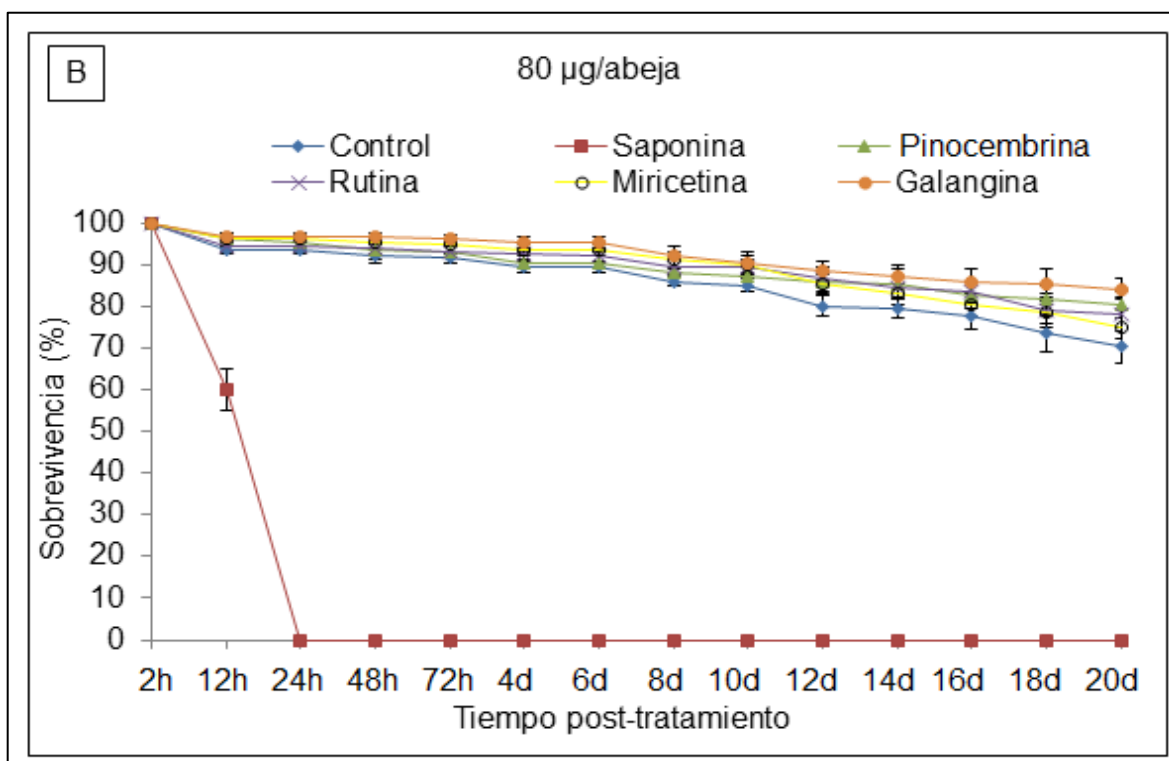
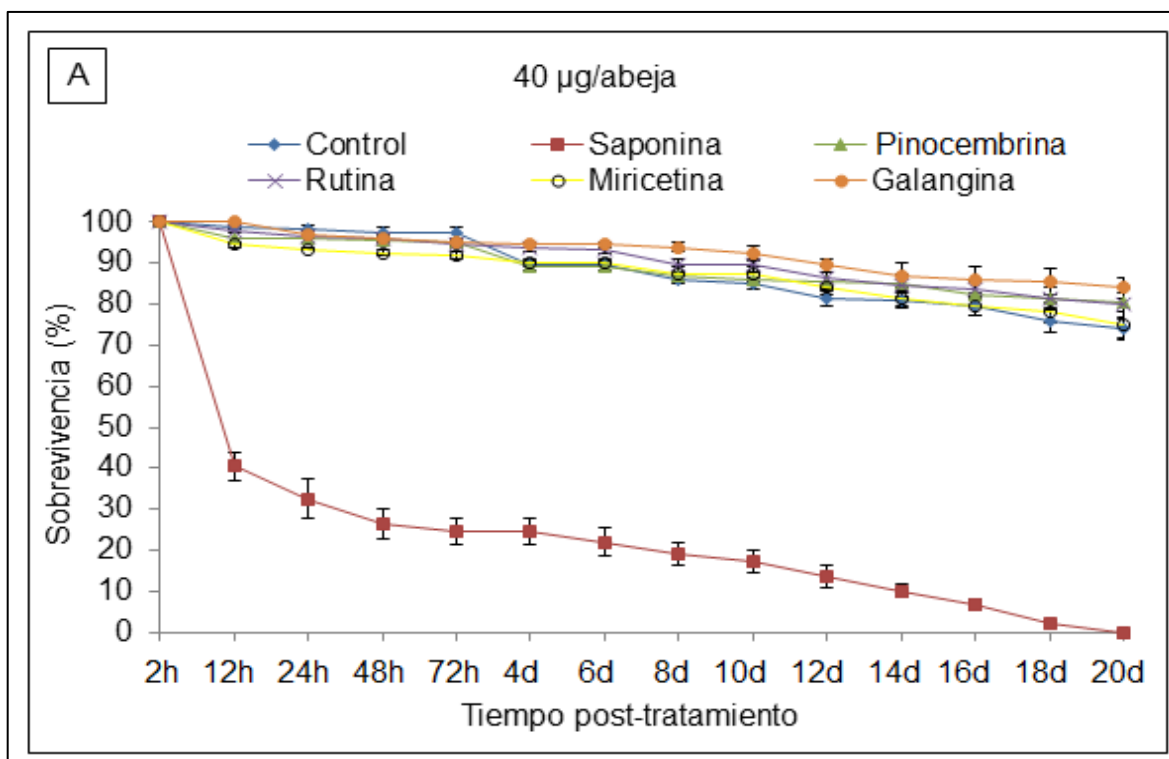
En el análisis de toxicidad para las abejas obreras, evaluado mediante la administración oral de flavonoides (rutina, miricetina, galangina y pinocebrina), a diferentes concentraciones ((A) 40, (B) 80 y (C) 160  $\mu\text{g abeja}^{-1}$ ) por una sola vez y medida hasta los 20 días (480 h) post-alimentación, incluyendo abejas no tratadas (control), no se observó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos transcurrido los 20 días de medición para 40  $\mu\text{g abeja}^{-1}$  (ANOVA tratamiento x tiempo  $F = 1,07$ ;  $p = 0,372$ ;  $GL = 48/180$ ) y 80  $\mu\text{g abeja}^{-1}$  (ANOVA tratamiento x tiempo  $F = 0,85$ ;  $p = 0,739$ ;  $GL = 48/180$ ) (Figura 1A y 1B). Si se presentan diferencias significativas a 160  $\mu\text{g abeja}^{-1}$  (ANOVA tratamiento x tiempo  $F = 1,45$ ;  $p = 0,044$ ;  $GL = 48/180$ ), especialmente los últimos días del experimento (Figura 1C). No obstante aquello, los flavonoides no mostraron efecto tóxico, ni siquiera cuando se probaron con la concentración más elevadas, sólo el tratamiento con saponina fue letal para las abejas, presentando una mortalidad rápida en las primeras horas post-exposición (Figura 1A, 1B y 1C).

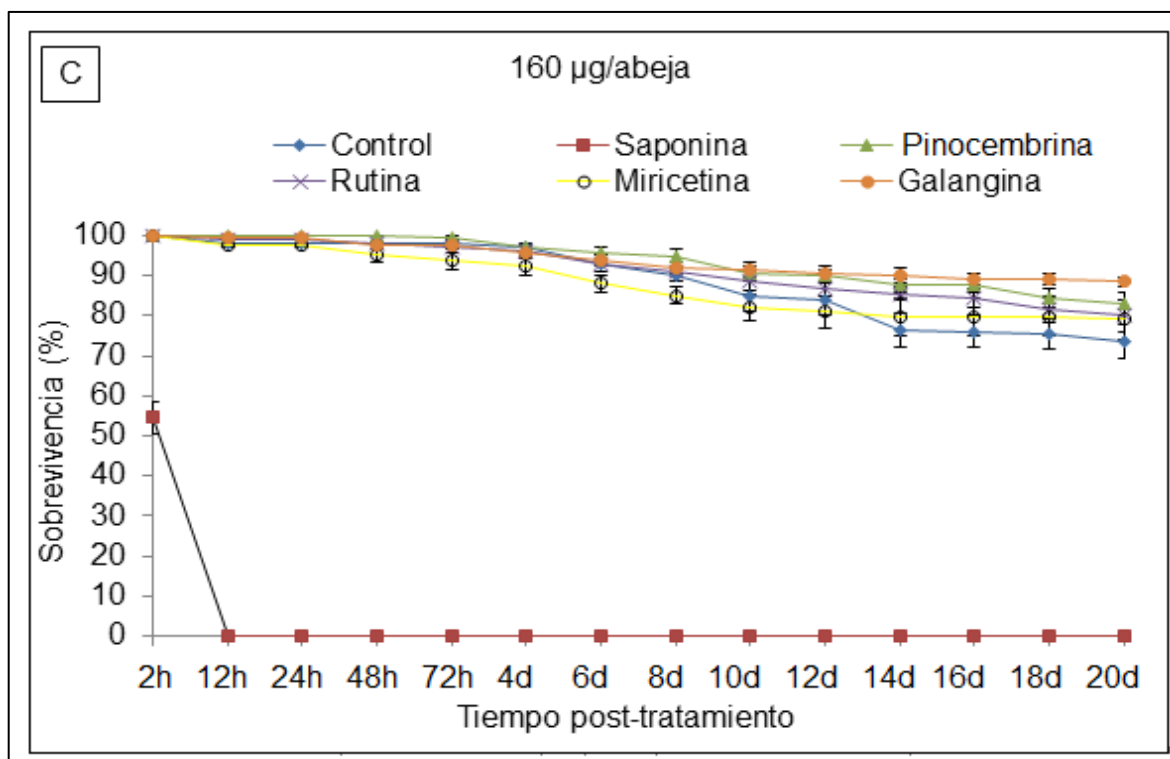
De hecho, el 100 % de las abejas murieron en las primeras 12 a 24 horas expuestas a la concentración más altas (Figura 1A y 1B). Debido a este efecto, este tratamiento fue sacado del modelo estadístico para evitar interpretaciones erróneas del análisis general. No obstante, dicha información fue presentada gráficamente para visualizar los cambios en la sobrevivencia de aquellas abejas que fueron tratadas con flavonoides y de aquellas tratadas con saponina. Por el contrario, las abejas tratadas con flavonoides a diferentes concentraciones mostraron una sobrevivencia al final del ensayo (20 días post-exposición) superior al 75 %. Se observó que los tratamientos con pinocebrina y galangina a la concentración más alta mostraron una sobrevivencia de 83 % y 89 % respectivamente, siendo ligeramente mayor que el control (abejas no tratadas con flavonoides), cuya sobrevivencia fue del 74 % al finalizar el ensayo (Figura 1C).

