

Estudio de la idoneidad de la suplementación lipídica con piensos comerciales en *Apis mellifera* en épocas de escasez de floraciones

Study of the suitability of lipid supplementation with commercial feedstuffs in *Apis mellifera* in flowering shortage periods



Trabajo de Fin de Grado
Cynthia Jiménez Barreto

Tutorizado por José Antonio Pérez Pérez y Diana F. Botelho Reis

Grado en Biología. Julio 2023

Lista de contenidos

1. Resumen.....	4
1. Abstract	4
2. Introducción	5
2.1 Lípidos esenciales para las abejas	7
2.2 Suplementación dietética comercial en la apicultura	9
3. Objetivos	10
4. Material y métodos.....	11
4.1 Diseño experimental y recogida de muestras	11
4.3 Determinación del perfil de clases lipídicas.....	16
4.4 Determinación del perfil de ácidos grasos	16
4.5 Análisis estadístico.....	18
5. Resultados y discusión	19
5.1 Contenido lipídico y composición en clases lipídicas.....	19
5.2 Perfil de ácidos grasos.....	22
6. Conclusiones	27
6. Conclusions	27
7. Bibliografía	28

1. Resumen

El polen es una de las principales fuentes de alimento para las abejas, aportando proteínas, lípidos y otros micronutrientes y fitoquímicos esenciales. Sin embargo, en épocas de escasez de polen, es común la alimentación de las abejas con suplementos comerciales. En este sentido, el objetivo principal del presente estudio fue evaluar la idoneidad de dos alimentos comerciales (APICOMIN *complet* y APIPASTA PLUS), como suplemento en el cultivo de abejas *Apis mellifera*, prestando especial atención al contenido y perfil lipídico. Para ello, se analizaron muestras de ambos piensos, larvas de abeja de más de 3 días de desarrollo, muestras de polen recolectados por las abejas y pan de abeja, formulado por estas. Los resultados de este estudio sugieren que ninguno de los dos alimentos contiene el perfil o contenido lipídico adecuado, para sustituir el polen durante las épocas de escasez.

Palabras clave: Larvas de *Apis mellifera*, Nutrición lipídica, Polen, Pan de Abeja, Suplementación comercial.

1. Abstract

Pollen is one of the main sources of food for bees, providing proteins, lipids and other essential micronutrients and phytochemicals. However, in times of pollen scarcity, it is common to feed bees with commercial supplements. In this sense, the main objective of this study was to evaluate the suitability of two commercial feeds (APICOMIN *complet* and APIPASTA PLUS) as a supplement in the culture of *Apis mellifera* bees, paying special attention to the content and lipid profile. Samples of both feeds, bee larvae with more than 3 days of development, pollen samples and bee bread were analyzed. The results of this study suggest that neither of the two foods contains the adequate profile or lipid content to replace pollen during times of pollen scarcity.

Keywords: *Apis mellifera* larvae, Bee bread, Commercial supplementation, Lipid nutrition, Pollen,

2. Introducción

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) son insectos sociales que viven en colonias altamente organizadas, compuestas por una reina, miles de obreras y algunos zánganos, en donde existe una cooperación en el cuidado de la cría y una superposición de generaciones (Arien et al., 2018; Vaudo et al., 2015). La división del trabajo entre las obreras depende de la edad, siendo las abejas jóvenes las trabajadoras principales del interior de la colonia, mientras que las abejas más viejas se dedican a la búsqueda de alimento (Arien et al., 2018). Asimismo, se trata de una especie generalista (forrajera en una amplia gama de especies de plantas de diferentes familias), cualidad que garantiza la reproducción de muchas especies vegetales y que proporciona contribuciones esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas naturales y agrícolas (Arien et al., 2018; Di Pasquale et al., 2013; Vaudo et al., 2015). Incluso, se ha estimado que, directa e indirectamente, un tercio de los alimentos que consumimos proviene de la polinización de las abejas melíferas (Arien et al., 2018; vanEngelsdorp et al., 2010). No obstante, este grupo tan importante de polinizadores se encuentra gravemente amenazado debido al impacto de diferentes factores bióticos y abióticos causados por actividades humanas, como los pesticidas, el uso intensivo de la tierra, el cambio climático, la introducción de especies invasoras, patógenos y parásitos como los ácaros varroa (*Varroa destructor*), ácaros traqueales de las abejas melíferas (*Acarapis woodi*), enfermedades fúngicas, bacterianas y virales (Parreño et al., 2022; vanEngelsdorp et al., 2010). De igual modo, el uso a gran escala de la tierra reduce la abundancia floral y la riqueza de especies disponibles, lo que restringe el panorama nutricional de las abejas (Vaudo et al., 2015).

Las abejas deben tener una variedad de recursos florales diversos de los cuales puedan seleccionar su dieta para satisfacer sus requerimientos nutricionales específicos, lo que les ayuda a mantener una población saludable, capaz de resistir a enfermedades y estrés (Vaudo et al., 2015). Es más, se ha podido comprobar que una nutrición adecuada, rica en diversidad de polen, mejora el sistema inmunológico de las abejas y su resistencia a patógenos, tanto a nivel individual como de manera generalizada dentro de la colmena (Alaux et al., 2010; Parreño et al., 2022). Por el contrario, la ingesta crónica de alimentos monótonos, inadecuados, de baja calidad o tóxicos reduce la competencia inmunológica, lo que afecta a la salud de las abejas a través del “estrés nutricional” (Parreño et al., 2022). De manera sencilla, la nutrición de las abejas se divide entre néctar y polen, siendo el

néctar la fuente principal de carbohidratos, mientras que el polen proporciona proteínas, lípidos y otros micronutrientes (vitaminas y minerales) y fitoquímicos (carotenoides, flavonoides, alcaloides y fenoles) que tienen propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana (Vaudo et al., 2015). Las abejas forrajeras o pecoreadoras, recolectan néctar para producir miel, que es la principal fuente de nutrición de carbohidratos de las abejas adultas y las crías en desarrollo (Avni et al., 2014). Las larvas, que son relativamente inmóviles, no requieren la misma cantidad de carbohidratos que las abejas adultas encargadas de buscar alimento y termorregular el nido de cría, sino que sus demandas nutricionales pueden ser satisfechas mediante una combinación de polen (que dispone de carbohidratos digestibles) y néctar (Avni et al., 2014; Vaudo et al., 2015). Los carbohidratos también son utilizados por las abejas melíferas jóvenes para biosintetizar lípidos, como la cera, que es el principal material de construcción de las abejas (Avni et al., 2014).

