

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 326**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/23** (2006.01)  
**A01G 7/00** (2006.01)  
**A01K 51/00** (2006.01)  
**C09K 15/06** (2006.01)  
**A01N 37/02** (2006.01)  
**A01N 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2006 E 06840493 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2061455**

54 Título: **Feromona sintética estabilizada de cría para manipular el comportamiento y la fisiología de abejas de miel**

30 Prioridad:

**07.09.2006 US 470762**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.11.2013**

73 Titular/es:

**CONTECH ENTERPRISES INC. (50.0%)**  
**7572 Progress Way**  
**Delta BC V4G 1E9, CA y**  
**THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PANKIW, TANYA;**  
**LAFONTAINE, JEAN PIERRE y**  
**AVELINO, NORMAN**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 431 326 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Feromona sintética estabilizada de cría para manipular el comportamiento y la fisiología de abejas de miel

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una feromona estabilizada de abejas de miel y métodos para estabilizar la feromona de cría de abejas de miel, permitiendo de este modo la producción y el uso prolongado de productos comerciales basados en esa feromona. Se puede usar la feromona estabilizada para manipular el comportamiento y mejorar el rendimiento de las abejas de miel obreras, dando como resultado un mayor vigor total a la colmena. Los comportamientos específicos influenciados por la feromona estabilizada aplicada sobre una sustancia inerte incluyen: edad para libar por primera vez, proporción de obreras que son libadoras, proporción de polen con respecto a néctar en libadoras, carga de polen de las abejas individuales, eficacia de polinización de los cultivos diana, consumo de componentes complementarios de la dieta y antibióticos, cría de obreras y propensión al enjambramento. También se puede usar la feromona estabilizada para influenciar el desarrollo de las glándulas alimentarias hipofaríngeas y la producción de proteínas por parte de la glándula. La feromona libadora estabilizada se puede usar además junto con la feromona de glándula mandibular de reina de abejas de miel, en particular para influenciar la polinización de las plantas del cultivo diana.

20 **Antecedentes de la invención**

Se sometió a ensayo la hipótesis de que las abejas de miel en estado larvario producen una feromona que estimula el libado (Filmer 1932; Free 1967) y se verificó por parte de Pankiw y col. (1998), que descubrió un aumento de 2,5 veces en el número de libadoras de polen cuando se suministraron extractos de hexano de 2.000 larvas de abejas de miel a colonias de 1.000 larvas. En las colonias sin larvas, el extracto sustituyó a las larvas como fuente de feromona.

Pankiw y Page (2001) y Page y Pankiw (2002) sometieron a ensayo una mezcla sintética de feromona que comprendía diez ésteres de ácido graso (LeConte y col., 1990) en los siguientes porcentajes: linoleato de etilo 1 %, linolenato de etilo 13 %, oletato de etilo 8 %, palmitato de etilo 3 %, estearato de etilo 7 %, linoleato de metilo 2 %, linolenato de metilo 21 %, oleato de metilo 25 %, palmitato de metilo 3 % y estearato de metilo 17 %. Esta mezcla rebajó el umbral de respuesta neurosensorial frente a sacarosa en las abejas obreras. Las abejas de miel obreras con bajos umbrales de respuesta frente a sacarosa son las que tienen la probabilidad más elevada de libar el polen, y las que tienen umbrales de respuesta elevados son las que tienen la probabilidad más elevada de libar néctar (Pankiw y Page 2000; Pankiw 2003; Pankiw y col. 2004a). Trascorrida una hora de colocación en el centro de la colonia, el extracto de larvas o la mezcla sintética de feromonas de cría aumentó la proporción de libadoras de polen con respecto a libadoras que no son de polen en un huerto de almendros. Pankiw y Page (2001) sugieren que la "feromona de cría modula el umbral en las pre-libadoras, las prepara para ser libadoras de polen, y libera el comportamiento libador de polen".

Pankiw y col. (2004b) expuso colonias de abejas de miel a 2.000 equivalentes de larvas (1,12 mg) de feromona sintética de cría durante 28 días. Al tiempo que se producía un aumento del número de libadoras de polen, la feromona de cría aumentó significativamente los pesos de cargas de polen que volvían a la colmena. Las colonias tratadas con feromona dieron lugar a un número significativamente mayor de crías y aumentó el número de abejas de miel adultas que surgieron a partir de estas crías.

A una dosis realística biológicamente razonable de 2.000 equivalentes de larvas, la feromona de cría reclutó obreras de abejas de miel para convertirlas en libadoras a una etapa más temprana que en las colonias de control (Pankiw y col. 2004a); a una dosis de 6.200 equivalentes de larvas, la feromona de cría retrasó el reclutamiento de obreras para la conversión en libadoras (LeConte y col., 2000).

Aunque la exposición a feromona de cría generalmente rebajó la edad del primer libado, la aparición del primer libado se retrasó en una cohorte especializada de abejas obreras que tenía un contenido de proteína muy elevado en sus glándulas hipofaríngeas (Pankiw y col. 2004a). Este nivel elevado de proteínas indica una mayor probabilidad de comportamiento de cría y una calidad mayor de proteína que se alimenta a las larvas en comparación con las colonias de control.

Pankiw (2004b) descubrió que la proporción de libadoras de polen con respecto a libadoras que no eran de polen aumentó en una hora de exposición a 2.000 equivalentes de larvas de feromona sintética de cría. Las libadoras procedentes de colonias tratadas con feromona volvieron con mayores cargas de polen que las libadoras procedentes de las colonias de control, y la probabilidad de que este polen procediera del cultivo diana en el cual se colocaron las colonias para garantizar la polinización fue un 43 % más elevada. Las libadoras de néctar, que pueden visitar y polinizar más flores que las libadoras de polen, tenían más granos de polen en su cuerpo que la libadoras de néctar procedentes de colonias de control no tratadas. Estas libadoras que no son de polen portaban polen cuya probabilidad de proceder del cultivo diana fue 54 % más elevada que el polen portado por las libadoras de néctar procedentes de las colonias de control. Aumentando la actividad tanto de la libadoras de polen como de las

libadoras que no son de polen, la feromona de cría presenta potencial para aumentar en gran medida la eficacia de las colonias usadas para polinizar los cultivos diana.

5 Con frecuencia, se mezcla un antibiótico con el complemento de proteína en forma de profiláctico frente a enfermedades bacterianas. Debido a que las feromonas que producen larvas están ausentes o en sus niveles más bajos al final del invierno y al comienzo de la primavera, la administración de feromona de cría a una colonia podría estimular el consumo de proteína y los complementos dietéticos de antibióticos, así como el desarrollo de la glándula hipofaríngea y la biosíntesis de proteínas.

10 Page y Pankiw (2002) muestran que la feromona de cría sintética es fácilmente oxidable, y se debe almacenar en condiciones de bajo contenido de oxígeno, preferentemente a -20 °C y del modo más preferido a -70 °C, si se almacena durante un largo período de tiempo". Puede ocurrir que incluso la congelación no estabilice la feromona. Por ejemplo, el extracto puro de larvas de abeja de miel perdió toda la actividad de feromonas tan sólo después de tres meses en un congelador de laboratorio (T. Pankiw, Texas A & M University, observación no publicada). De este modo, cualquier producto comercial que se incorporara a la feromona bien sintética o natural no tendría casi período de caducidad, incluso si se congelara. Reconociendo la inestabilidad de la feromona sintética, los investigadores han proporcionado invariablemente feromona nueva a sus abejas experimentales cada día, normalmente en placas de vidrio (Pankiw y col. 1998; Pankiw y Page; 2001; Page y Pankiw 2002; Pankiw y Rubink 2002; Pankiw y col. 2004b). En el uso operativo, la aplicación diaria de feromona resultaría costosa e impráctica, y no suprimiría la necesidad de congelación durante el almacenamiento.