Estos resultados indican que el extracto de saponina tiene un nivel de toxicidad para *A. mellifera*. Se ha descrito un comportamiento similar, donde las saponinas de *Quillaja saponaria* causa mortalidad en ciertos insectos como *Acyrtosiphon pisum*, en este estudio la exposición de *A. pisum* a las saponinas incorporadas a la dieta artificial afectó a la supervivencia de los pulgones de forma dependiente de la concentración. Además, evaluaron el efecto sobre las células del epitelio del intestino medio, las cuales resultaron dañadas o destruidas, causando inanición y finalmente la muerte (De Geyter *et al.*, 2012). Zaynab *et al.* (2021) describe diversos efectos tóxicos de las saponinas contra las bacterias, hongos, patógenos e insectos, incluye su potencial detergente que aumenta la permeabilidad de la membrana celular, la formación de poros y su capacidad para producir complejos con esteroides en la membrana celular e inducir la ruptura o la pérdida de la integridad de la membrana. Estos modos de acción podrían influir y ser lo que afectaría negativamente la sobrevivencia en *Apis mellifera*. Por el contrario, los ensayos sugieren que la galangina y pinocembrina pueden mejorar la tasa de sobrevivencia de las abejas.

En la misma línea, Voigt y Rademacher (2015) como parte de su estudio comprobaron que en el estado larvario de las abejas igual existe tolerancia a la aplicación de pinocembrina, donde se usó  $15 \mu\text{g larva}^{-1}$ , los resultados indicaron una mortalidad muy baja e incluso ninguna mortalidad en el estado larvario más avanzado. Con respecto a la galangina, no hay estudios previos sobre sus efectos en la sobrevivencia en abeja, pero si se ha probado en ratones, con lesiones pulmonares agudas inducidas por lipopolisacárido, donde el tratamiento con galangina ( $15 \text{ mg/kg}$ ) mejoró la tasa de sobrevivencia hasta el 83,3 %, a diferencia del grupo control con 33,3 %.

Figura 1. Resultados de sobrevivencia de *Apis mellifera* alimentadas con flavonoides y saponina, a diferentes concentraciones (A) 40, (B) 80 y (C)  $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ . También se incluyó abejas no tratadas (control).





Las barras en cada punto de medición y en cada tratamiento indican el error estándar según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ) y después de un análisis de varianza en cada período de medición (ANOVA de medidas repetidas,  $p < 0,05$ ).

Además, se demostró que galangina disminuyó los parámetros bioquímicos del estrés oxidativo y la inflamación, mejorando también, la oxigenación y el edema pulmonar (Shu *et al.*, 2014).

En cuanto a la expresión relativa del gen GASTD1 y Cyp6AS7 asociados a la enzimas detoxificantes GST y P<sub>450</sub>, respectivamente, en abejas tratadas con flavonoides, tratadas con saponina y abejas sin tratar (control) para determinar la toxicidad aguda, a una concentración de 40 µg abeja<sup>-1</sup> en todos los periodos medidos, fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA 1-vía con objetivo de detectar posibles diferencias en la expresión de estos genes en abejas que fueron tratadas con flavonoides y con aquellas no tratadas (control). En este sentido, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de relativa del gen GASTD1 en abejas tratadas con flavonoides a las 2 (F= 2,17; p = 0,103; GL = 5/18), 12 (F= 0,92; p = 0,487; GL = 5/18), 24 (F= 2,20; p = 0,099; GL = 5/18), 48 (F= 0,64; p = 0,675; GL = 5/16) y 72 (F= 1,67; p = 0,198; GL = 5/16) horas post-exposición (Figura 2A). En forma similar, no se detectaron diferencias significativas en la

expresión relativa del gen Cyp6AS7 medido a las 2 ( $F=0,72$ ;  $p = 0,585$ ;  $GL = 5/18$ ), 12 ( $F= 1,60$   $p = 0,211$ ;  $GL = 5/18$ ), 24 ( $F= 1,54$ ;  $p = 0,227$ ;  $GL = 5/18$ ), 48 ( $F= 1,51$ ;  $p = 0,242$ ;  $GL = 5/16$ ) y 72 ( $F= 0,67$ ;  $p = 0,649$ ;  $GL = 5/16$ ) horas post-exposición (Figura 2B). Si bien las abejas tratadas con saponinas tienden a aumentar la expresión relativa de ambos genes de detoxificación en las primeras 24 horas de medición (Figura 2A y 2B), no se observan cambios significativos con respecto al grupo control.

Cuando las abejas fueron tratadas con una concentración más alta ( $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ ) de flavonoides, incluyendo saponinas (Figura 3A y 3B), a las 2 horas post-alimentación, se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $F = 4,99$ ;  $p = 0.004$ ;  $GL = 5/18$ ). Dicha diferencia sólo se ve reflejado en un aumento de expresión del gen GASTD1 cuando las abejas fueron expuestas a dietas con saponinas y comparadas con el grupo control (Figura 3A). No obstante, estas diferencias en la expresión de este gen no se repite a las 12 ( $F = 2,23$ ;  $p = 0,095$ ;  $GL = 5/18$ ), 24 ( $F = 0,22$ ;  $p = 0,921$ ;  $GL = 5/18$ ), 48 ( $F = 0,47$ ;  $p = 0,754$ ;  $GL = 4/15$ ) y 72 horas ( $F = 1,44$ ;  $p = 0,270$ ;  $GL = 4/15$ ) post-alimentación tanto para abejas expuestas a saponinas, como a flavonoides (Figura 3A).

En el sentido de determinar los posibles efectos crónicos de flavonoides sobre las abejas y en una concentración alta ( $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ ), se evaluaron efectos en la expresión relativa de los genes GASTD1 y Cyp6AS7 hasta los 20 días post-alimentación. En los 5 días post-alimentación, galangina tiende a aumentar la expresión relativa de los genes GASTD1 y Cyp6AS7 en las abejas tratadas (Figura 4A y 4B). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos medido a los 5 ( $F = 2,08$ ;  $p = 0,134$ ;  $GL = 4/15$ ), 10 ( $F = 1,50$ ;  $p = 0,253$ ;  $GL = 4/15$ ), 15 ( $F = 1,64$ ;  $p = 0,217$ ;  $GL = 4/15$ ) y 20 días ( $F = 0,53$ ;  $p = 0,714$ ;  $GL = 4/15$ ) post-tratamiento. Es necesario indicar que el tratamiento con saponinas fue excluido del análisis debido que las abejas murieron las primeras 12 horas, por lo tanto, no fue posible evaluar efectos crónicos en función a los genes GASTD1 y Cyp6AS7 en abejas tratadas. En general estos flavonoides mantienen estable la expresión relativa de los genes asociados a las enzimas detoxificantes GST y P<sub>450</sub> en comparación con las abejas no tratadas.

Figura 2. Expresión relativa del gen (A) GASTD1 y (B) Cyp6AS7 en abejas que fueron tratadas con flavonoides, saponina y no tratadas (control) a una concentración de  $40 \mu\text{g abeja}^{-1}$ , medido a las 2, 12, 24, 48 y 72 horas post-alimentación.