Por otro lado, el polen que es recolectado y almacenado en celdillas dentro de las colmenas de las abejas está repleto de microbios no patógenos especializados, que fermentan y consumen el polen crudo, mejorando su digestibilidad, “vida útil” y contenido nutricional (Dharampal et al., 2019). Esta mezcla de polen fermentado rica en nutrientes, miel, néctar y diversos microbios (Dharampal et al., 2019), es lo que se conoce en apicultura como “pan de abeja”. La cantidad de proteínas presente en el polen varía considerablemente entre las especies de plantas, oscilando entre el 2% y el 60%, y aunque no se ha demostrado una preferencia clara por el polen con alta concentración de proteínas en las abejas melíferas, disminuciones significativas en las proteínas del polen en la colonia resulta en tasas de recolección de polen más altas (Vaudo et al., 2015). Además, una concentración elevada de proteínas se correlaciona positivamente con el crecimiento de las larvas y el desarrollo ovárico y la puesta de huevos en *A. mellifera* (Vaudo et al., 2015). No obstante, se ha visto que proporciones elevadas de proteína:lípido (P:L) tienen un efecto negativo en la fisiología de las abejas cuando son expuestas a insecticidas (Crone & Grozinger, 2021). Por otro lado, los lípidos presentes en el polen (incluyendo ácidos grasos esenciales y esteroides), pueden variar considerablemente entre las diferentes especies de plantas, desde el 1% hasta el 20% (Vaudo et al., 2015). Los integrantes básicos de la estructura de los lípidos, los ácidos grasos (AG), son el componente principal de las membranas celulares, imprescindibles para la reproducción y el

desarrollo, además de servir como fuente de energía y para el desarrollo del cuerpo graso en las abejas durante el invierno (Arien et al., 2018).

2.1 Lípidos esenciales para las abejas

Los lípidos son cruciales para una variedad de procesos fisiológicos en las abejas (como la producción de huevos, producción de cera, fuente de energía secundaria) y contribuyen a la salud y ontogenia de las larvas y los adultos (Vaudo et al., 2015). Los ácidos grasos esenciales (AGE) (aquellos que no puede producir el organismo) deben de ser incorporados a través de la dieta. El ácido alfa-linolénico (ALA o 18:3n-3) y el ácido linoleico (LA o 18:2n-6) son los principales AG omega-3 y omega-6, respectivamente, que se encuentran en el polen, aunque su abundancia difiere entre las diferentes especies de plantas (Arien et al., 2018). No se ha encontrado, hasta la fecha, que las abejas melíferas sean capaces de sintetizarlos (Arien et al., 2020). Se ha podido verificar que el LA es un AGE para la mayoría de especies de insectos, y que está asociado con una mayor producción de obreras en las colonias de *A. mellifera* (Vaudo et al., 2015). En los mamíferos, el LA se puede elongar y desaturar hasta sintetizar el ácido araquidónico (ARA o 20:4n-6) y el ALA producir ácido eicosapentaenoico (EPA o 20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA o 22:6n-3), AGE dominantes en los mamíferos que se pueden obtener a través de la dieta principalmente mediante el consumo de aceite de pescado y algas marinas (Simopoulos, 2009). En los mamíferos es bien conocida la importancia de los AG omega-3, ya que conforman una proporción importante de los AG totales del cerebro, la retina y el esperma (Arien et al., 2018). Los efectos nutricionales de la deficiencia de omega-3 en insectos se investigaron por primera vez en abejas melíferas, arrojando que su deficiencia perjudicaba en gran medida el aprendizaje asociativo olfativo y táctil, extendiendo el hallazgo de la importancia de los omega-3 a un “no mamífero” (Arien et al., 2015). A raíz de estos resultados, Arien et al. (2018) plantearon la hipótesis de que podía existir una dinámica importante de LA:ALA (omega-6:omega-3) en las abejas que afectara a su cognición y salud. La conclusión de su estudio fue que, a pesar de proporcionarles altas concentraciones de ALA en la dieta a las abejas para suplir las posibles deficiencias, una proporción muy elevada de omega-6:omega-3 perjudicaba en igual o mayor medida su capacidad cognitiva. Esto es un hallazgo interesante, ya que las abejas melíferas tienen sofisticadas habilidades de navegación y orientación, que son cruciales para la supervivencia de la colonia (Collet et al., 2013), por

lo que el efecto de una dieta con una proporción elevada de omega-6:omega-3 podría ocasionar un mayor porcentaje de deriva en el forrajeo y ocasionar el colapso de la colonia en el peor de los casos.