### Sumario de la invención

25 La invención va destinada a un método para estabilizar una feromona sintética de cría de abejas de miel formada por dos o más de linoleato de etilo, linolenato de etilo, oleato de etilo, palmitato de etilo, estearato de etilo, linoleato de metilo, linolenato de metilo, oleato de metilo, palmitato de metilo o estearato de metilo, que comprende la incorporación de una cantidad eficaz de un antioxidante compatible con feromonas a la feromona, donde el antioxidante compatible de feromonas comprende butil-hidroquinona terciaria.

30 El antioxidante puede ser un antioxidante de calidad alimentaria.

En el método, el antioxidante actúa inhibiendo la ruptura de linoleato de metilo, linolenato de metilo, linoleato de etilo, linolenato de etilo, oleato de metilo y oleato de etilo.

35 Las proporciones en peso de los componentes de la composición pueden ser linoleato de etilo (0,1-50 %), linolenato de etilo (1,3-50 %), oleato de etilo (0,8-50 %), palmitato de etilo (0,3-50 %), estearato de etilo (0,7-50 %), linoleato de metilo (0,2-50 %), linolenato de metilo (0,2-50 %), oleato de metilo (0,3-50 %), palmitato de metilo (0,3-50 %), estearato de metilo (1,7-50 %) y antioxidante (0,001-50 %).

40 Se puede administrar la composición que se ha descrito a abejas de miel, colonias de abejas de miel o unidades de polinización en un sustrato inerte seleccionado entre el grupo formado por parafina, cera vegetal, cera de abeja, sílice, alúmina, celulosa, celulosa modificada (papel y productos de papel), tejido de plantas seco, madera, o un polímero sintético.

45 Se pueden usar el método y la composición para aumentar la proporción de libadoras de polen con respecto a libadoras que no son de polen entre las abejas de miel obreras, o se puede usar para rebajar o retrasar del primer libado por parte de las abejas de miel obreras, o se puede usar para aumentar el número total de abejas de miel obreras libadoras, o se puede usar para aumentar el peso de carga de polen que vuelve a la colonia de abejas de miel obreras libadoras de polen, o se puede usar para aumentar el número de granos de polen transportados por el cuerpo de las abejas de miel obreras libadoras que no son de polen, o se puede usar para aumentar la polinización del cultivo diana próximo o dentro del cual se colocan las unidades de polinización o las colonias de abejas de miel, o se puede usar para estimular el desarrollo de la glándula alimentaria hipofaríngea y la producción de proteínas de glándula en obreras de abejas de miel, o se puede usar para estimular la composición de la proteína de la dieta u otros componentes de la dieta y complementos de antibióticos por parte de las abejas de miel.

55 En el método, se puede usar la administración continua de la composición a una colonia de abejas de miel durante un período de aproximadamente dos semanas o más para aumentar el número de abejas criadas dentro de la colonia, o se puede usar para inhibir la fuga (enjambriamiento) de abejas de la colonia.

60 En el método, se puede administrar la composición a abejas de miel, colonias de abejas de miel o unidades de polinización en combinación con feromona de glándula mandibular de reina de abejas de miel administrada a abejas de miel, colonias de abejas de miel o unidades de polinización o plantas en floración sobre las cuales se desea una mejor polinización.

65

**Dibujos**

La figura 1 ilustra trazas de cromatografía de gases de mezclas de oleato de metilo (1), linoleato de metilo (2) y linolenato de metilo (3) formuladas con butilhidroquinona terciaria de estabilizador de antioxidante en el tiempo cero y dos semanas después de exposición al aire a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), en comparación con una formulación no estabilizada idéntica tras dos semanas de exposición a 20 °C.

La figura 2 ilustra trazas de cromatografía de gases de mezclas de oleato de etilo (1), linolenato de etilo (2) y linolenato de etilo (3) formulados con buti-hidroquinona terciaria de estabilizador de antioxidante en el tiempo cero y dos semanas después de la exposición al aire a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), en comparación con una formulación no estabilizada idéntica tras una exposición de dos semanas a 20 °C.

La figura 3 ilustra una traza de cromatografía de gases de una mezcla de oleato de etilo (1), linoleato de etilo (2) y linolenato de etilo (3) formulados con buti-hidroquinona terciaria de estabilizador de antioxidante después de una exposición de 20 semanas al aire a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) en comparación con la traza de una formulación idéntica no estabilizada tras 20 semanas de exposición a 20 °C.

La figura 4 ilustra una traza de cromatografía de gases de una mezcla de oleato de etilo (1), linoleato de etilo (2), linolenato de etilo (3), palmitato de etilo (4) y estearato de etilo (5), formulados con buti-hidroquinona terciaria de estabilizador de antioxidante después de una exposición de 72 semanas al aire a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) en comparación con la traza de una formulación idéntica no estabilizada tras 72 semanas de exposición a 20 °C.

**Descripción detallada de la invención**

La feromona de cría de abejas de miel es fácilmente oxidable e inestable a temperatura ambiente, pierde bioactividad rápidamente, y se debe mantener en condiciones de bajo contenido de oxígeno y preferentemente congelada a temperaturas muy bajas, por ejemplo, -70 °C, si se ha de almacenar durante largos periodos. En condiciones normales, cualquier producto basado en feromonas casi no tiene periodo de caducidad, y no es comercialmente viable. De este modo, aparte del uso de feromonas en investigación, no existe aplicación comercial de las feromonas.

Los inventores han descubierto que se puede estabilizar la feromona de cría de abejas de miel durante un período de tiempo sustancial por medio de la incorporación de un anti-oxidante, en particular un antioxidante de calidad alimentaria que es butil-hidroquinona terciaria, a la feromona. Se pueden proporcionar formulaciones de feromonas de cría estabilizadas a una colmena sobre un sustrato inerte. Cuando se usa solo, o con feromona mandibular de reina de abejas de miel, la feromona de cría puede mejorar el rendimiento de las abejas de miel obreras y mejorar el vigor total de la colmena.

En términos generales, la invención va destinada a un método para estabilizar la feromona de cría de abejas de miel usando butil-hidroquinona terciaria. Se pueden proporcionar formulaciones de feromonas de diez componentes que incluyen un antioxidante de manera prolongada a una colmena sobre un sustrato inerte.

Por medio del uso de butil-hidroquinona terciaria de estabilizador de antioxidante, los inventores han descubierto que determinados componentes de feromona inestable, en particular linoleato de metilo, linolenato de metilo, linoleato de etilo y linolenato de etilo, pero también incluyendo oleato de metilo y oleato de etilo, permanecieron intactos durante 72 meses. Los inventores también han descubierto que una formulación estabilizada con butil-hidroquinona terciaria estabilizada, retuvo la bioactividad durante 231 días, al tiempo que la formulación inestabilizada perdió casi toda la bioactividad tras 123 días. Los inventores han descubierto que la feromona estabilizada de cría aumenta el libado de polen entre las abejas de miel obreras, y estimula el consumo de polen en la dieta. Finalmente, los inventores han descubierto que una formulación de feromona de cría estabilizada que usa componentes de calidad técnica, con unacomposición que varía ligeramente a partir de la composición natural lograda con los componentes de calidad técnica, tiene el mismo efecto biológico que la formulación de calidad de reactivo. Dicha durabilidad y robustez permite el desarrollo y el uso sostenido de productos comerciales basados en la feromona de cría estabilizada con los antioxidantes de calidad alimentaria.