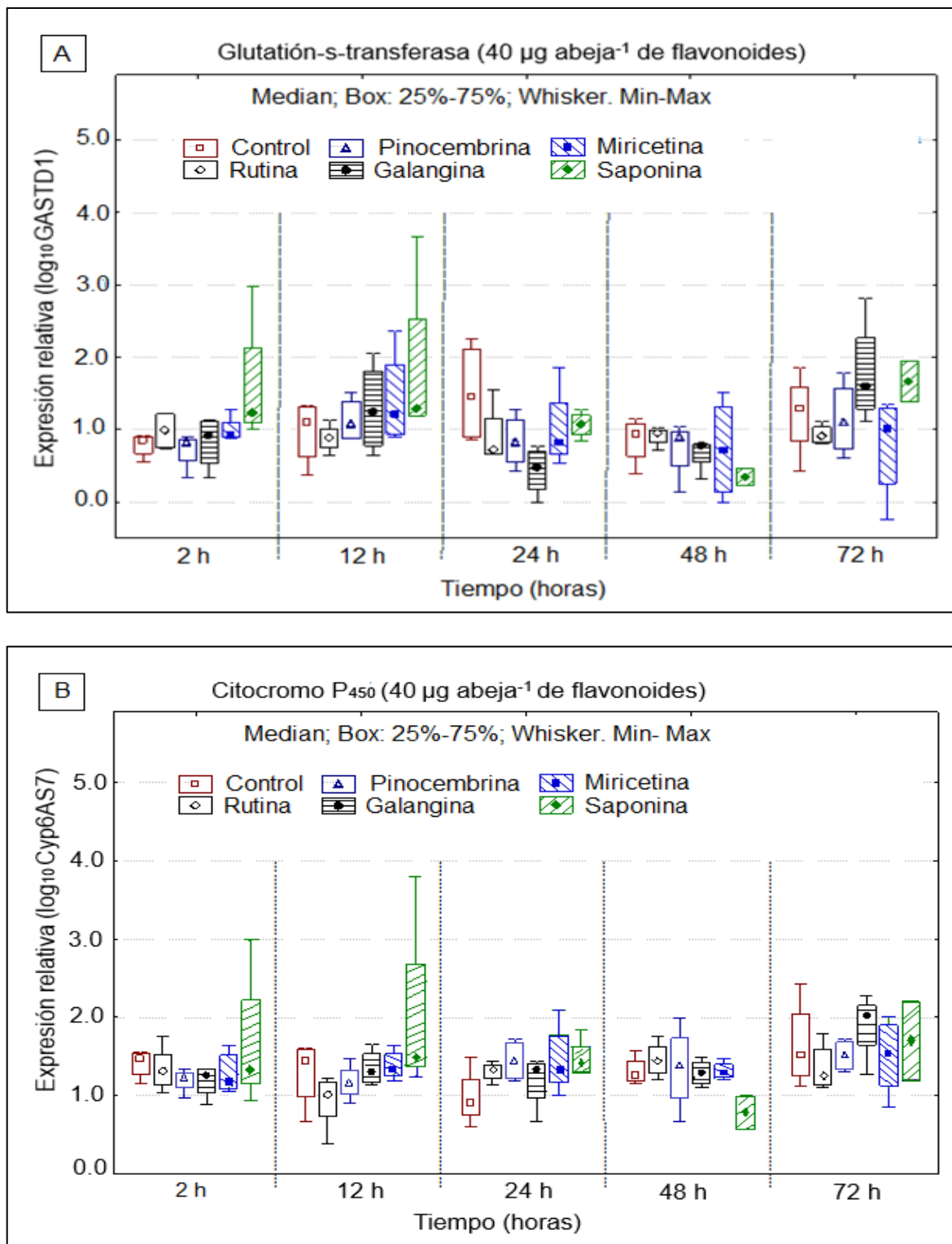
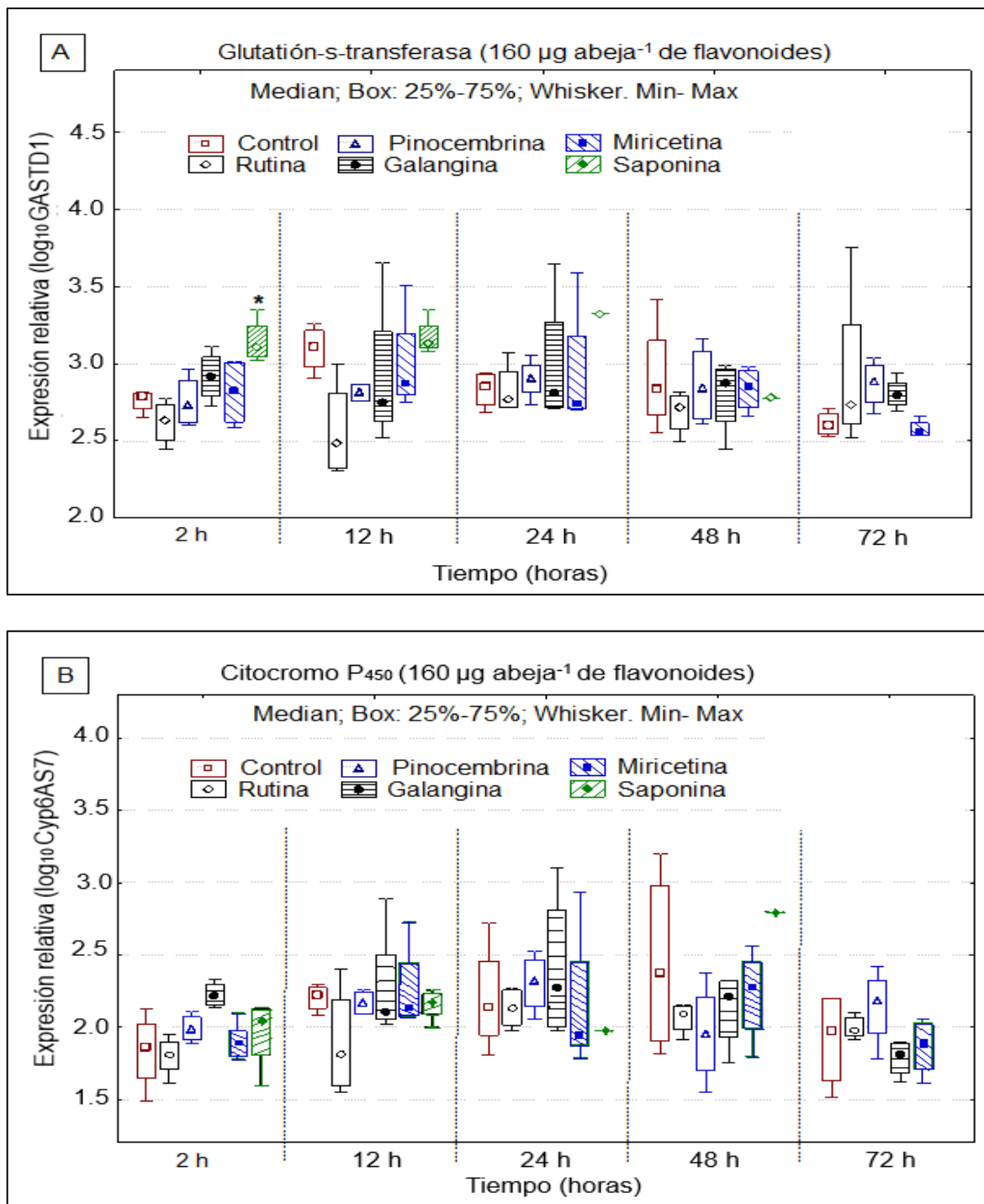
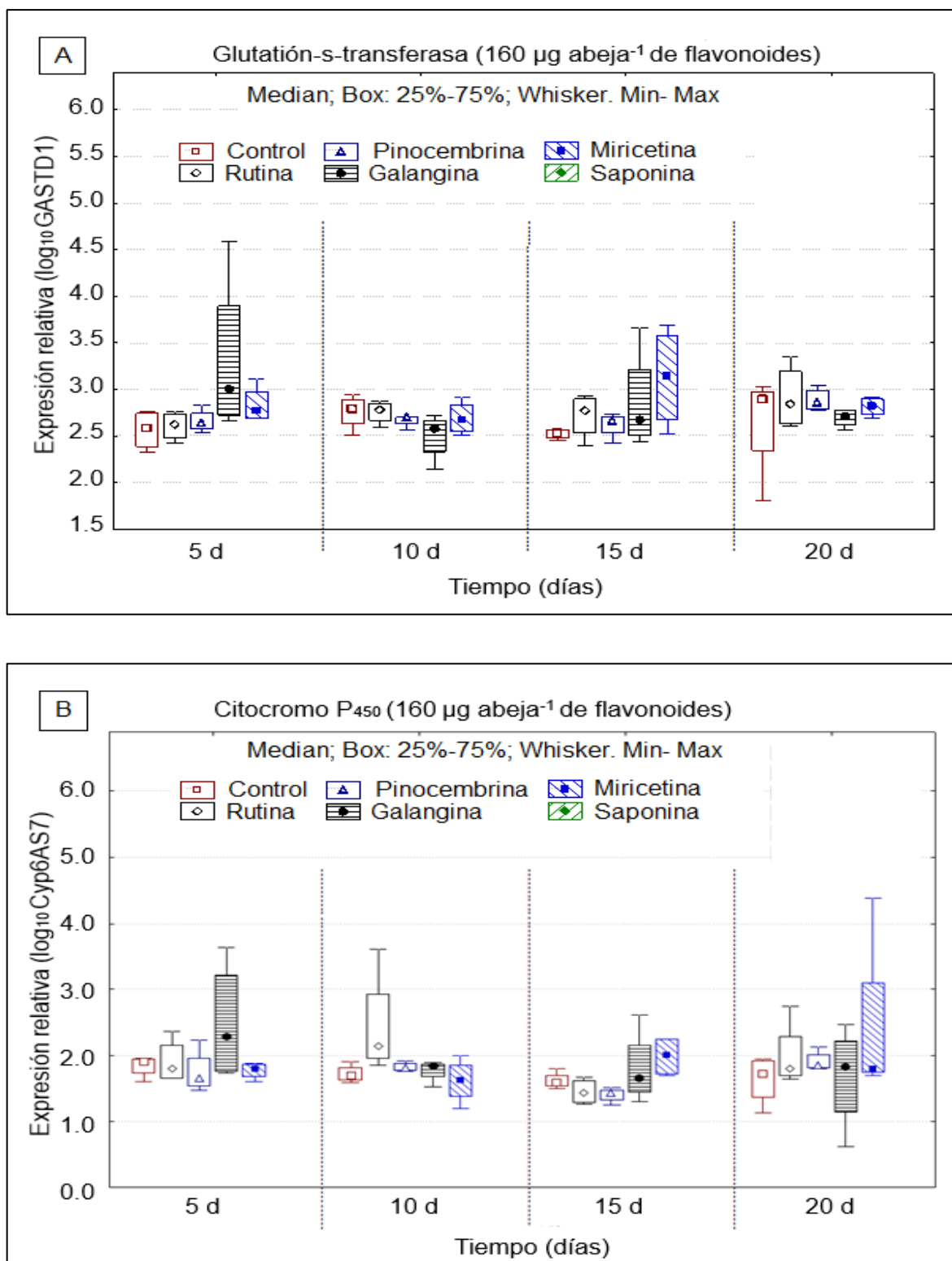


Figura 3. Expresión relativa del gen (A) GASTD1 y (B) Cyp6AS7 en abejas que fueron tratadas con flavonoides, saponina y no tratadas (control) a una concentración de  $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ , medido a las 2, 12, 24, 48, 72 horas post-alimentación.