Por otro lado, como insectos sociales, los requerimientos nutricionales de *A. mellifera* varían de manera individual dentro de la colonia según la etapa de su ciclo de vida, casta y entre los grupos de trabajo de las obreras (Crailsheim et al., 1992). Por ello, las abejas recolectoras (más viejas) consumen principalmente carbohidratos, y las abejas nodrizas (más jóvenes) son las principales consumidoras de polen en la colmena (Arien et al., 2020). Las abejas nodrizas son las que se encargan de producir la gelatina o jalea real, una sustancia compuesta por la secreción de sus glándulas hipofaríngeas y mandibulares, con las que alimentan a las larvas y practican la trofalaxis con otras obreras, los zánganos y la reina (Arien et al., 2020; Di Pasquale et al., 2013). La ingesta de polen activa el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas (Di Pasquale et al., 2013). Se ha podido observar que una nutrición inadecuada en la colonia, incluyendo una baja proporción de ácidos grasos omega-3:omega-6, inhibe el desarrollo completo de las glándulas, aumentando el canibalismo larval de las abejas nodrizas y dando como resultado un menor número de celdas de cría sellada (Arien et al., 2020). Además, en las glándulas hipofaríngeas se expresa el gen de la glucosa oxidasa, enzima que cataliza la oxidación de la b-D-glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, este último con propiedades antisépticas, por lo que el atrofiamiento de estas glándulas también estaría comprometiendo la salud general de la colonia al no producirse estos compuestos antisépticos (Alaux et al., 2010). De igual modo, los lípidos de la dieta modifican la composición de AG del cuerpo de la abeja, incluido el contenido de lípidos abdominales o “cuerpo graso” (Arien et al., 2020). El cuerpo graso es análogo al tejido adiposo y al hígado de los vertebrados (Li et al., 2019), y el principal sitio de síntesis de péptidos antimicrobianos, y dada la condición altamente social de las abejas melíferas, su inmunidad no es solo individual, sino que depende del buen funcionamiento general de la colmena (Alaux et al., 2010), como se ha mencionado anteriormente. La composición de lípidos del cuerpo graso afecta la peroxidación de lípidos y, por lo tanto, la senescencia y la vida útil de las abejas melíferas (Arien et al., 2020).

2.2 Suplementación dietética comercial en la apicultura

A pesar de la condición generalista de las abejas melíferas, en ocasiones se pueden dar condiciones de sequía o escasez estacional de polen que repercute en la disponibilidad de recursos florales para su correcta nutrición. Por ello, es frecuente el uso de dietas comerciales artificiales en la apicultura para complementar su ingesta de polen cuando el forraje no está disponible o es limitado, debiendo aportar los lípidos y proteínas que normalmente provienen del polen natural (Corby-Harris et al., 2021). Las dietas artificiales para abejas suelen incorporar proteínas derivadas de fuentes vegetales (como la soja, maíz o trigo), animales (leche o huevo) y microbianas (levadura de cerveza), surgiendo las microalgas recientemente como un prometedor sustitutivo del polen debido a su alta biodisponibilidad y contenido de macronutrientes (Ricigliano et al., 2021).

Gran parte de la investigación sobre la nutrición del polen hasta la fecha se centra en las proteínas y los aminoácidos mientras que los lípidos, están emergiendo como un aspecto crítico de la nutrición de las abejas melíferas debido a su efecto positivo en la salud de estas (Corby-Harris et al., 2021).

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es determinar si la suplementación dietética con *APICOMIN complet* o *APIPASTA PLUS*, dos de los productos comerciales más fáciles de conseguir en las Islas Canarias para la alimentación apícola, incorporan a la dieta de *A. mellifera* los lípidos necesarios para sobrevivir ante las épocas de escasez de polen.

Para abordar este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el contenido lipídico, y el perfil de clases lipídicas y ácidos grasos de los dos alimentos comerciales ensayados.
- Establecer el efecto del suplemento nutricional suministrado en el perfil de clases lipídicas y ácidos grasos del pan de abeja, polen y larvas.

4. Material y métodos

4.1 Diseño experimental y recogida de muestras

El presente estudio se inició a mediados de septiembre de 2022, con la preparación de las abejas del colmenar, situado en Barranco Hondo, en el municipio de El Rosario (28N 366596 3142830 UTM), para la llegada del invierno. Durante un mes, todas las colmenas fueron alimentadas con alimentos comerciales, ricos en proteínas o azúcares en función de las carencias nutricionales detectadas en ese momento (falta de miel, escasez de polen, etc.). Una vez transcurrido este periodo, se inició el cribado de las mismas, seleccionando aquellas con una buena salud aparente, con el fin de evitar posibles bajas durante el experimento. El criterio de selección consistió en seleccionar las colmenas con 10 cuadros, de los cuales mínimo 2-3 estuvieran llenos de huevos, larvas o pupas por ambas caras, con al menos 3 cuadros de polen y 2 de miel, y 5-6 cuadros cubiertos por completo de abejas (ver imagen 1).