Esta invención pertenece a composiciones en las cuales se formulan dos o más de los diez componentes de feromonas, formados por palmitato de metilo, palmitato de etilo, estearato de metilo, estearato de etilo, oleato de metilo, oleato de etilo, linoleato de metilo, linoleato de etilo, linolenato de metilo y linolenato de etilo, en cantidades eficaces con buti-hidroquinona terciaria de calidad alimentaria. Estas composiciones se proporcionan a abejas de miel de una colmena en un sustrato inerte, incluyendo (pero sin limitarse a) parafina, cera vegetal, cera de abeja, sílice, alúmina, celulosa, celulosa modificada (papel y productos de papel), tejido de planta seco, madera o un polímero sintético. Estas composiciones se pueden usar para manipular el comportamiento de las obreras de abeja de miel, incluyendo (pero sin limitarse a): aumentar la proporción de libadoras de polen con respecto a libadoras que no son de polen, rebajar la edad del primer libado, inducir comportamiento libador, estimular la recogida de polen y el transporte de polen de nuevo a la colmena, estimular el consumo de componentes complementarios de la dieta y

antibióticos, inhibir el enjambramiento y mejorar la polinización de los cultivos diana. También se pueden usar las composiciones de feromona estabilizadas para estimular el desarrollo y la producción de proteínas por parte de la glándula alimentaria hipofaríngea. Se puede usar la aplicación combinada de composiciones de feromonas de cría estabilizadas con la feromona de glándula de mandíbula de reina de abejas de miel para mejorar las condiciones dentro de la colmena y mejorar la polinización de cultivos diana.

### Ejemplo 1

#### Formulación

Debido a la posibilidad de contaminar la miel, únicamente se consideraron antioxidantes de calidad alimentaria como estabilizadores potenciales. Se formuló la feromona de cría con una butil-hidroquinona terciaria como estabilizador de ensayo en las siguientes proporciones (porcentajes de peso/peso) y las cantidades que se muestran a continuación: palmitato de metilo 3 % (0,0225 g), palmitato de etilo 3 % (0,0225 g), estearato de metilo 17 % (0,1275 g), oleato de metilo 24,95 % (0,1871 g), estearato de etilo 7 % (0,0525 g), oleato de etilo 8 % (0,0600 g), linoleato de metilo 2 % (0,0150 g), linoleato de etilo 1 % (0,0075 g), linolenato de metilo 21 % (0,1575 g), linolenato de etilo 13 % (0,0975 g) y butil-hidroquinona terciaria 0,05 % (0,0004 g). Se mezclaron los componentes a aproximadamente 20 °C en el orden anterior usando un vehículo magnético y se mezclaron hasta que fueron homogéneos, dando como resultado 0,75 g de producto.

### Ejemplo 2

#### Estabilidad Química

Se llevaron a cabo estudios de estabilidad a largo plazo y a corto plazo, con mezclas simplificadas de componentes de feromona de cría potencialmente inestable, mezclados en aproximadamente las mismas proporciones que en el Ejemplo 1. Se llevó a cabo la evaluación a corto plazo durante dos semanas con mezclas de oleato de metilo, linoleato de metilo y linolenato de metilo, y oleato de etilo, linoleato de etilo y linolenato de etilo, cada uno con y sin butilhidroquinona-terciaria. Se llevaron a cabo ensayos de veinte semanas con mezclas idénticas como para los experimentos de dos semanas, pero los ensayos de 72 semanas tuvieron palmitato de metilo y palmitato de etilo y estearato, que se añadieron en proporciones apropiadas a sus respectivas mezclas. Se colocaron aproximadamente 250 mg de una mezcla en un vial de plástico de 4 ml (15 x 45 mm) (ChromatographicSpecialties) equipado con una tapa de rosca de inserto de difusión (Agilent Technologies) con un orificio de 1 mm de diámetro para permitir la circulación de aire sobre la muestra. Se mantuvieron todas las mezclas de forma continua a temperatura constante de 30 °C.

Para el análisis de cromatografía de gases capilar, se disolvieron aproximadamente 1 ml de una mezcla en 1 ml de éter dietílico, y se analizó una alícuota de cada extracto. Los análisis se llevaron a cabo en tiempo cero y tras la duración concreta de exposición al aire a 30 °C, usando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP5890 equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de 30 m de longitud BPX-70 (J&WScientific). Las temperaturas de inyector y detector fueron de 260 °C y 285 °C, respectivamente. El programa de temperatura fue de 80 °C, aumento a 5 °C por minuto durante 24 minutos hasta 200 °C, y posteriormente aumento a 20 °C por minutos durante 3 minutos hasta 260 °C.

Se proporcionan los resultados de dos semanas para ésteres de metilo y etilo (figuras 1 y 2), mientras que se proporcionan los resultados a largo plazo de 20 y 72 semanas (figuras 3 y 4). Los resultados a largo plazo para ésteres metílicos fueron prácticamente idénticos a los de los ésteres etílicos.

Trascurridas dos semanas, la composición en proporción de ésteres metílicos en la mezcla que se estabilizaron con butilhidroquinona-terciaria siguió siendo la misma que en la mezcla no estabilizada en el tiempo cero (figura 1). No obstante, en la mezcla no estabilizada, trascurridas dos semanas, la cantidad de linoleato de metilo disminuyó en 85 %, y la cantidad de linolenato de metilo aumentó desde 48 % de la mezcla total hasta 82 %. Se obtuvieron resultados similares con los ésteres etílicos trascurridas dos semanas. La cantidad de linoleato de etilo disminuyó 74 % y la cantidad de linolenato de etilo disminuyó 94 %, mientras que oleato de etilo aumentó desde 40 % de la mezcla total hasta 66 % (figura 2). Estos resultados indican la ruptura de linolenato y linoleato de metilo y etilo tiene lugar de forma rápida a temperatura ambiente, y probablemente tiene como resultado la pérdida completa de bioactividad de la mezcla completa de feromonas trascurridas 2-4 semanas. Los resultados también indican que sin estabilización, el período de caducidad de cualquier producto de feromona de cría sería inaceptablemente reducido.

Trascurridas 20 y 72 semanas a 20 °C, la composición de proporción de oleato de etilo, linoleato de etilo y linolenato de etilo en las mezclas estabilizadas (figuras 3 y 4, respectivamente) permaneció esencialmente igual que en la mezcla estabilizada tras dos semanas de exposición (figura 2). Por el contrario, trascurridas 20 semanas, no quedó nada de linoleato de etilo ni de linolenato de etilo en la mezcla no estabilizada, y la cantidad de oleato de etilo aumentó solo ligeramente desde 37 % hasta 43 % de la mezcla total, a pesar de la ausencia completa de los otros dos componentes principales (figura 3). Esto indica la ruptura completa de linoleato de etilo y linolenato de etilo trascurridas 20 semanas de exposición, y también sugiere la ruptura parcial del oleato de etilo.

Como cabe esperar a partir de los resultados de la figura 3, no quedó linoleato de etilo ni linolenato de etilo trascurridas 72 semanas de exposición a temperatura ambiente, lo que indica una ruptura completa de estos dos componentes de feromona (figura 4). Las composiciones en porcentaje de palmitato de etilo y estearato de etilo aumentaron desde 8 % y 23 % hasta 20 % y 57 %, respectivamente, lo que sugiere que no se produjo ruptura incluso trascurridas 72 semanas. No obstante, el porcentaje de oleato de etilo disminuyó desde 24 % hasta 10 %. Junto con los resultados trascurridas 20 semanas, esta disminución confirma una ruptura lenta del oleato de etilo en las formulaciones no estabilizadas.