El asterisco en cada barra indica diferencias estadísticas con respecto al tratamiento control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ) y después de un análisis de ANOVA 1-vía en cada período de medición.

Figura 4. Expresión relativa de los genes (A) GASTD1 y (B) Cyp6AS7 en abejas que no fueron tratadas (control) y tratadas con flavonoides a una concentración de  $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ , medido a los 5, 10, 15 y 20 días post-alimentación.



Johnson *et al.* (2012) han reportado que los extractos de miel, polen y propóleos aumentan los genes de las subfamilias Cyp6AS, a su vez, demostraron que las abejas con una dieta que contenía miel, mejoraron su nivel de sobrevivencia y aumentaron la capacidad para tolerar la aflatoxina (toxina producida por ciertos hongos), posiblemente a través de la inducción de P<sub>450</sub> capaces de desintoxicar esta micotoxina. Del mismo modo los resultados de este estudio mostraron que los flavonoides afectan positivamente la tasa de sobrevivencia y con una tendencia a inducir, en algunos casos, la expresión de los genes Cyp6AS7.

Desde otra perspectiva, también puede producirse una inhibición competitiva, el hecho de que las abejas melíferas metabolizan los acaricidas con enzimas que también metabolizan los flavonoides de la dieta, plantea la posibilidad de interacciones sinérgicas o antagónicas (Johnson, 2015). Como primer paso en este estudio demostró que las dosis probadas de flavonoides tienen un efecto mínimo en la expresión de genes detoxificantes, evidentemente, la siguiente fase es investigar cómo interactúan con otros elementos a los que se exponen constantemente las abejas. Por ejemplo, el estudio de Wong *et al.* (2018) revelan que el uso de ácido *p*-cumárico (ácido fenólico) y la quercetina (flavonol), prolongaron la longevidad de las abejas sin presencia de pesticidas y son beneficiosos para las abejas que ingieren imidacloprid en concentraciones bajas (45 ppb), pero perjudiciales cuando las concentraciones de imidacloprid alcanzan niveles más altos (105 y 135 ppb).

En *A. mellifera* principalmente se ha evaluado la actividad de GST para demostrar la toxicidad de tratamientos químicos contra patógenos. De acuerdo a Rouibi *et al.* (2016) determinaron los efectos negativos de dos acaricidas, el fluvalinato (sintético), y el ácido oxálico (natural). Se observó que las abejas de colmenas expuestas a fluvalinato, presentaron un aumento de la actividad específica de GST, a diferencia del ácido oxálico no tuvo efectos sobre la actividad de GST en los diferentes tiempos de exposición en comparación con abejas sin tratar. Esto apoya la idea, que las abejas no están expuestas a un estrés tóxico cuando son alimentadas con los flavonoides.

La comunidad microbiana intestinal de las abejas juegan un rol esencial en aspectos de metabolismo, inmunológico, crecimiento y el desarrollo y la protección

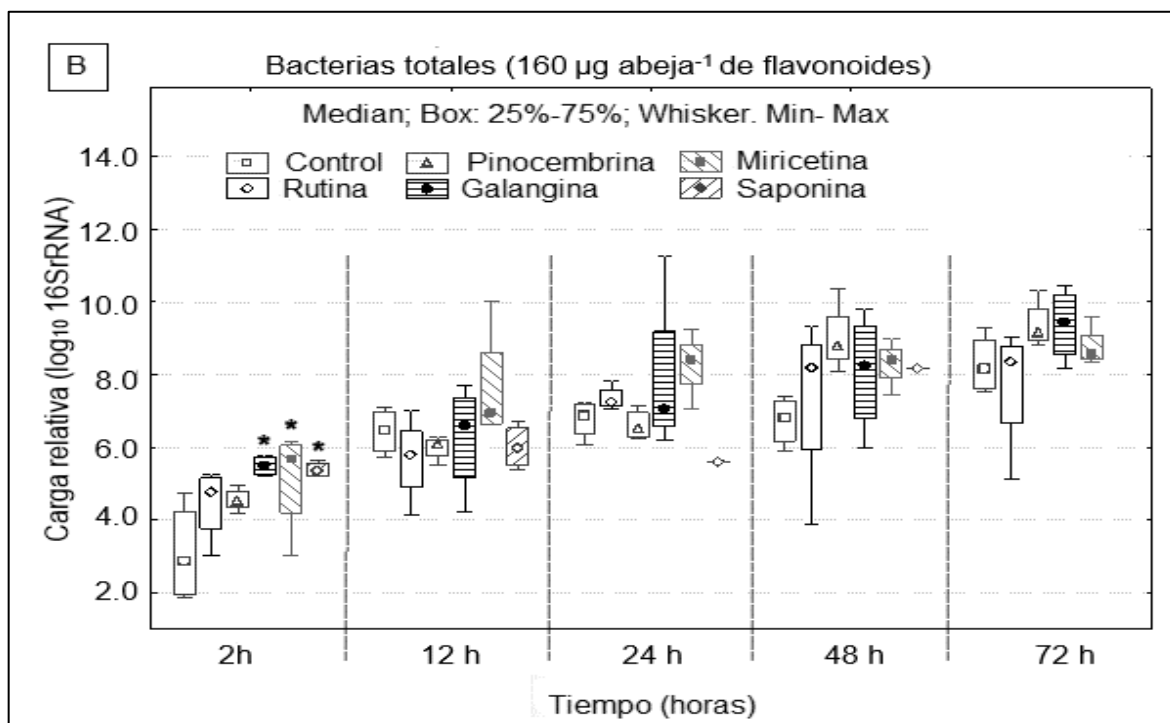
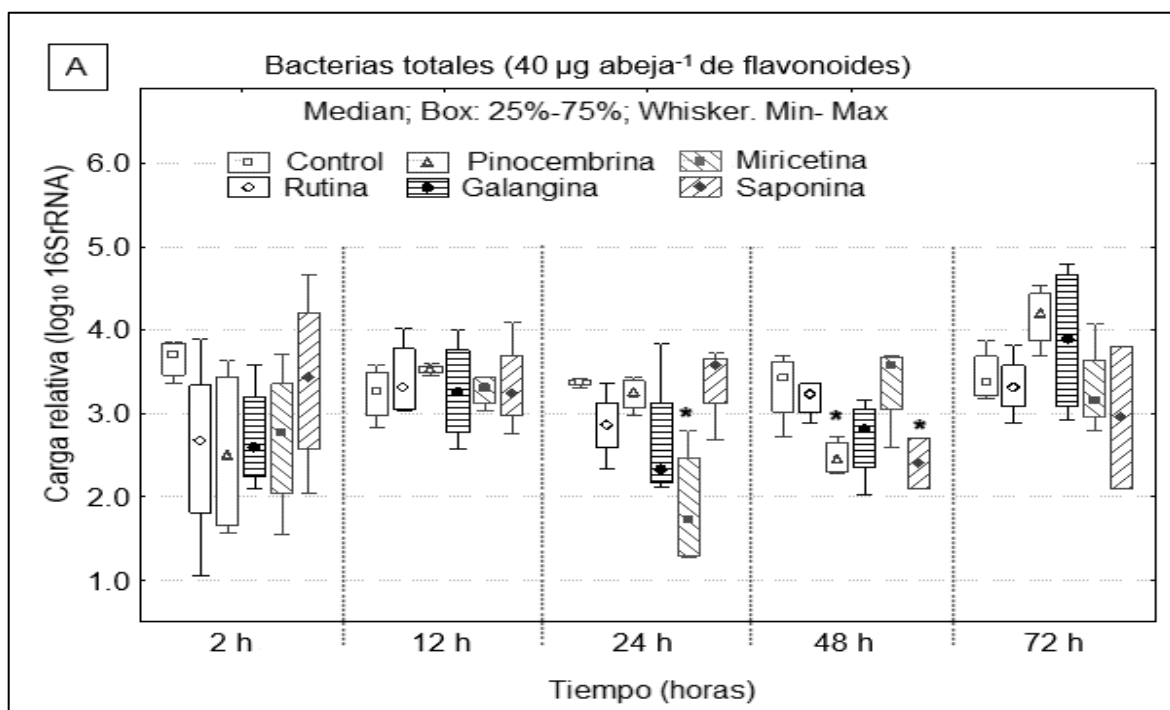
contra patógenos (Raymann y Moran, 2018). En este sentido, se evaluó el posible efecto de los flavonoides sobre algunas bacterias específicas que habitan comúnmente en el intestino de las abejas, tales como *Lactobacillus kunkeei* y *Bifidobacterium asteroides*, pero también, su efecto en la comunidad en general (bacterias totales). Se evaluó el efecto de los flavonoides a corto (horas) y largo plazo (días) para determinar posibles efectos agudos y/o crónicos en las bacterias totales e indicadoras. La carga relativa de bacterias totales a las 2 y 12 horas en abejas expuestas a  $40 \mu\text{g abeja}^{-1}$  de flavonoides y saponina, no varió significativamente (2 h,  $F = 1,08$ ;  $p = 0,406$ ;  $GL = 5/18$  y 12 h,  $F = 0,28$ ;  $p = 0,920$ ;  $GL = 5/18$ ). No obstante, cambios significativos fueron observados a las 24 ( $F = 4,95$ ;  $p = 0,005$ ;  $GL = 5/18$ ) y 48 horas ( $F = 4,02$ ;  $p = 0,015$ ;  $GL = 5/18$ ); cambios que fueron ejercidos por los flavonoides miricitina y pinocembrina con respecto al control (Figura 5A). A las 72 horas post-alimentación, todos los tratamientos no mostraron diferencias significativas ( $F = 1,62$ ;  $p = 0,212$ ;  $GL = 5/16$ ).