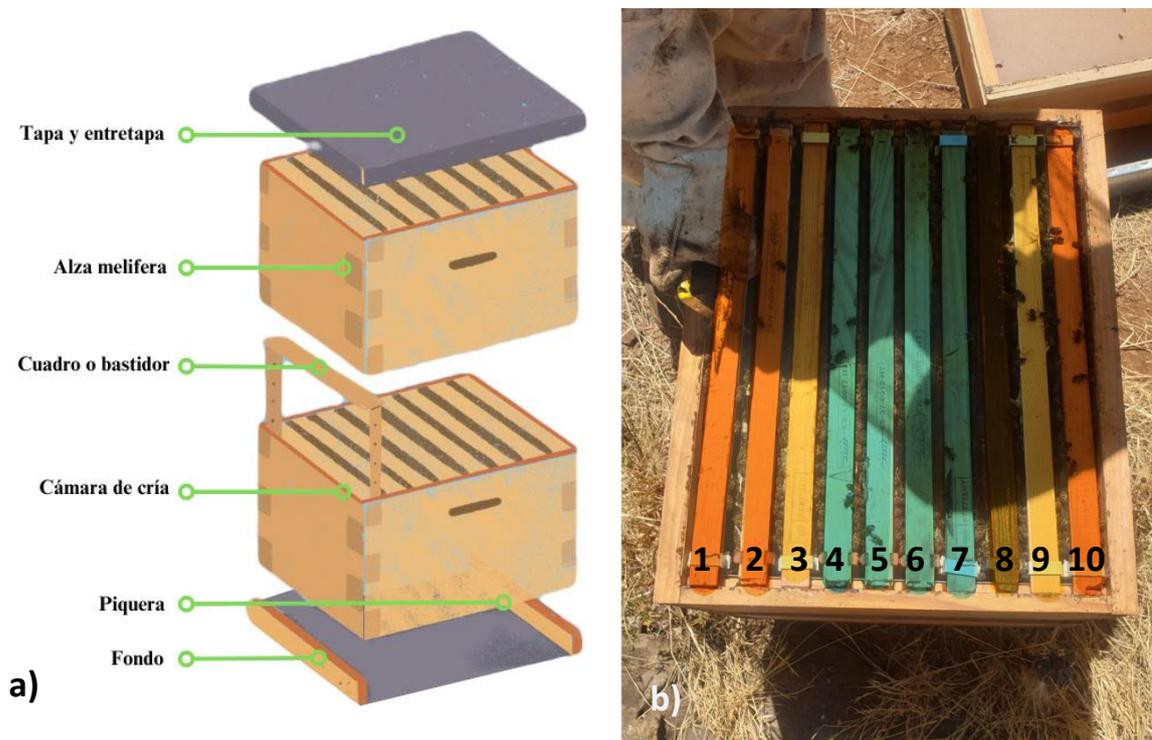


Imagen 1. a) partes en las que se divide una colmena modelo Langstroth, normalmente con capacidad para 8-10 cuadros; b) distribución de los recursos adoptada por las abejas en este modelo de colmenas. Lo que vemos en la imagen es la cámara de cría. En los cuadros azules (4-7) se encuentra concentrada la cría, en los amarillos (3, 8 y 9) el pan de abeja y en los naranjas (1, 2 y 10) la miel.

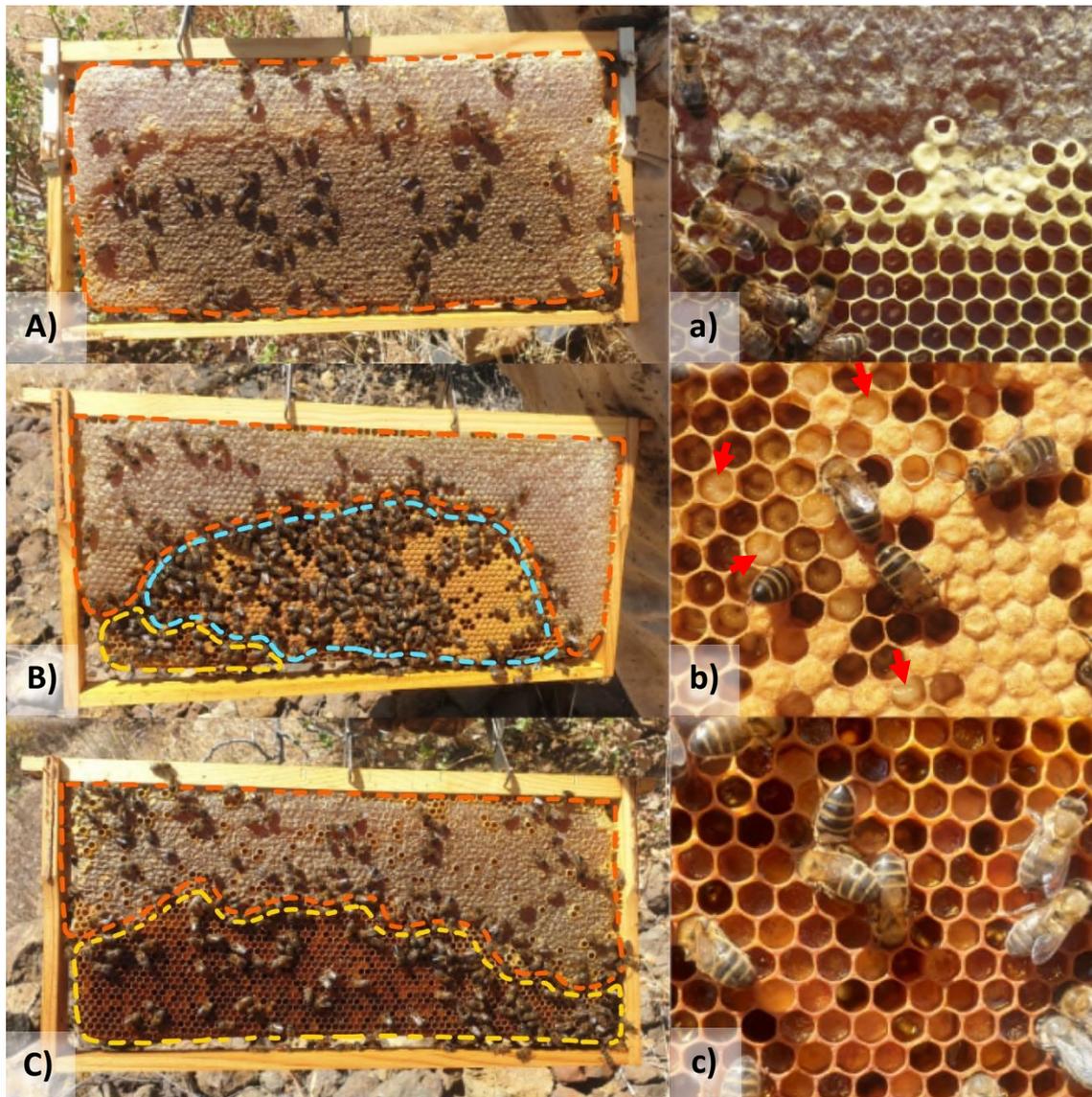


Imagen 2. Distribución espacial de los recursos que realizan las abejas en cuadros de colmena Langstroth. *Apis mellifera* optimiza y reutiliza el espacio para almacenar de manera efectiva sus recursos, distribuyendo su cría preferentemente en cuadros centrales con cera nueva y limpia, junto con miel en la parte superior (B). Cuando el panal llega a cierto nivel de uso, las abejas comienzan a rellenar esas celdillas con pan de abeja (B y C). La miel la almacenan indiferentemente en cuadros nuevos o viejos, llenando cuadros enteros (A) o solo parte de algunos (B y C). Las flechas rojas de b) señalan el tipo de larvas que utilizamos para nuestro estudio (larvas de +3 días). las imágenes a), b) y c) son una vista de más de cerca de lo que contendrían los cuadros de miel, cría y pan de abeja respectivamente.