Estos resultados indican que la estabilización de la feromona de cría de abejas de miel con butilhidroquinona-terciaria no dará como resultado la ruptura de ningún componente de feromona estable durante un año. La ausencia o ligera indicación de ruptura tras 72 semanas (figura 4) sugiere que el período de caducidad de la formulación de feromona estabilizada será de al menos dos años. Esta es una duración suficientemente larga para justificar el desarrollo de un producto comercial.

### 15 Ejemplo 3

#### Duración de Feromona de Cría Estabilizada Medida Por Medio de Umbral de Respuesta Frente a Sacarosa

Las abejas de miel responden de manera reflexiva extendiendo la probóscide cuando se aplica una gota de disolución de sacarosa a las antenas. Esto se denomina ensayo de umbral de respuesta con extensión de probóscide (PER-RT) para sacarosa. El ensayo consiste en un grupo de concentración de sacarosa de 0,1, 0,3, 1, 3, 10 y 30 % (peso/volumen), que corresponde a una serie logarítmica de -1, -0,5, 0, 0,5, 1 y 1,5. Se toca la antena de cada abeja una vez con una gota de sacarosa. Se interpreta la concentración más baja que provoca la extensión de la probóscide como una estimación del umbral individual de respuesta frente a sacarosa (Page y col., 1998; Pankiw y Page, 1999). Se transforman los resultados del ensayo de PER con concentraciones crecientes de sacarosa en puntuaciones de sacarosa. Una puntuación PER está directamente relacionada con el umbral de respuesta de la abeja individual, por que la mayoría de las abejas continúan respondiendo a todas las concentraciones crecientes de sacarosa tras la respuesta inicial. Una puntuación de PER de 6, en la que se la abeja individual responde a todas las 6 concentraciones de sacarosa, comenzando por 0,1% de sacarosa en el ensayo de PER, representa un umbral de respuesta 300 veces más bajo que una puntuación de 1, en la que el individuo responde únicamente a un 30 % de sacarosa. El umbral de respuesta (RT) de una abeja individual es una "ventana" en la cual el sistema neurosensorial se encuentra correlacionado con el comportamiento libador (Pankiw y Page, 2000), y edad (Pankiw y Page 1999; Pankiw 2003), y se modula por medio de feromona de cría (Pankiw y Page, 2001, 2003). Los inventores usan el ensayo de PER-RT de sacarosa como método para evaluar la bioactividad de la feromona de cría estabilizada almacenada durante varios periodos a temperatura ambiente.

Se sacaron abejas de miel procedentes de al menos seis fuentes de "tipo natural" durante 3 h de sus panales y se introdujeron en una incubadora mantenida a 33 °C y 55 % de HR. Se colocaron aleatoriamente trescientas abejas recién sacadas en jaulas de malla de alambre de plexiglass (14,6 x 10 x 7,7 cm). Se proporcionó a las jaulas disolución de sacarosa de 30 %, agua a voluntad y se sometió a cría en las condiciones de incubadora anteriores. Se escogieron jaulas individuales para los siguientes tratamientos: a) feromona de cría no estabilizada almacenada a temperatura ambiente, 2) feromona de cría estabilizada con butil-hidroquinona terciaria y almacenada a temperatura ambiente, 3) feromona de cría no estabilizada recién preparada, y 4) un control sin feromona. La composición de la feromona preparada era: linoleato de etilo 1 %, linolenato de etilo 13 %, oleato de etilo 8 %, palmitato de etilo 3 %, estearato de etilo 7 %, linoleato de metilo 2 %, linolenato de metilo 21 %, oleato de metilo 25 %, palmitato de metilo 3 % y estearato de metilo 17 %. Las jaulas de feromonas recibieron 300 equivalentes de larvas (LEq) al día (proporción de 1:1 de feromona de cría a las abejas). Se formuló la feromona en isopropanol de manera que se suministraron 300 LEq en aproximadamente 15 µl de disolución. La jaulas de control recibieron un volumen igual de isopropanol diariamente. Se suministraron diariamente los respectivos tratamientos en una placa de vidrio (7 x 8 cm) una vez que se hubo evaporado el isopropanol. Se criaron las abejas como se ha comentado anteriormente durante seis días, y posteriormente se sometieron a ensayo para evaluar su umbral de respuesta a sacarosa como se ha descrito anteriormente. Se siguió este protocolo en los días 48, 123 y 231 después de la preparación de formulaciones de feromona de cría estabilizada y no estabilizada. Entre el tratamiento, se compararon las puntuaciones usando ensayos de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

La feromona de cría estabilizada mostró bioactividad que no fue diferente de la feromona de cría formulada (Tabla 1). Las abejas de miel expuestas a feromona de cría estabilizada mostraron de manera consistente un umbral de respuesta frente a sacarosa que fue de al menos 1,75 veces más elevado que la respuesta de abejas no expuestas en jaulas de control. Adicionalmente, la respuesta frente a sacarosa de abejas de miel expuestas a feromona de cría no estabilizada almacenadas a temperatura ambiente durante 48, 123 y 231 días no fue significativamente diferente a la de abejas de control no expuestas a feromonas.

Estos resultados demuestran que la feromona de cría estabilizada muestra bioactividad a largo plazo cuando se almacena a temperatura ambiente. Esta bioactividad es estadísticamente la misma que la inducida por feromona de cría formulada de nuevas. Estos resultados indican que la adición de butilhidroquinona terciaria a los diez componentes de feromona no tuvo efecto sobre la bioactividad de la feromona.

Tabla 1. Bioactividad de feromona de cría, estabilizada y no estabilizada, almacenada a temperatura ambiente, frente a feromona de cría formulada de nuevo como porcentaje de respuesta frente a sacarosa en abejas de miel que se mantienen en un entorno de control sin feromonas. Las probabilidades de cada valor indican la probabilidad de que la respuesta frente a sacarosa sea similar a la de abejas en el entorno de control que no contiene feromonas.

Días a temperatura ambiente	% de feromona inestable de cría	% de feromona estabilizada de cría	Feromona inestable de cría, nuevamente formulada
48	17,0 (P > 0,05)	88,1 (P < 0,01)	78,7 (P < 0,001)
123	6,8 (P > 0,05)	75,6 (P < 0,001)	68,5 (P < 0,001)
231	3,7 (P > 0,05)	89,7 (P < 0,0001)	91,0 (P < 0,0001)

5

#### Ejemplo 4

#### Feromona de Cría Formulada a Partir de Libadoras de Polen de Abejas de Miel que Liberan Ésteres de Ácido Graso de Calidad Técnica y de Calidad de Reactivo

10

Todas las formulaciones anteriores de feromona de cría estuvieron formadas por compuestos de calidad de reactivo de pureza mayor que 99 % suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los compuestos de calidad de reactivo son los que se usan más comúnmente como patrones en la identificación química, para síntesis química, o en cualquier otra aplicación en la que la pureza es esencial. No obstante, la cantidad de pureza es directamente proporcional al coste del compuesto. Una manera de reducir el coste de la feromona de cría consiste en formularlo usando componentes menos puros de calidad técnica. Aunque se reduce el coste significativamente con componentes de calidad técnica existe una relación. Los componentes de calidad técnica procedente de fuentes naturales que contienen mezclas de ácidos grasos no en las proporciones exactas de la feromona de cría natural. Los inventores han planteado la hipótesis de que las abejas expuestas a feromona de cría formulada a partir de componentes de calidad técnica o de calidad de reactivo serían libadoras de polen a un nivel más elevado que las abejas no expuestas a feromona.