Cuando las abejas fueron expuestas a una concentración más alta de flavonoides ( $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ ), a las 2 horas post-exposición se detectaron cambios significativos entre tratamientos ( $F = 3,16$ ;  $p = 0,019$ ;  $GL = 5/18$ ). Esos cambios representaron un aumento significativo de la carga bacteriana total en abejas alimentadas con los flavonoides galangina y miricetina, también en aquellas abejas alimentadas con saponina comparadas al control (Figura 5B). Estos cambios significativos no fueron observados a horas posteriores de muestreos medidos a las 12 ( $F = 1,87$ ;  $p = 0,223$ ;  $GL = 5/18$ ), 24 ( $F = 2,26$ ;  $p = 0,098$ ;  $GL = 5/16$ ), 48 ( $F = 1,27$ ;  $p = 0,323$ ;  $GL = 5/16$ ) y 72 horas ( $F = 1,84$ ;  $p = 0,174$ ;  $GL = 4/14$ ) (Figura 5B). Los cambios iniciales de la carga relativa bacteriana pueden deberse a elementos experimentales, los cuales están asociados a la carga inicial de bacterias que las mismas abejas contienen y no el efecto real de los flavonoides, considerando que el tiempo entre la exposición a los flavonoides y la medición (2 horas post-tratamiento) no es suficientemente amplio para que permita una tasa rápida de crecimiento bacteriano. Esto se puede constatar en periodos posteriores de medición, en cuyo caso, galangina y miricetina, no mantuvieron los niveles altos de la carga bacteriana.

La carga relativa de *Bifidobacterium asteroides* en abejas expuestas a una concentración de 40  $\mu\text{g abeja}^{-1}$  de flavonoides y medido a corto plazo, no mostró cambios significativos a las 2 horas ( $F = 1,13$ ;  $p = 0,378$ ;  $GL = 5/18$ ) y 12 h ( $F = 0,28$ ;  $p = 0,920$ ;  $GL = 5/18$ ) post-exposición a los flavonoides. No obstante, a las 24 horas se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F = 4,95$ ;  $p = 0,005$ ;  $GL = 5/18$ ), en donde miricetina causa una disminución en la carga relativa de *B. asteroides* comparado con el grupo control (Figura 6A). A las 48 horas post-alimentación también se detectaron cambios significativos entre tratamientos ( $F = 5,29$ ;  $p = 0,005$ ;  $GL = 5/18$ ). Tanto abejas tratadas con pinocembrina y saponina inducen una disminución significativa en la carga relativa de *B. asteroides* (Figura 6A). Estos cambios no fueron significativos a las 72 horas de medición ( $F = 1,62$ ;  $p = 0,212$ ;  $GL = 5/16$ ). La carga de *B. asteroides* en las abejas expuestas a la concentración más alta (160  $\mu\text{g abeja}^{-1}$ ), no presentó cambios significativos a las 2 ( $F = 2,69$ ;  $p = 0,055$ ;  $GL = 5/18$ ), 12 ( $F = 2,12$ ;  $p = 0,109$ ;  $GL = 5/18$ ) y 24 horas ( $F = 1,74$ ;  $p = 0,182$ ;  $GL = 5/16$ ) post-alimentación. Por otro lado, se observaron cambios significativos en la carga de *B. asteroides* a las 48 ( $F = 2,93$ ;  $p = 0,046$ ;  $GL = 5/16$ ) y 72 horas ( $F = 3,09$ ;  $p = 0,048$ ) post-alimentación. En este sentido, a las 48 y 72 horas post-alimentación, abejas alimentadas con galangina y rutina, presentan un aumento significativo de la carga de *B. asteroides*, respectivamente (Figura 6B).

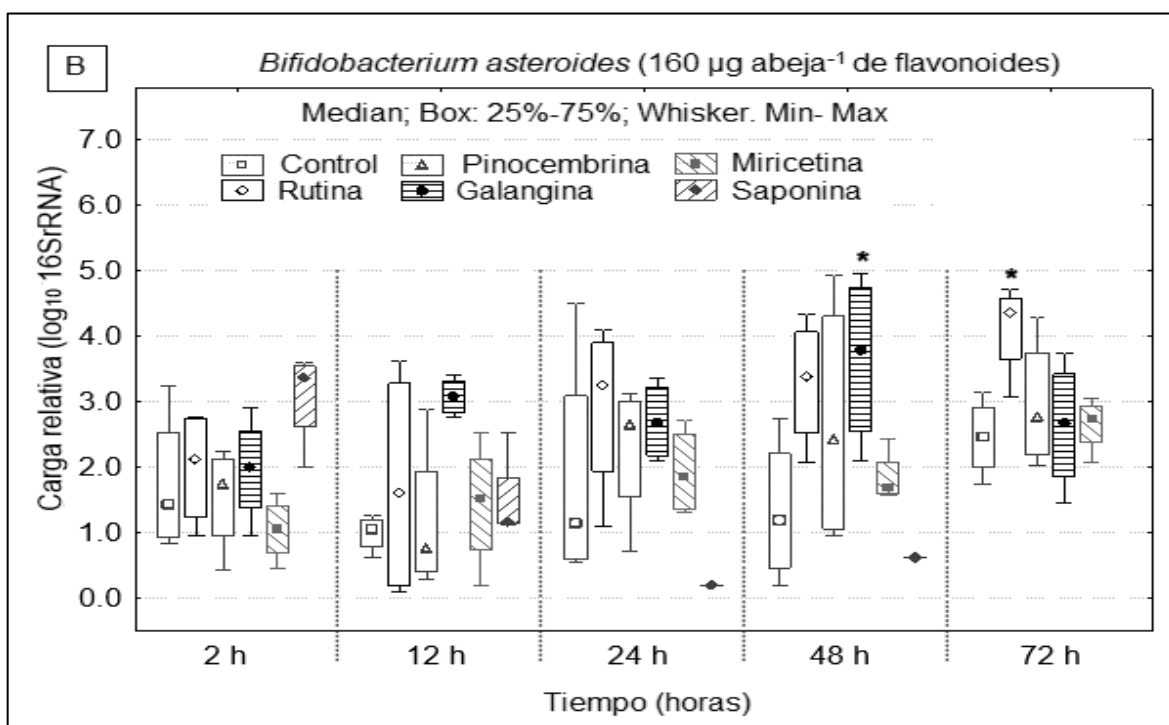
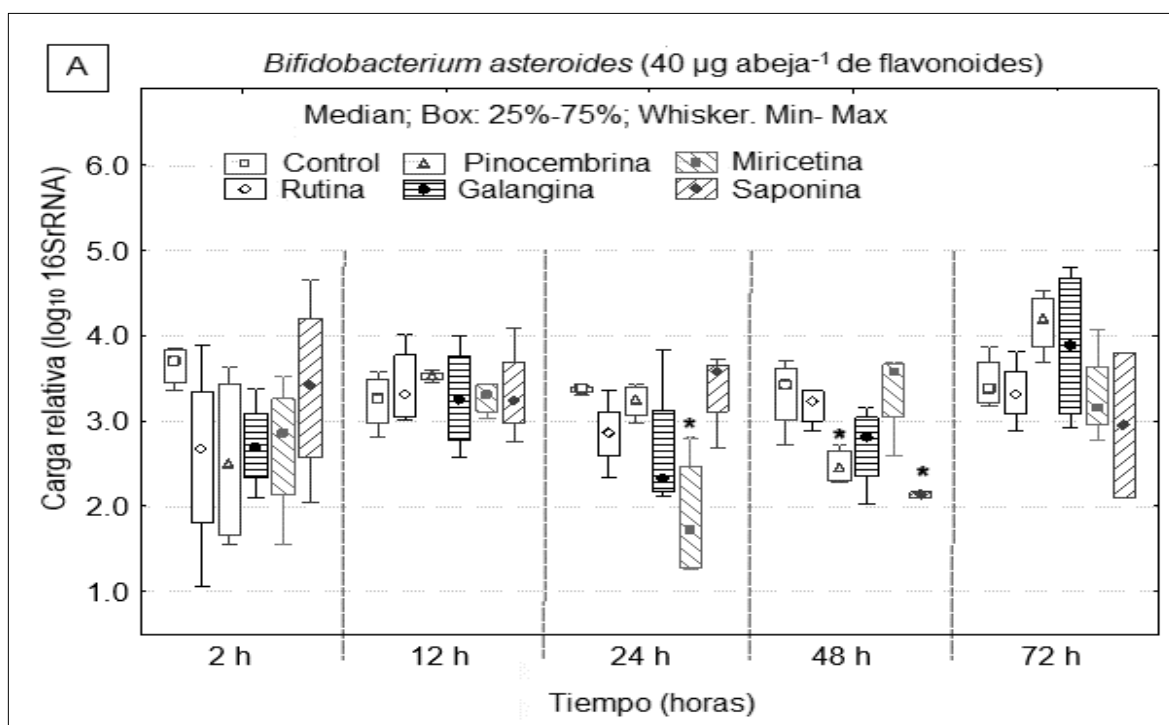
La carga relativa de *L. kunkeei* medido a corto plazo, en las abejas tratadas a una concentración de 40  $\mu\text{g abeja}^{-1}$ , no presentaron diferencias significativas a las 2 ( $F = 2,74$ ;  $p = 0,052$ ;  $GL = 5/18$ ) y 12 horas ( $F = 0,25$ ;  $p = 0,932$ ;  $GL = 5/18$ ) post-alimentación (Figura 7A). Al contrario, la carga relativa de *L. kunkeei* a las 24 ( $F = 4,69$ ;  $p = 0,006$ ;  $GL = 5/18$ ) y 48 horas ( $F = 4,57$ ;  $p = 0,009$ ;  $GL = 5/16$ ) post-alimentación presenta diferencias significativas entre tratamiento. En este sentido, abejas tratadas con miricetina presentan en una menor carga relativa de *L. kunkeei* al ser comparadas con abejas no tratadas (control). Efectos que se repite a las 48 horas post-alimentación en abejas tratadas con miricetina, pinocembrina, galangina y saponina (Figura 7A).

Figura 5. Carga relativa de bacterias totales en abejas que fueron tratadas con flavonoides, saponina y no tratadas (control) a una concentración de (A) 40 y (B) 160  $\mu\text{g abeja}^{-1}$ , medido a las 2, 12, 24, 48, 72 horas post-alimentación.