De entre las colmenas que cumplieron estos requisitos, se seleccionaron 3, una colmena control (Tratamiento Control) y dos colmenas experimentales. A la colmena control se dejó de suministrar alimento comercial, siendo la única entrada de alimento el polen y néctar recolectado por las propias abejas. Mientras, a las colmenas experimentales, se les siguió administrando alimento comercial. Una de las colmenas (Tratamiento “Azúcar”)

fue alimentada con APICOMIN complet (KESSLER IBERICA SL, Madrid, España.) un pienso compuesto en un 75% por azúcares (sacarosa), 0,7% de proteína, 0,1% de cenizas brutas y 0% de fibra. La otra colmena (Tratamiento “Plus”) fue alimentada con APIPASTA PLUS (Zukán Apícola, Murcia, España.) que además de presentar un 78,5% en azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa y maltosa), posee también 2% de proteínas, menos del 0,5% de cenizas brutas y un 3% de fibra. Ambos alimentos comerciales presentan un contenido en aceites y grasas brutas inferior al 1% (ver composición lipídica de los alimentos en las Tablas 1 y 2). Las colmenas, fueron alimentadas con las diferentes dietas, durante 1 mes (del 16 de octubre al 16 de noviembre).

Tabla 1. Contenido lipídico (% peso fresco) y composición de clases lipídicas (% lípido total) de los alimentos comerciales suministrados a las colmenas

	<i>APICOMIN complet</i>	<i>APIPASTA PLUS</i>
Lípido total (% peso fresco)	0,4	0,2
Lisofosfatidilcolina	0,4	2,3
Fosfatidilcolina	9,9	9,2
Fosfatidilserina	0,2	0,9
Fosfatidilinositol	0,6	1,0
Fosfatidilglicerol	1,4	2,0
Fosfatidiletanolamina	1,3	1,1
Lípido polar desconocido	0,9	2,1
∑ lípido polar	14,7	18,5
Monoacilglicéridos	4,4	26,7
Diacilglicéridos	2,7	2,0
Colesterol	9,0	8,1
Ácidos grasos libres	10,0	16,1
Triacilglicéridos	50,4	14,4
Ésteres de esteroles	8,3	13,4
Lípido neutro desconocido	0,6	0,8
∑ lípido neutro	85,3	81,5

Para determinar el efecto de las dietas en la composición lipídica de las larvas de abeja, de cada colmena se recolectaron muestras de larvas de más de tres días (+3), muestras de pan de abeja y muestras de polen fresco (ver imagen 2). Las muestras de larvas (n=4) y pan de abeja (n=4) fueron recolectadas con unas pinzas de punta fina, retirando el contenido de cada celdilla correspondiente, y almacenadas en Eppendorf debidamente identificados. Por otro lado, las muestras de polen fresco fueron recolectadas a través del uso de “caza pólenes”. Estos dispositivos se colocaron en la entrada de las colmenas, obligando a las abejas a pasar por unas rejillas que hacen que el polen que transportan caiga a una canasta colectora y pueda así ser cosechado. Estos dispositivos se colocaron

por periodos de 48 horas, tiempo prudencial para recolectar una muestra representativa del polen transportado, sin perjudicar a la cantidad almacenada por las abejas en la colmena. Una vez revisadas y limpiadas de posibles impurezas (restos vegetales, fragmento de abejas, alimento, propóleo, panal, etc.), las muestras de polen (n=4) fueron pesadas y almacenadas en Eppendorf, previamente etiquetados. Todas las muestras fueron ultracongeladas a -80° tras su recolección.

Los análisis de contenido y perfil lipídicos de las diferentes muestras, se llevaron a cabo en el Laboratorio del grupo de investigación NUTRAHLIPIDS (Fisiología de los Lípidos y sus Derivados en la Alimentación Animal y Humana), perteneciente al Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología, Sección de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Laguna.

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de los alimentos comerciales suministrados a las colmenas

	<i>APICOMIN complet</i>	<i>APIPASTA PLUS</i>
12:0	0,10	0,31
14:0	0,16	0,73
15:0	0,20	0,49
16:0	16,93	37,04
18:0	15,32	36,46
20:0	0,54	0,66
22:0	0,14	Nd
24:0	0,18	0,24
Σ SFA	33,69	75,93
16:1n-9	0,14	0,37
16:1n-7	0,86	10,48
16:1n-5	Nd	0,50
18:1n-9	23,88	6,58
18:1n-7	1,16	0,48
20:1n-9	0,21	Nd
Σ MUFA	26,34	18,70
18:2n-6	39,17	4,38
18:3n-3	0,79	0,54
Σ PUFA	39,96	4,92
n-3/n-6	0,02	0,12

SFA: ácidos grasos saturados, MUFA: ácidos grasos monoinsaturados, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, Σ: sumatorios incluyen otros ácidos grasos menores no presentados en la tabla. Nd – no detectado.