15

20

Se replicó este experimento seis veces el 7 de junio de 2005. Se seleccionaron aleatoriamente colonias de abejas de miel típicas para recibir uno de los siguientes tratamientos; 1) placa de vidrio de blanco, control, 2) feromona de cría de calidad de reactivo estabilizada con butil hidroquinona terciaria, o 3) similarmente feromona de cría de calidad técnica estabilizada. Las mezclas de feromonas se formularon con butil hidroquinona terciaria de acuerdo con las proporciones que se presentan en la Tabla 2. Se aplicó un total de 1,12 mg de ésteres totales a la placa de vidrio (20 cm x 10 cm) y se colocó la placa en el centro del área nido de cría de la colonia. Una hora después, se llevaron a cabo cuentas de entrada cada cinco minutos de las libadoras que volvían con polen y sin polen. Las libadoras de polen son visiblemente evidentes ya que el polen es transportado fuera del cuerpo sobre áreas especializadas de las patas traseras denominadas corbículas. Las cargas líquidas como el néctar y el agua son transportadas internamente en el buche y no resultan evidentes a simple vista. Cuando el tipo, presencia o ausencia de carga no resulta evidente a simple vista, dichas abejas que vuelven se clasifican como libadoras que no son de polen. Los observadores usan contadores de registro manuales, por un lado para las libadoras de polen y por otra, para las libadoras que no son de polen. Se midió cada colonia dos veces a la hora durante dos horas por personas diferentes para un total de cuatro cuentas de cinco minutos por cada colonia. Los individuos que llevaron a cabo las cuentas fueron anónimos con respecto a los tratamientos.

25

30

35

Se analizaron los datos de cuentas usando Análisis de Tabla de Contingencia. Comparado con el control de blanco sin feromonas, tanto las formulaciones de calidad técnica ( $\chi^2 = 7,0$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0,01$ ) como las formulaciones de calidad de reactivo ( $\chi^2 = 15,0$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0,0001$ ) indujeron proporciones significativamente más elevadas de libadoras de polen con respecto a libadoras que no eran de polen que entraban en las colonias (Tabla 3). La formulación con calidad de reactivo liberó una proporción ligeramente más elevada de libadoras de polen que la formulación de calidad técnica ( $\chi^2 = 3,9$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0,048$ ).

45

Todos descubrimientos pertinentes surgen de este estudio. En primer lugar, la feromona de cría estabilizada de cualquier calidad es capaz de inducir un carácter libador de polen mejorado. En segundo lugar, la feromona de cría formulada de calidad técnica aumentó la proporción de libadoras de polen en aproximadamente 116 % con respecto al tratamiento de control sin feromona, únicamente 3,5 % menos que el inducido por medio de la formulación de calidad de reactivo. De este modo, a un coste de únicamente 7 % de la formulación de calidad de reactivo, parece que la feromona de cría formulada de calidad técnica estabilizada con buti-hidroquinona terciaria es un producto eficaz y económicamente viable.

50

Tabla 2. Formulación de feromona de cría de calidad de reactivo y calidad técnica.

Compuesto	Ésteres de ácido graso de calidad de reactivo + 0,05 % de butil hidroquinona terciaria (% de ésteres totales)	Ésteres de ácido graso de calidad técnica + 0,05 % de butil hidroquinona terciaria (% de ésteres totales)
Palmitato de metilo	3,00	2,03
Palmitato de etilo	3,00	4,23
Estearato de metilo	17,00	15,17
Oleato de metilo	25,00	25,04
Estearato de etilo	7,00	8,88
Oletato de etilo	8,00	6,72
Linoleato de metilo	2,00	8,63
Linoleato de etilo	1,00	3,5
Linolenato de metilo	21,00	17,07
Linolenato de etilo	13,00	8,73

Tabla 3. Proporción de libadoras de polen con respecto a libadoras que no son de polen que entran en las colonias en un período de 5 minutos.

Tratamiento	Proporción de libadoras de polen con respecto a libadoras que no son de polen	Probabilidad <sup>1</sup>
Control	0,38	
Ésteres de ácido graso de calidad técnica + butil-hidroquinona terciaria	0,82	< 0,01
Ésteres de ácido graso de calidad de reactivo + butil-hidroquinona terciaria	0,85	< 0,0001

5 <sup>1</sup>Probabilidades de Análisis de Tabla de Contingencia en el que la hipótesis nula es que las proporciones de control y tratamiento son iguales

### Ejemplo 5

#### 10 Estimulación del Consumo de Polen en la Dieta

Se llevó a cabo este experimento en 1-15 de marzo de 2004. Se seleccionaron aleatoriamente doce colonias típicas del colmenar de Texas A&M University. Se estimaron las medidas de las colonias por medio del uso de una rejilla dividida en secciones cuadradas, 6,45 cm<sup>2</sup>. Se convirtió el área cubierta por abejas en número de abejas; aproximadamente 1,5 abejas por cm<sup>2</sup> (Pankiw y Page 2001; Pankiw y Rubink 2002). Se midió el área de panal ocupada por huevos, larvas y crisálidas, conocidas comúnmente. Se seleccionaron aleatoriamente seis colonias para recibir el tratamiento diario de feromona de cría a tres equivalentes de larvas/abeja/día (1,55 µg/abeja/día), y seis colonias recibieron una placa de vidrio de blanco. Se sabe que una dosis de tres equivalentes de larvas/abeja/día aumenta la cantidad de libadoras de polen en colonias de gran tamaño (Pankiw y Page 2001). Se suministró a cada colonia un complemento de dieta de polen disponible comercialmente: 450 g de BroodBuilder (Dadant&Sons, Hamilton, IL), conformado como una empanada de hamburguesa entre dos piezas de papel de cera rayado. Se proporcionaron empanadas nuevas tras el consumo de la empanada anterior. Se inspeccionaron las colonias cada tres días durante quince días para evaluar el consumo de empanada. Se proporcionó una nueva empanada a las colonias que habían consumido totalmente la empanada anterior. Se llevaron a cabo las mediciones de las colonias en los días 7 y 15. Todas las colonias recibieron una empanada de complemento de polen nuevo independientemente de la cantidad usada en el día 7. Se retiraron las empanadas viejas no consumidas y se pesaron para estimar la cantidad consumida.

30 Se usó análisis de varianza para comparar las colonias tratadas con feromona y las colonias de control. No fue necesario llevar a cabo el análisis de la co-varianza ya que al comienzo del experimento el número de abejas y las cantidades de espacio de panal usadas por las crías, el polen, la miel y las celdas vacías no fue significativamente diferente entre los grupos de tratamiento ( $P > 0,05$ ).



Las colonias tratadas con feromona de cría consumieron significativamente más complemento de polen que las colonias de control en las semanas 1 y 2 (Tabla 4). El área de cría no fue diferente entre los tratamientos en la semana 1 ( $F_{1,11} = 0,3$ ,  $P > 0,05$ ). En la semana 2 el área de cría fue significativamente mayor en el grupo tratado con la feromona de cría ( $F_{1,11} = 10,6$ ,  $P < 0,01$ ; Tabla 2).

Estos resultados indican que se puede usar la feromona de cría estabilizada para estimular el consumo de alimento, dando como resultado una mayor producción de crías, lo que a su vez puede conducir a un mayor vigor de la colonia. También se puede explotar el mayor consumo de alimento por medio de la incorporación de complementos de la dieta o antibióticos a la empanada de polen u otra fuente de alimento.

Tabla 4. Comparación del área de consumo de polen y de cría entre colonias de abejas de miel expuestas a feromona de cría y colonias de control no expuestas.

Tratamiento/Estadísticas	Consumo (g)		Área de cría (cm <sup>2</sup> ) <sup>*</sup>	
	semana 1	semana 2	semana 1	semana 2
Feromona de cría	406,6 ± 9,5	422,5 ± 17,0	3928 ± 586	2975 ± 330
Control	185,0 ± 21,4	178,3 ± 27,2	3472 ± 668	1800 ± 142
ANOVA $F_{1,11}$	89,7	57,2	0,3	10,7
Probabilidad	0,0001	0,0001	0,6	0,008

### Referencias

#### Documentos de Patente de EE.UU.

Page, R.E. Jr. y T. Pankiw. 2002. Syntheticbeepollenforagingpheromone and uses thereof. Patente de EE.UU. Nº. 2002/0182977 A1.