El asterisco en cada barra indica diferencias estadísticas con respecto al tratamiento control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

Figura 6. Carga relativa de *Bifidobacterium asteroides* en abejas que fueron tratadas con flavonoides, saponina y no tratadas (control) a una concentración de (A) 40 y (B)  $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ , medido a las 2, 12, 24, 48, 72 horas post-alimentación.



El asterisco en cada barra indica diferencias estadísticas con respecto al tratamiento control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

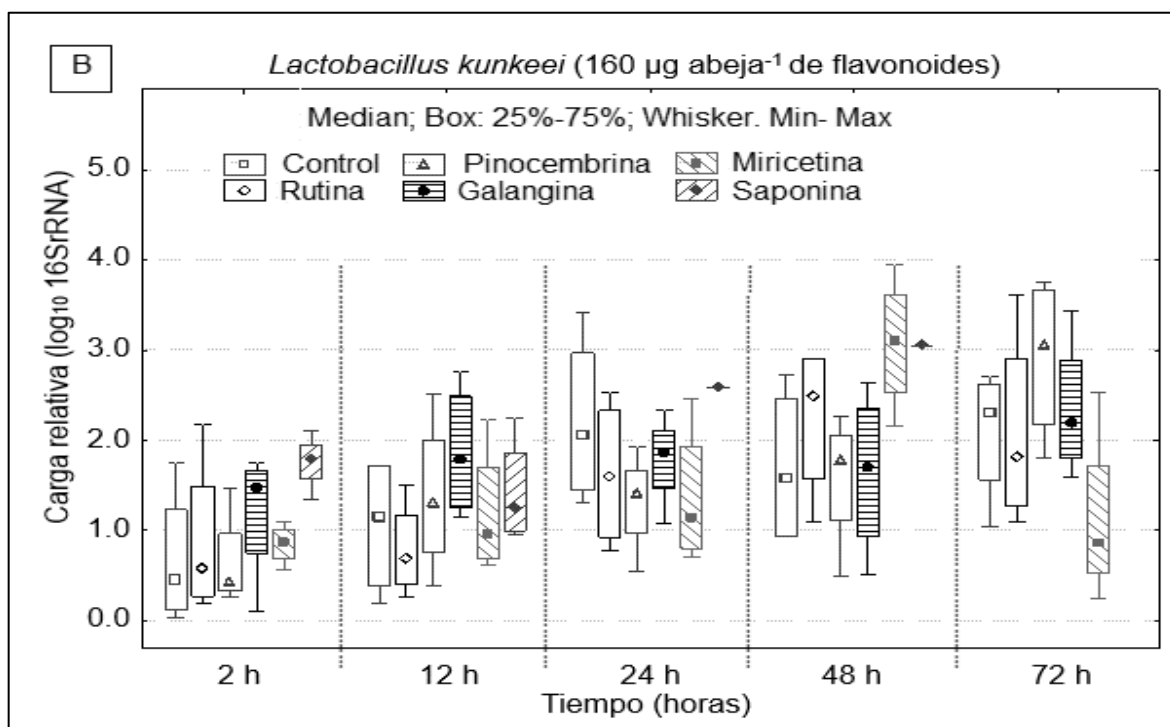
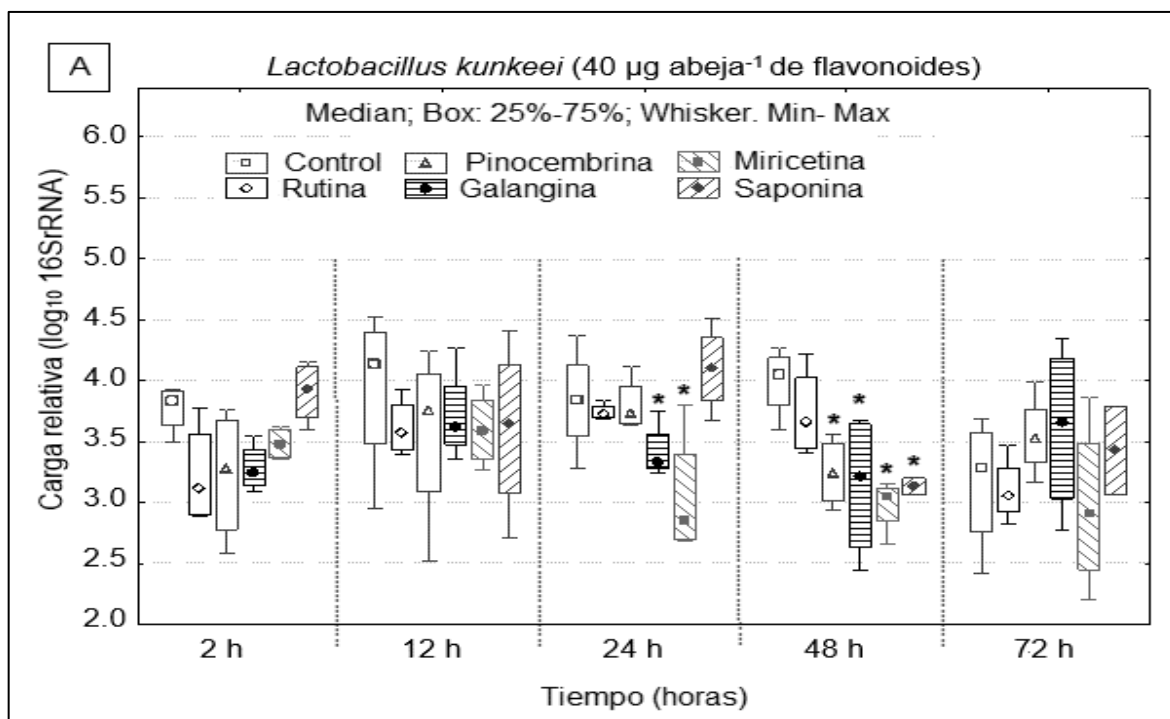
No se detectaron diferencias significativas ( $F = 0,89$ ;  $p = 0,508$ ;  $GL = 5/16$ ) en la carga relativa de *L. kunkeei* a las 72 horas post-alimentación (Figura 7A). En forma

similar, todos los tratamientos expuestos a la concentración más alta ( $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ ) no causaron cambios significativos en la carga de *L. kunkeei* medido a las 2 ( $F = 2,19$ ;  $p = 0,101$ ;  $GL = 5/18$ ), 12 ( $F = 1,06$ ;  $p = 0,412$ ;  $GL = 5/18$ ), 24 ( $F = 1,37$ ;  $p = 0,287$ ;  $GL = 5/16$ ), 48 ( $F = 2,48$ ;  $p = 0,076$ ;  $GL = 5/16$ ) y 72 horas ( $F = 1,99$ ;  $p = 0,146$ ;  $GL = 5/16$ ) post-alimentación (Figura 7B). Es necesario recalcar que desde las 24 horas post-alimentación, abejas tratadas con saponinas ( $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ ) ya habían muerto todas, por lo tanto, no se presentan muestras para medir la carga de *L. kunkeei* y *B. asteroides* a las 48 y 72 horas post-tratamiento (Figura 6B y 7B).

Además, se analizó la carga relativa de bacterias totales, *L. kunkeei* y *B. asteroides* a los 5, 10, 15 y 20 días (largo plazo) después de la exposición oral de flavonoides y saponina con el sentido de observar posibles efectos crónicos de los flavonoides evaluados a una concentración más alta ( $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ ). No se observaron efectos significativos en la carga de bacterias totales a los 5 ( $F = 2,30$ ;  $p = 0,106$ ;  $GL = 4/15$ ) 10 días ( $F = 0,99$ ;  $p = 0,442$ ;  $GL = 4/15$ ). No obstante, a los 15 y 20 días post-alimentación, se observaron diferencias significativas entre tratamientos (15 días  $F = 3,08$ ;  $p = 0,049$ ;  $GL = 4/15$  y 20 días  $F = 4,03$ ,  $p = 0,021$ ;  $GL = 4/15$ ). Se presenta un aumento significativo de la carga bacterias totales en abejas tratadas con galangina, miricetina y pinocembrina a los 15 días post-alimentación (Figura 8A). Contrariamente, después de los 20 días post-alimentación, las abejas tratadas con galangina mostraron una carga de bacterias totales significativamente menor que el grupo control (Figura 8A).

La carga de *L. kunkeei* en abejas tratadas con flavonoides a los 15 días post-alimentación, mostraron diferencias significativas entre tratamientos ( $F = 3,50$ ;  $p = 0,033$ ;  $GL = 4/15$ ). Así, abejas tratadas con miricetina presentaron una mayor carga de *L. kunkeei* comparado con el control (Figura 8B). Cabe destacar que a los 5, 10 y 20 días post-alimentación, la carga de *L. kunkeei* varió significadamente entre tratamientos (5 días  $F = 0,72$ ;  $p = 0,588$ ;  $GL = 4/15$ , 10 días  $F = 0,46$ ;  $p = 0,766$ ;  $GL = 4/15$  y 20 días  $F = 0,17$ ;  $p = 0,949$ ;  $GL = 4/15$ ).

Figura 7. Carga relativa de *Lactobacillus kunkeei* en abejas que fueron tratadas con flavonoides, saponina y no tratadas (control) a una concentración de (A) 40 y (B)  $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ , medido a las 2, 12, 24, 48, 72 horas post-alimentación.