4.2 Extracción de lípidos

Para determinar el contenido lipídico de las muestras se usó el método de Folch et al. (1957) modificado por Christie y Han (2010). Se pesó entre 300 y 350 mg de muestra en un tubo de ensayo y se homogeneizaron en un homogeneizador (Virtishear homogenizer, Virtis Company, NY, USA) con 10 mL de cloroformo:metanol (Cl:Met; 2:1 v/v). El proceso de homogeneizado se realizó de 3 veces, usando en cada una de ellas 1/3 del volumen del Cl:Met 2:1 (v/v). Cada homogeneizado resultante se pasó a otro tubo de ensayo a través de un filtro (Filter-Lab, Barcelona, España), para eliminar los residuos sólidos. Una vez filtrado, se le añadieron 2,5 mL de cloruro potásico (KCl; 0,88% p/v) al homogeneizado y se agitó fuertemente en el vórtex de manera que el Cl:Met extrajera las sustancias liposolubles y el KCl aumentara la tensión superficial entre las fases, arrastrando para la fase acuosa parte del metanol y la materia hidrosoluble, que queremos eliminar de nuestras muestras. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 5 minutos en centrifuga (Beckman Coulter Allegra 25R, IN, USA). La fase liposoluble, más densa y por lo tanto en este caso la fase inferior, fue trasvasada a otro tubo de ensayo y evaporada bajo atmosfera de nitrógeno. El extracto seco resultante, se trasvasó a un vial de 1,7 mL de capacidad, previamente pesado e identificado, usando aproximadamente 1 mL de Cl:Met, 2:1 (v/v). El solvente se evaporó completamente bajo atmósfera de nitrógeno y los viales con el extracto lipídico, se colocaron en un desecador en oscuridad y, bajo vacío durante toda la noche, para asegurar la eliminación de cualquier resto de solvente. Al día siguiente, los viales fueron pesados nuevamente para calcular el contenido total de lípido por gravimetría:

$$\text{Contenido total de lípido (mg)} = \text{Peso vial con lípido} - \text{Peso del vial vacío}$$

Los extractos lipídicos se redisolviéron en Cl:Met 2:1 (v/v) con 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT, antioxidante que inhibe o retrasa la oxidación de los lípidos, lo que ayuda a mantener las muestras estables) una concentración de 10 mg/mL. Los viales se llenaron de nitrógeno, se etiquetaron y se guardaron en congelador a -20°C. Para calcular el porcentaje de lípidos totales (LT) de las muestras, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Lípido total (\%)} = \frac{\text{Peso lípido} \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

4.3 Determinación del perfil de clases lipídicas

La separación de las clases lipídicas (CL) se realizó mediante el método de Olsen & Henderson (1989), por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, del inglés *High Performance Thin Layer Chromatography*), en placas de sílica gel de 10 x 10 cm x 0,15 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) mediante un doble desarrollo unidireccional. Las placas fueron previamente lavadas con dietiléter y activadas en una estufa a 110°C durante 30 minutos, lo que permite eliminar posibles impurezas, manteniéndose las placas en el desecador hasta su utilización. Con la ayuda de una jeringa Hamilton de 10 µL se cargaron las placas con 30 µg de 6 muestras problema y un estándar de composición conocida (extracto lipídico de huevos de bacalao). Para la separación de los lípidos polares (LP), se preparó una solución de isopropanol, cloroformo, metil acetato, metanol y cloruro de potasio al 0,25% (5:5:5:2:1,8, v/v); y una vez desarrolladas las placas hasta la mitad, se secaron bajo campana extractora durante 3 minutos, colocándose posteriormente 10 minutos en el desecador para asegurar la eliminación total de los solventes. Para la separación de los lípidos neutros (LN), se preparó una solución de hexano, éter y ácido acético (20:5:0,5, v/v), dejando que se desarrollaran hasta los 0,5 cm del borde superior.

Una vez desarrollas las placas con ambas mezclas de solventes, se tiñeron con una solución de acetato cúprico al 3% y ácido ortofosfórico al 8% (solución densitométrica) y se colocaron en una estufa a 160°C durante unos 10-15 minutos, para así revelar las bandas correspondientes a las distintas CL. Finalmente, se escanearon en el CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza) mediante el software winCATS versión 1.4.4 y las imágenes se procesaron mediante el software VideoScan versión 1.02, para obtener la proporción de cada CL de la muestra.

4.4 Determinación del perfil de ácidos grasos

Para transformar los AG en moléculas volátiles susceptibles de ser separadas, identificadas y cuantificadas por cromatografía de gases, se realizó la transmetilación ácida de los extractos lipídicos de las muestras. Para ello, se trasvasó una alícuota de 1 mg del lípido de las muestras a un tubo de ensayo, y se añadió un 5% de estándar interno (ácido nonadecanoico, 19:0). Las muestras con el 19:0 fueron evaporadas bajo atmosfera

de nitrógeno y a continuación, se les añadió 1 mL de tolueno y 2 mL de ácido sulfúrico al 1% en metanol (v/v). Los tubos con las muestras, se agitaron con el vórtex, se llenaron con nitrógeno y se taparon herméticamente (pellizcando el tubo y la tapa con un trozo de papel de filtro para evitar que salte la tapa con los gases). Los tubos se mantuvieron durante 16-18 horas en una manta calefactora a 50°C. Con este proceso, se consigue romper los enlaces éster entre los esqueletos hidrocarbonados y los AG, produciendo ácidos grasos libres (AGL), que posteriormente se unirán a un grupo metilo (-CH₃), obteniéndose así los ésteres metílicos de AG (FAME del inglés, *Fatty Acid Methyl Esters*). Tras el periodo de transmetilación, las muestras fueron retiradas de la manta calefactora y se dejaron enfriar. Posteriormente, se añadió 2 mL de KHCO₃ al 2% (w/v) y 5 mL de hexano:dietil éter (1:1, v/v) con BHT al 0,01% a cada tubo, se agitó con el vórtex y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. La fase superior de cada tubo, se recogió y se trasvasó a un tubo de ensayo nuevo. Para asegurar una correcta recuperación de todos los FAME, se añadió al tubo inicial otros 5 mL de hexano:dietil éter (1:1, v/v), pero sin BHT, se agitó y se centrifugó la mezcla de igual modo que en el paso anterior. La “nueva” fase superior, se transfirió al mismo tubo que contenía el extracto anterior.