#### Otras publicaciones

Filmer, R.S. 1932. Brood area and colony size as factors in activity of pollination units. J. Econ. Entomol. 25: 336-343.

Free, J.B. 1967. Factors determining the collection of pollen by honeybee foragers. Anim. Behav. 15: 134-144.

Herbert, E.W. 1992. Honey bee nutrition. Pp. 197-233. In: Graham, J.M. (ed.). The hive and the honey bee. Rev. Ed. Dadant & Sons, Hamilton, Illinois.

LeConte, Y., G. Arnold, J. Trouiller and C. Masson. 1990. Identification of a brood pheromone in honeybees. Naturwissenschaften 81: 462-465.

LeConte, Y., A. Mohammadi and G.E. Robinson. 2000. Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. Proc. R. Soc. London B 268: 163-168.

Page, R.E., Jr., J. Erber and M.K. Fondrk. 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). J. Comp. Physiol. A 182: 489-500.

Pankiw, T. 2003. Directional change in a suite of foraging behaviors in tropical and temperate evolved honey bees (*Apis mellifera* L.). Behav. Ecol. Sociobiol. 54: 458-464.

Pankiw, T. 2004a. Cued in: honey bee pheromones as information flow and collective decision making. Apidologie 35: 217-226.

Pankiw, T. 2004b. Brood pheromone regulates foraging activity of honey bees (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol. 97: 748-751.

Pankiw, T. and R.E. Page, Jr. 1999. The effects of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). J. Comp. Physiol. A 185: 207-213.

Pankiw, T. and R.E. Page, Jr. 2000. Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honey bees. Behav. Ecol. Sociobiol. 47: 265-267.

Pankiw, T. and R.E. Page, Jr. 2001. Brood pheromone modulates sucrose response threshold in honeybees (*Apis mellifera* L.). Behav. Ecol. Sociobiol. 49: 206-213.

- Pankiw, T. and R.E. Page, Jr. 2003. Effect of pheromones, hormones and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* 188:675-684.
- 5 Pankiw, T. and W.L. Rubink. 2002. Pollen foraging response to brood pheromone by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95: 761-767.
- Pankiw, T., R.E. Page, Jr. and M.K. Fondrk. 1998. Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 44: 193-198.
- 10 Pankiw, T., C.M. Nelson, R.E. Page, Jr. and M.K. Fondrk. 2004a. The communal crop: Modulation of sucrose response thresholds of pre-foraging honey bees with incoming nectar quality. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 55: 286-292.
- Pankiw, T., R. Roman, R.R. Sagili and K. Zhu-Salzman. 2004b. Pheromone-modulated behavioral suites influence colony growth in the honey bee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 91: 575-578.
- 15

**REIVINDICACIONES**

5 1.- Un método para estabilizar una feromona sintética de cría de abejas de miel, formada por dos o más de linoleato de etilo, linolenato de etilo, oleato de etilo, palmitato de etilo, estearato de etilo, linoleato de metilo, linolenato de metilo, oleato de metilo, palmitato de metilo o estearato de metilo, que comprende incorporar con la feromona una cantidad eficaz de un antioxidante compatible con feromonas, en el que el antioxidante compatible con feromonas comprende butilhidroquinona terciaria.

10 2.- Una composición sintética de feromona de cría de abejas de miel, formada por:

(a) dos o más de linoleato de etilo, linolenato de etilo, oleato de etilo, palmitato de etilo, estearato de etilo, linoleato de metilo, linolenato de metilo, oleato de metilo, palmitato de metilo o estearato de metilo; y

15 (b) una cantidad eficaz de buti-hidroquinona terciaria, para administración a abejas de miel, colonias de abejas de miel, o unidades de polinización.

20 3.- La composición de la reivindicación 2, en la que las cantidades en peso de los componentes en (a) son: 0,1-50 % de linoleato de etilo, 1,3-50 % de linolenato de etilo, 0,8-50 % de oleato de etilo, 0,3-50 % de palmitato de etilo, 0,7-50 % de estearato de etilo, 0,2-50 % de linoleato de metilo, 0,2-50 % de linolenato de metilo, 0,3-50 % de oleato de metilo, 0,3-50 % de palmitato de metilo y 1,7-50 % de estearato de metilo.

4.- La composición de la reivindicación 3, en la que la cantidad en peso de butil-hidroquinona terciaria es de 0,001 a 50 % de los ésteres totales.

25 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, formada por los ésteres de ácido graso de calidad de reactivo:

palmitato de metilo	3,00 %
palmitato de etilo	3,00 %
estearato de metilo	17,00 %
oleato de metilo	25,00 %
estearato de etilo	7,00 %
oleato de etilo	8,00 %
linoleato de metilo	2,00 %
linoleato de etilo	1,00 %
linolenato de metilo	21,00 %
linolenato de etilo	13,00 %

30 y butil-hidroquinona terciaria 0,05 % de los ésteres totales.

6.- Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, formada por los ésteres de ácido graso de calidad técnica:

palmitato de metilo	2,03 %
palmitato de etilo	4,23 %
estearato de metilo	15,17 %
oleato de metilo	25,04 %
estearato de etilo	8,88 %
oleato de etilo	6,72 %
linoleato de metilo	8,63 %
linoleato de etilo	3,5 %
linolenato de metilo	17,07 %
linolenato de etilo	8,73 %

35 y butil-hidroquinona terciaria 0,05 % de los ésteres totales.