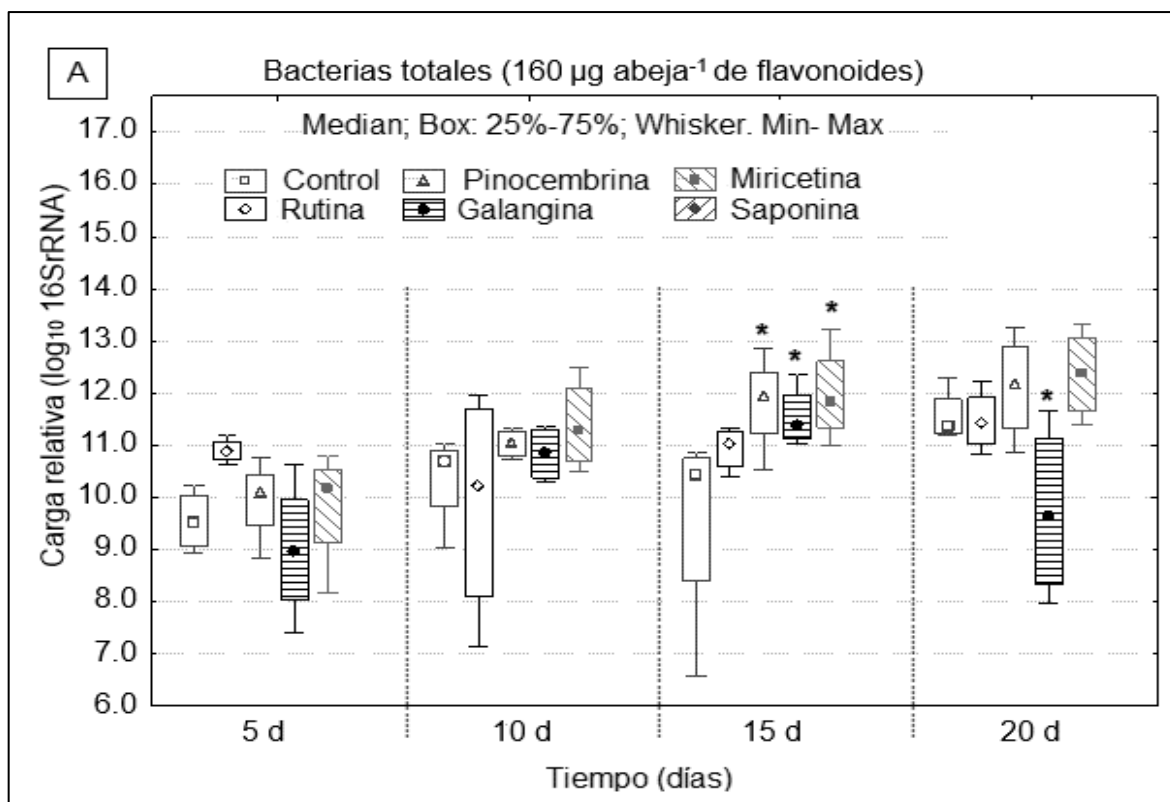
El asterisco en cada barra indica diferencias estadísticas con respecto al tratamiento control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

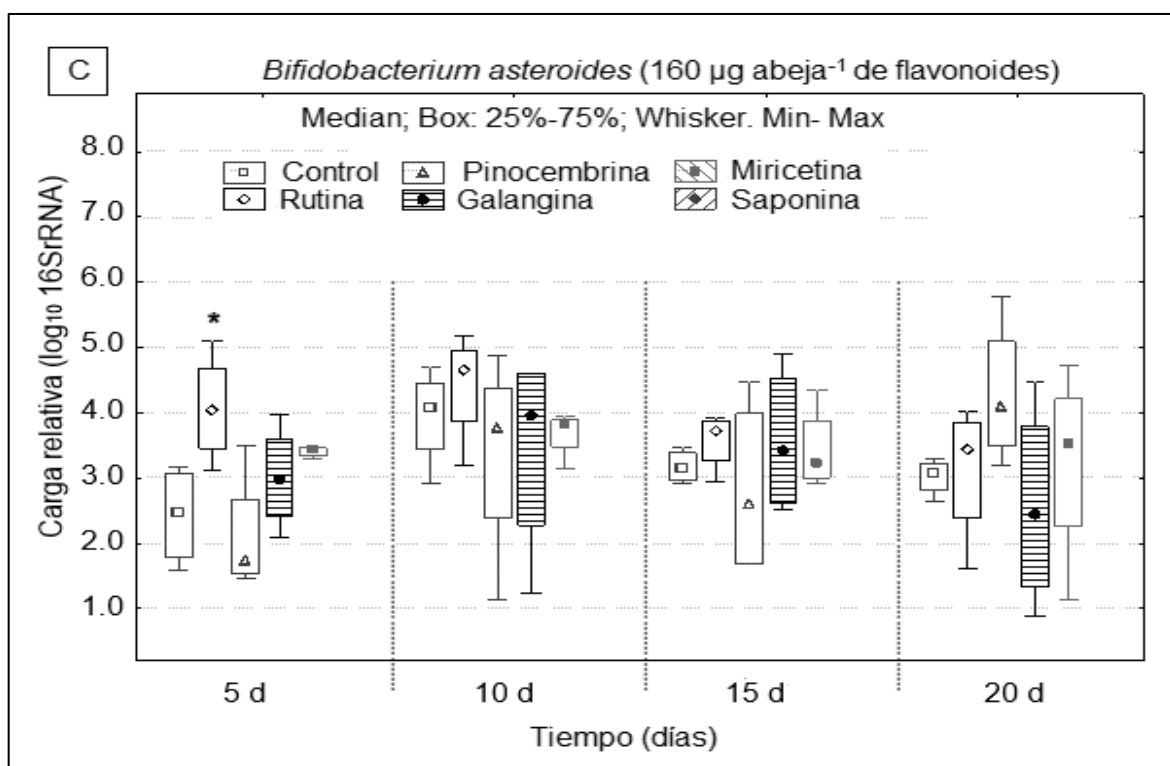
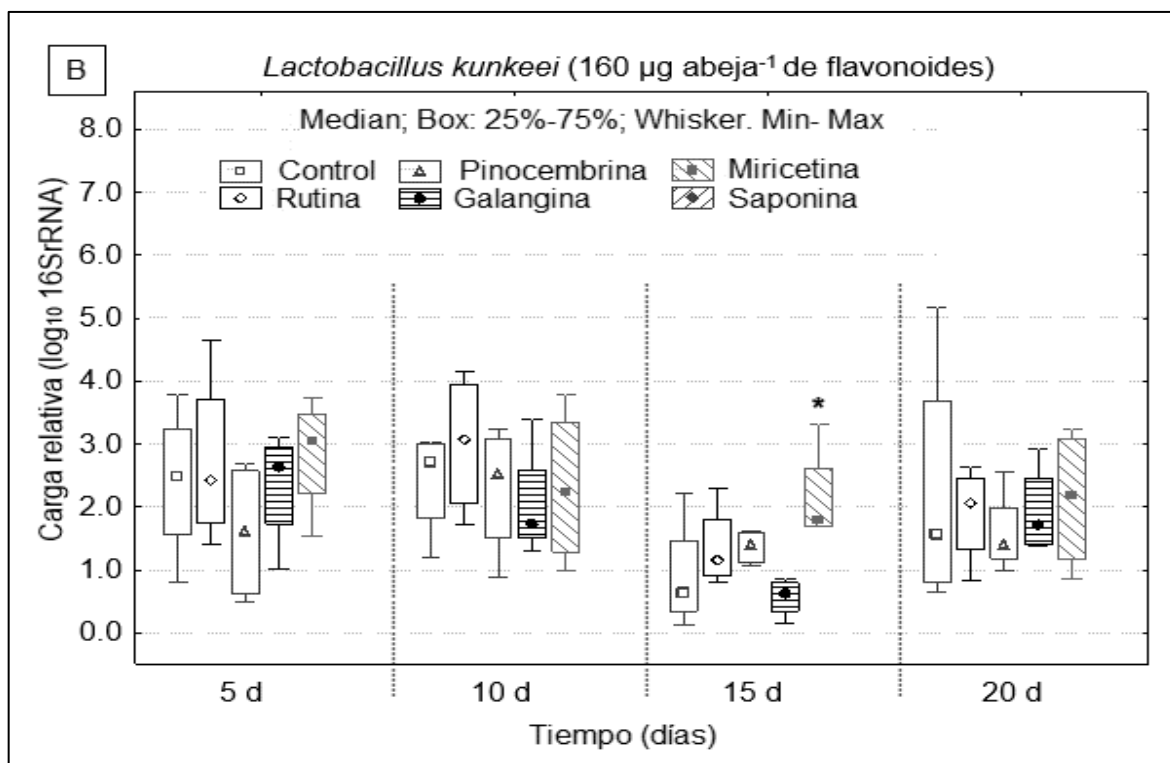
En cambio, la carga de *B. asteroides* sólo fue significativamente alterada en los primeros 5 días ( $F = 4,30$ ;  $p = 0,016$ ;  $GL = 4/15$ ) post-exposición a los flavonoides,

lo cual se reflejado en aumento de la carga bacteriana en abejas tratadas con rutina (Figura 8C). Sin embargo, los cambios en la carga relativa de *B. asteroides* no fueron significativos a los 10 ( $F = 0,55$ ;  $p = 0,548$ ;  $GL = 4/15$ ), 15 ( $F = 0,51$ ;  $p = 0,732$ ;  $GL = 4/15$ ) y 20 días ( $F = 1,14$ ;  $p = 0,375$ ;  $GL = 4/15$ ) post-alimentación, permaneciendo en niveles muy similares en todos los tratamientos (Figura 8C).

La comunidad microbiana del intestino en las abejas melíferas, incluye a la especie de bacteria gram-positiva *B. asteroides*, como una de las más frecuentes en el intestino (Kwong y Moran, 2016). En forma similar, *L. kunkeei* es una bacteria asociada al aparato bucal y del intestino de las abejas, habitan en el néctar y en materiales de la colmena (Kwong y Moran, 2016).

Figura 8. Carga relativa de (A) bacterias totales, (B) *Lactobacillus kunkeei*, (C) *Bifidobacterium asteroides* en abejas que no fueron tratadas (control) y tratadas con flavonoides a una concentración de  $160 \mu\text{g abeja}^{-1}$ , medido a los 5, 10, 15 y 20 días post-alimentación.