El solvente de las dos fases recuperadas se evaporó completamente bajo atmósfera de nitrógeno y se redisolvió en 100 µL de hexano, para llevar a cabo una cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) en placa de sílica gel de 20 x 20 cm x 25 mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). En cada placa se pincharon un máximo de 4 muestras y un estándar externo (FAME de extracto lipídico de huevas de bacalao), que nos ayudó a identificar la posición de los FAME de las muestras problema, una vez desarrollada la cromatografía. La solución para desarrollar las placas está compuesta por hexano, éter y ácido acético (90:10:1, v/v). Una vez cargadas las placas con la ayuda de una jeringa Hamilton de 100 µL, estas se introdujeron en la cubeta, y se dejó que se desarrollaran hasta la marca situada a 1 cm del límite superior de las mismas. Se extrajo la placa y se dejó secar bajo la campana extractora.

Para determinar la posición de los FAME en las placas, se pulverizó las mismas con una solución de yodina al 1% en cloroformo, usando como referencia la altura a la que estaban los FAME del estándar y la posición del BHT para localizar y recuperar los FAME de las muestras. Una vez recuperada la sílice conteniendo los FAME de cada muestra, se introdujo la misma en un tubo y se añadió 10 mL de hexano:dietil éter 1:1 (v/v) (2 mL con BHT al 0,01% y 8 mL sin BHT). Los tubos se agitaron vigorosamente en el vórtex y

posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se trasvasó el solvente (con cuidado de no arrastrar sílice) a un nuevo tubo y se evaporó su contenido bajo atmósfera de nitrógeno. Para pasar los FAME a un vial, se usó un 1 mL de n-hexano haciendo tres lavados. Los viales se almacenaron a -20°C, con atmósfera de nitrógeno, hasta su posterior determinación por cromatografía de gases.

La cromatografía de gases se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (TRACE-GC, Thermo Scientific, Milán, Italia) con inyección en columna y detector de ionización de llama FID (*Flame Ionization Detector*) que separa los AG en función de su polaridad según la metodología descrita en Galindo et al. (2022). La identificación de cada AG se realizó con ayuda de una mezcla de estándares comerciales de composición en AG y tiempos de retención conocidos (Mix C4-C24 and PUFA No. 3 from menhaden oil (Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA)).

4.5 Análisis estadístico

Previamente al análisis estadístico, se confirmó la normalidad y homocedasticidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente. En caso de no cumplirse alguno de estos supuestos, los datos fueron transformados mediante el arcoseno de la raíz cuadrada. Una vez confirmadas ambas condiciones, se realizó un ANOVA de un factor, para comprobar si existía diferencias significativas entre las medias y, en caso de existir diferencias, se aplicó el test *post-hoc* de Tukey para las comparaciones múltiples entre tratamientos.

Si tras realizar las transformaciones seguía sin cumplirse el supuesto de homocedasticidad, se aplicó el estadístico de Welch y de Brown y Forsythe, seguido del test *post-hoc* T3 de Dunnett en caso de detectarse diferencias. En caso de no haber normalidad, o no darse ninguno de los dos supuestos, se analizó la varianza mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($k > 2$). La significación estadística empleada fue $p < 0,05$. El análisis estadístico fue llevado a cabo empleando el software IBM® SPSS Statistics versión 25.0 para Windows.

5. Resultados y discusión

5.1 Contenido lipídico y composición en clases lipídicas

En todas las muestras analizadas se observó una proporción mucho más elevada de lípidos neutros (LN) que de lípidos polares (PL), llegando a superar el 90% del LT en el pan de abeja (Tabla 4), y alcanzando un mínimo del 77% del LT en las larvas (Tabla 5). Los lípidos polares (LP) oscilaron entre un 9-10% en el polen y pan de abeja, alcanzando el 18-23% del LT en las larvas (Tablas 3, 4 y 5). Las elevadas proporciones de lípidos neutros en el polen y pan de abeja, especialmente ésteres de esterol, ácidos grasos libres y triacilglicéridos evidencian la importancia de estos compuestos como fuente energética para las abejas. Por el contrario, y al igual que ocurre en otras especies animales, los porcentajes de fosfolípidos en las larvas, confirma su relevancia estructural, especialmente durante las primeras etapas de desarrollo (Rodríguez, 1994). En base a los resultados obtenidos, destacan dentro de esta función como componentes de membranas celulares de las larvas de abeja, la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE), que representaron entre el 50 y el 60% del total de los LP.

Tabla 3. Contenido lipídico (% en peso fresco) y composición de clases lipídicas (% del lípido total) del polen recolectado por las abejas de las colmenas de los diferentes tratamientos.