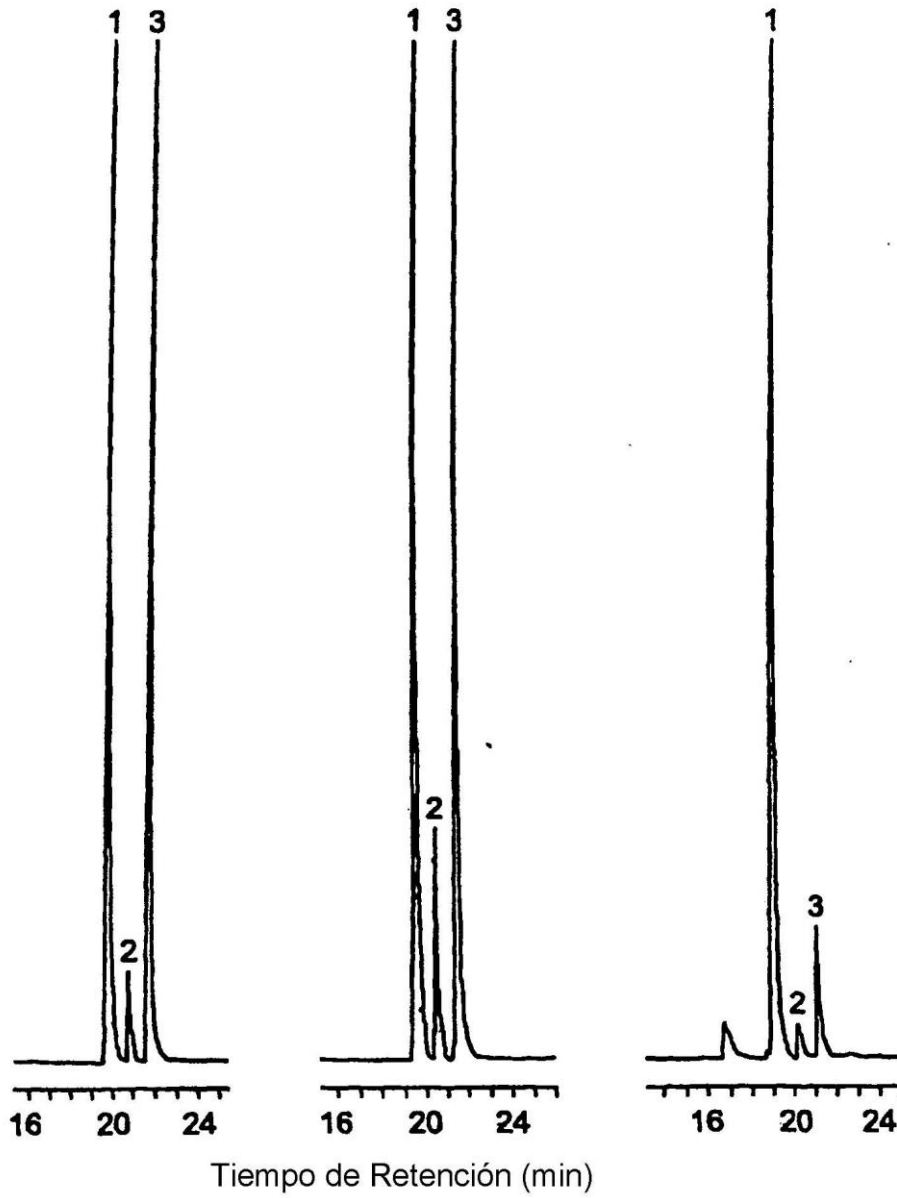
- 5 7.- Un método par administrar una composición según la reivindicación 3 a abejas de miel, colonias de abejas de miel o unidades de polinización, que comprende incorporar la composición en una sustancia inerte seleccionada entre el grupo que consiste en parafina, cera vegetal, cera de abeja, sílice, alúmina, celulosa, celulosa modificada, tejido de plantas seco, madera y polímero sintético.
- 8.- El método de la reivindicación 7, en el que la composición se usa para aumentar la proporción de libadoras de polen con respecto a libadoras que no son de polen entre las abejas de miel obreras.
- 10 9.- El método de la reivindicación 7, en el que la composición se usa para rebajar o retrasar la edad del primer libado por parte de las abejas de miel obreras.
- 10.- El método de la reivindicación 7, en el que la composición se usa para aumentar el número total de abejas de miel obreraslibadoras.
- 15 11. El método de la reivindicación 7, en el que la composición se usa para aumentar el peso de la carga de polen que vuelve a la colonia por medio de las abejas de miel obreras libadoras de polen.
- 12.- El método de la reivindicación 7, en el que la composición se usa para aumentar el número de granos de polen transportados por los cuerpos de las abejas de miel obreras libadoras que no son de polen.
- 20 13.- El método de la reivindicación 7, en el que la composición se usa para aumentar la polinización de un cultivo diana próximo o en el que se colocan las colonias de abejas de miel o unidades de polinización.
- 14.- El método de la reivindicación 7, en el que se usa la composición para estimular el desarrollo de la glándula hipofaríngea para el alimento de crías y la producción de proteína glandular en obreras de abejas de miel.
- 25 15.- El método de la reivindicación 7, en el que la composición se usa para estimular el consumo de proteína de la dieta, componentes de la dieta y complementos de antibiótico por parte de las abejas de miel.
- 30 16.- El método de la reivindicación 7, en el que se usa la administración continua de la composición a una colonia de abejas de miel durante un período de al menos aproximadamente dos semanas o más para aumentar el número de abejas criadas en el interior de la colonia.
- 17.- El método de la reivindicación 7, en el que se usa la administración continua de la composición a una colonia de abejas de miel para inhibir la fuga de abejas de la colonia.
- 35 18.- El método de la reivindicación 7, en el que se administra la composición en combinación con feromona sintética de glándula mandibular de reina de abejas de miel, a abejas de miel, colonias de abejas de miel o unidades de polinización.
- 40 19.- El método de la reivindicación 18, en el que se administra la composición en combinación con feromona sintética de glándula mandibular de reina de abejas de miel, a plantas en floración sobre las cuales se pretende una polinización mejorada.