El asterisco en cada barra indica diferencias estadísticas con respecto al tratamiento control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ) y después de un análisis de varianza en cada período de medición (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Por ejemplo, Raymann *et al.* (2017) demostró que, al tratar abejas con el antibiótico tetraciclina, conduce a cambios sustanciales en la composición y el tamaño de la comunidad microbiana intestinal, pero también, una reducción de la sobrevivencia de las abejas, cuando fueron expuestas a patógenos bacterianos oportunistas, como *Serratia*. También se ha demostrado que las abejas provenientes de 12 colmenas ricas en propóleo, que contiene flavonoides en su composición, presentaron una microbiota más consistente, mientras que las pobres en propóleo exhibieron una mayor diversidad taxonómica, lo cual sugiere que el propóleo puede mantener una microbiota estable y homeostática (Saelao *et al.*, 2020). Los flavonoides que se evaluaron en este estudio, no afectaron sustancialmente a los miembros de la comunidad intestinal. Aunque los resultados de administrar miricetina, pinocembrina, galangina a diferentes concentraciones mostraron en ciertos períodos una disminución de la carga bacteriana. Sin embargo, estos cambios fueron aislados y para el período siguiente que fueron analizados, el nivel de bacterias fue similar al tratamiento control.

Por consiguiente, los flavonoides rutina, miricetina, pinocembrina y galangina no alteran el desarrollo y la inmunidad de las abejas, esto sugiere que podrían ser incluidos en la dieta para probar si mejoran la capacidad de respuesta a factores estresantes, o por ejemplo para el control de *N. ceranae*.

## **CONCLUSIONES**

Según los resultados expuestos en este trabajo de investigación se puede concluir lo siguiente:

1. La ingesta de los flavonoides galangina y pinocembrina, aumentan la sobrevivencia.
2. La ingesta de los flavonoides en abejas no alteró la expresión de los genes GSTD1 y Cyp6AS7.
3. Los flavonoides rutina, miricetina, galangina y pinocembrina no son tóxicos para las abejas melíferas.
4. La carga de bacterias totales, *L. kunkeei* y *B. asteroides* en las abejas no se ve alterada por la ingesta de los flavonoides.

## REFERENCIAS

1. Arismendi, N., M. Vargas, M.D. López, Y. Barría and N. Zapata. 2018. Promising antimicrobial activity against the honey bee parasite *Nosema ceranae* by methanolic extracts from Chilean native plants and propolis. *J. Apic. Res.* 57(4): 522-535.
2. Barroso-Arévalo, S., E. Fernández-Carrión, J. Goyache, F. Molero, F. Puerta and J.M. Sánchez-Vizcaíno. 2019. High load of deformed wing virus and Varroa destructor infestation are related to weakness of honey bee colonies in Southern Spain. *Front. Microbiol.* 10: 1331. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01331> [en línea].
3. Borba, R.S. and M. Spivak. 2017. Propolis envelope in *Apis mellifera* colonies supports honey bees against the pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Sci. Rep.* 7(1): 11429. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11689-w> [en línea].
4. Curifuta, M., J. Vidal, J. Sanchez-Venegas, A. Contreras, L.A. Salazar and M. Alvear. 2012. The *in vitro* antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. *Cienc. Investig. Agrar.* 39(2): 347-359.
5. Cushnie, T.P.T. and A.J. Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26(5): 343-356.
6. Claudianos, C., H. Ranson, R.M. Johnson, S. Biswas, M.A. Schuler, M.R. Berenbaum, R. Feyereisen and J.G. Oakeshott. 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15(5): 615-636.
7. De Geyter, E., G. Smagghe, Y. Rahbé and D. Geelen. 2012. Triterpene saponins of Quillaja saponaria show strong aphicidal and deterrent activity against the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Pest Manag. Sci.* 68(2): 164-169.
8. Engel, P. and N.A. Moran. 2013. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol Rev.* 37(5): 699-735.
9. García Rojas, J.C., A. Robles Bermúdez, O.J. Cambero Campos, C.R. Carvajal Cazola y G.R. Peña Sandoval. 2017. Resistencia metabólica a insecticidas. *Rev. Biol. Cienc.* 4(6): Art. N°16. DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.04.06.01> [en línea].
10. Geslin, B., M.A. Aizen, N. Garcia, A.J. Pereira, B.E. Vaissière and L.A. Garibaldi.

2017. The impact of honey bee colony quality on crop yield and farmers' profit in apples and pears. *Agric. Ecosyst. Environ.* 248: 153-161.
11. Gong, Y. and Q. Diao. 2017. Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* 26(1): 1-12.
  12. Grozinger, C.M. and M.L. Flenniken. 2019. Bee viruses: ecology, pathogenicity, and impacts. *Annu. Rev. Entomol.* 64: 205-226.
  13. Han, F., A. Wallberg and M.T. Webster. 2012. From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecol. Evol.* 2(8): 1949-1957.
  14. Johnson, R.M., W. Mao, H.S. Pollock, G. Niu, M.A. Shuler and M.R. Berenbaum. 2012. Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P<sub>450</sub>s in *Apis mellifera*. *PLoS One* 7(2). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031051> [en línea].
  15. Johnson, R.M. 2015. Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60: 415-434.
  16. Kluser, S., P. Neumann, M. P. Chauzat, J. S. Pettis, P. Peduzzi, R. Witt, N. Fernández and M. Theuri. 2010. Global honey bee colony disorders and other threats to insect pollinators. 2010.UNEP.
  17. Kwong, W.K. and N.A. Moran. 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(6): 374-384.
  18. Larsen, A., F.J. Reynaldi and E. Guzmán-Novoa. 2019. Fundamentals of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. *Review. Rev. Mex Cienc. Pec.* 10(3): 705-728.
  19. Maes, P.W., P.A. Rodrigues, R. Oliver, B.M. Mott and K.E. Anderson. 2016. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* 25(21): 5439-5450.
  20. Mithöfer, A. and W. Boland. 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 431-450.
  21. Mohdaly, A.A., A.A. Mahmoud, M.H.H. Roby, I. Smetanska and M.F. Ramadan. 2015. Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. *J. Food Biochem.* 39(5): 538-547.
  22. Nader, R.A., R. Mackieh, R. Wehbe, D. El Obeid, J.M. Sabatier and Z. Fajloun.

2021. Beehive products as antibacterial agents: a review. *Antibiotics* 10(6): 717.
23. Neov, B., A. Georgieva, R. Shumkova, G. Radoslavov and P. Hristov. 2019. Biotic and abiotic factors associated with colonies mortalities of managed honey bee (*Apis mellifera*). *Diversity* 11(12): 237.
24. Neumann, P. and N.L. Carreck. 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49(1): 1-6.
25. Porrini, M.P., P.M. Garrido and M.J. Eguaras. 2013. Individual feeding of honey bees: Modification of the Rinderer technique. *J. Apic. Res.* 52(5): 194-195.
26. Ramsey, S.D., R. Ochoa, G. Bauchan, C. Gulbranson, J.D. Mowery, A. Cohen, D. Lim, J. Joklik, J.M. Cicero, J.D. Ellis, D. Hawthorne and D. vanEngelsdorp. 2019. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116(5): 1792-1801.
27. Raymann, K., Z. Shaffer and N.A. Moran. 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biol.* 15(3). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001861> [en línea].
28. Raymann, K. and N.A. Moran. 2018. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr. Opin. Insect Sci.* 26: 97-104.
29. Rouibi, A., W.F. Bouchema, W. Loucif-Ayad, M. Achou and N. Soltani. 2016. Risks assessment of two acaricides (fluvalinate and oxalic Acid) in *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera, Apidae): Acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities. *J. Entomol. Zool. Stud.* 4(2): 503-508.
30. Royan, M. 2019. Mechanisms of probiotic action in the honeybee. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr.* 29(2): 95-103.
31. Saelao, P., R. S. Borba, V. Ricigliano, M. Spivak and M. Simone-Finstrom. 2020. Honeybee microbiome is stabilized in the presence of propolis. *Biol. Lett.* 16(5): 20200003.
32. SAG (Chile). 2022. Boletín apícola. Boletín N° 7. Servicio Agrícola y Ganadero. Santiago, Chile.
33. Schmehl, D.R., P.E.A. Teal, J.L. Frazier and C.M. Grozinger. 2014. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey

- bees (*Apis mellifera*). J. Insect Physiol. 71: 177-190.
34. Schwarz, R.S., N.A. Moran and J.D. Evans. 2016. Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113(33): 9345-9350.
  35. Shu, Y.S., W. Tao, Q.B. Miao, S.C. Lu and Y.B. Zhu. 2014. Galangin dampens mice lipopolysaccharide-induced acute lung injury. Inflammation 37(5): 1661-1668.
  36. Stankus, T. 2014. Reviews of science for science librarians: an update on honeybee colony collapse disorder. Sci. Technol. Lib. 33(3): 228-260.
  37. Vargas, M., N. Arismendi, G. Riveros, N. Zapata, A. Bruna, M. Vidal, M. Rodríguez and M. Gerding. 2017. Viral and intestinal diseases detected in *Apis mellifera* in Central and Southern Chile. Chilean J. Agric. Res.77(3): 243-249.
  38. Voigt, K. and E. Rademacher. 2015. Effect of the propolis components, cinnamic acid and pinocembrin, on *Apis mellifera* and *Ascosphaera apis*. J. Apic. Sci. 59(1): 89-95.
  39. Wong, M.J., L.H. Liao and M.R. Berenbaum. 2018. Biphasic concentration-dependent interaction between imidacloprid and dietary phytochemicals in honey bees (*Apis mellifera*). PloS One 13(11). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206625> [en línea].
  40. Zaynab, M., Y. Sharif, S. Abbas, M.Z. Afzal, M. Qasim, A. Khalofah, M.J. Ansari, K.A. Khan, L. Tao and S. Li. 2021. Saponin toxicity as key player in plant defense against pathogens. Toxicon 193: 21-27.