Ésteres metílicos

No estabilizado  
Tiempo cero

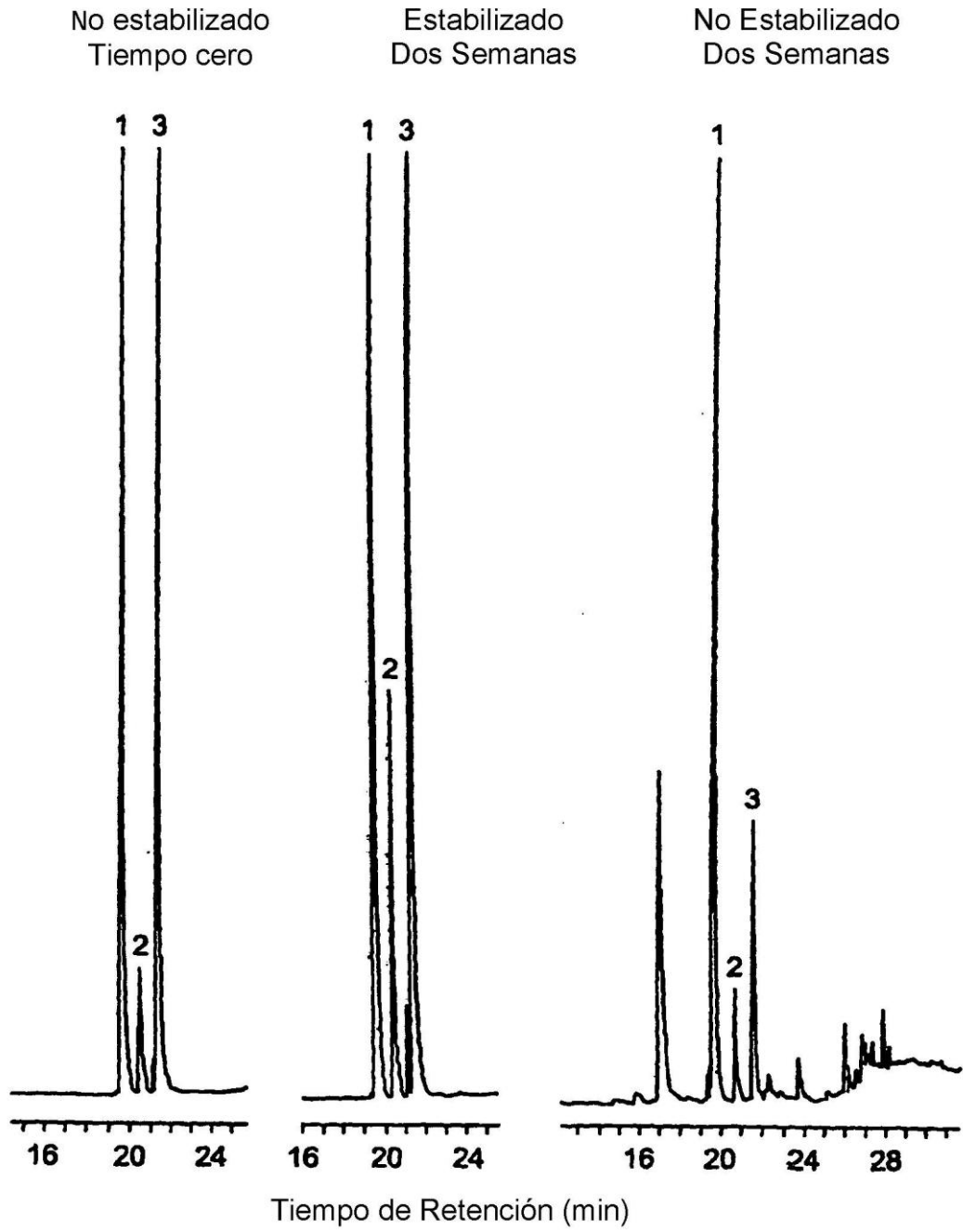
Estabilizado  
Dos Semanas

No Estabilizado  
Dos Semanas



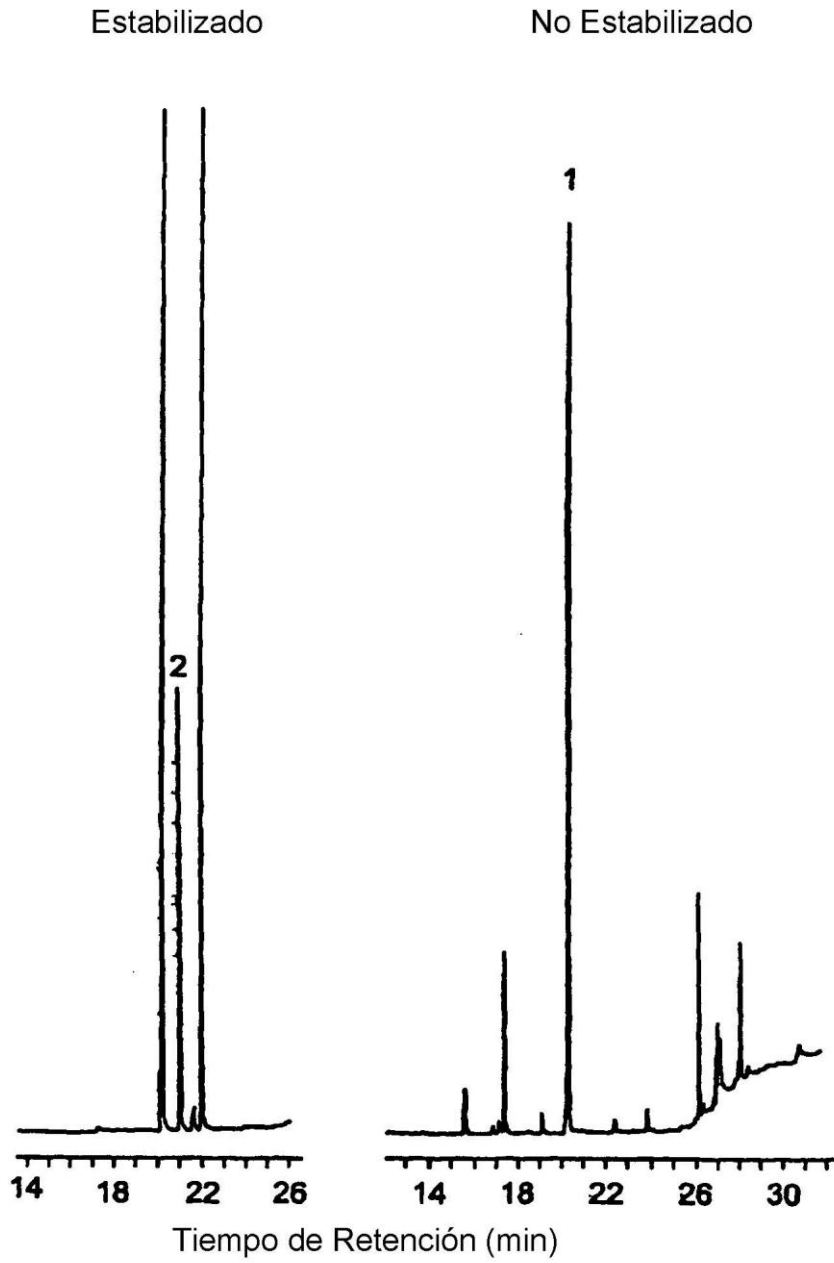
**Fig. 1**

Ésteres Etílicos



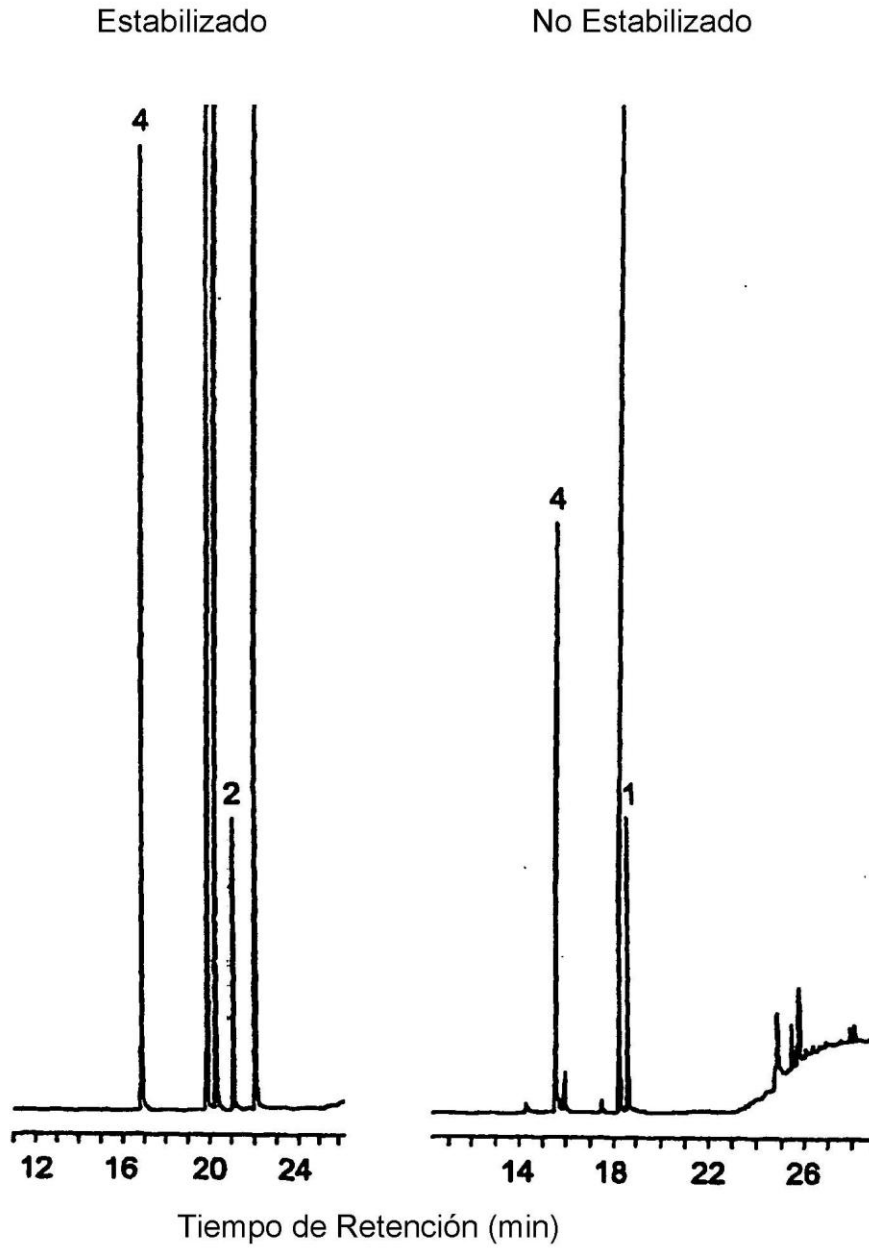
**Fig. 2**

Ésteres Etílicos, 20 Semanas



**Fig. 3**

Ésteres Etílicos, 72 Semanas



**Fig. 4**