	Control	APICOMIN	APIPASTA PLUS <i>complet</i>
Lípido total (% en peso fresco)	5,5 ± 1,5^a	5,6 ± 0,7^a	8,2 ± 1,7^b
Lisofosfatidilcolina	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2
Esfingomielina	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,0
Fosfatidilcolina	3,8 ± 2,2	3,6 ± 1,8	3,0 ± 0,6
Fosfatidilserina	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,3
Fosfatidilinositol	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1
Fosfatidilglicerol	1,9 ± 0,5	1,5 ± 0,7	1,2 ± 0,4
Fosfatidiletanolamina	2,6 ± 0,9	3,0 ± 1,0	2,4 ± 0,6
Lípido polar desconocido	1,7 ± 0,5	2,3 ± 0,9	1,1 ± 0,4
Σ Lípido polar	11,6 ± 3,2	12,3 ± 3,8	9,3 ± 2,2
Monoacilglicéridos	7,3 ± 2,7	6,2 ± 1,1	6,6 ± 1,0
Diacilglicéridos	2,5 ± 0,8	2,2 ± 0,6	4,7 ± 2,9
Colesterol	7,4 ± 3,7	8,5 ± 2,5	10,5 ± 1,0
Ácidos grasos libres	22,8 ± 5,8	20,5 ± 3,0	26,7 ± 4,4
Triglicéridos	10,5 ± 1,8	13,8 ± 2,4	10,5 ± 2,7
Ésteres de esterol	35,3 ± 2,2	34,2 ± 7,0	30,3 ± 4,6
Lípido neutro desconocido	2,6 ± 1,3	2,2 ± 1,2	1,5 ± 1,2
Σ Lípido neutro	88,4 ± 3,2	87,7 ± 3,8	90,7 ± 2,2

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=4). No se han encontrado diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

Tabla 4. Contenido lipídico (% en peso fresco) y composición de clases lipídicas (% del lípido total) del pan de abeja colectado de las colmenas de los diferentes tratamientos.

	Control	<i>APICOMIN complet</i>	<i>APIPASTA PLUS</i>
Lípido total (% en peso fresco)	4,3 ± 1,6^a	5,3 ± 1,1^{ab}	6,7 ± 0,8^b
Lisofosfatidilcolina	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,5	0,2 ± 0,1
Esfingomielina	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2
Fosfatidilcolina	4,8 ± 1,9	2,9 ± 1,5	2,9 ± 0,6
Fosfatidilserina	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2
Fosfatidilinositol	1,0 ± 0,6	0,9 ± 0,4	0,5 ± 0,2
Fosfatidilglicerol	1,5 ± 0,7	1,6 ± 0,8	1,0 ± 0,4
Fosfatidiletanolamina	3,1 ± 0,8	2,4 ± 1,1	1,8 ± 0,2
Lípido polar desconocido	1,8 ± 0,5	2,2 ± 0,8	2,0 ± 0,6
Σ Lípido polar	13,2 ± 4,4	10,9 ± 4,5	8,9 ± 1,2
Monoacilglicéridos	7,7 ± 1,2	6,5 ± 0,8	6,1 ± 1,1
Diacilglicéridos	4,0 ± 0,8	3,8 ± 1,3	4,5 ± 1,9
Colesterol	9,0 ± 2,8	8,7 ± 2,4	9,5 ± 1,1
Ácidos grasos libres	19,6 ± 3,7	24,5 ± 3,7	24,1 ± 2,2
Triglicéridos	12,0 ± 1,6 ^{ab}	14,3 ± 1,0 ^b	11,3 ± 1,5 ^a
Ésteres de esterol	31,6 ± 4,0	30,0 ± 7,2	35,1 ± 3,3
Lípido neutro desconocido	3,0 ± 2,5	1,2 ± 0,8	0,6 ± 0,1
Σ Lípido neutro	86,8 ± 4,4	89,1 ± 4,5	91,1 ± 1,2

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=4). Letras diferentes en una misma fila representan diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

Tabla 5. Contenido lipídico (% en peso fresco) y composición de clases lipídicas (% lípido total) de larvas de *Apis mellifera* de más de tres días de desarrollo, alimentadas con diferentes dietas.

	Control	<i>APICOMIN complet</i>	<i>APIPASTA PLUS</i>
Lípido total (% en peso fresco)	3,6 ± 0,5	4,2 ± 0,1	3,7 ± 0,3
Lisofosfatidilcolina	0,5 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,5 ^b	0,3 ± 0,2 ^a
Esfingomielina	1,9 ± 0,8	2,4 ± 0,9	1,5 ± 0,4
Fosfatidilcolina	7,8 ± 4,1	6,9 ± 2,5	7,3 ± 1,7
Fosfatidilserina	0,9 ± 0,5	0,9 ± 0,4	1,1 ± 0,5
Fosfatidilinositol	3,7 ± 0,6 ^b	3,3 ± 0,3 ^{ab}	2,5 ± 0,6 ^a
Fosfatidilglicerol	1,6 ± 0,3 ^b	1,5 ± 0,2 ^b	0,9 ± 0,2 ^a
Fosfatidiletanolamina	5,4 ± 1,5	5,2 ± 0,7	4,0 ± 0,7
Lípido polar desconocido	0,9 ± 0,3	1,0 ± 1,0	0,4 ± 0,1
Σ Lípido polar	22,3 ± 7,6	22,6 ± 4,0	18,0 ± 3,3
Monoacilglicéridos	5,5 ± 0,9	4,4 ± 0,3	4,9 ± 0,3
Diacilglicéridos	2,2 ± 0,4	1,9 ± 0,2	2,8 ± 1,1
Colesterol	12,8 ± 3,8	9,3 ± 1,1	11,5 ± 3,4
Ácidos grasos libres	12,5 ± 1,7	11,1 ± 2,5	15,6 ± 3,3
Triglicéridos	20,5 ± 5,2	27,8 ± 4,8	22,7 ± 5,8
Ésteres de esterol	22,5 ± 4,5	20,3 ± 2,0	23,9 ± 5,7
Lípido neutro desconocido	2,9 ± 2,1	2,5 ± 1,5	0,9 ± 0,0
Σ Lípido neutro	77,7 ± 7,6	77,4 ± 4,0	82,0 ± 3,3

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=4). Letras diferentes en una misma fila representan diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

Las larvas de *A. mellifera*, presentaron un elevado contenido en lípido neutros (LN), dentro de los cuales destacaron los valores de triglicéridos (TAG) y los ésteres de esteroles (SE), con un porcentaje que ronda el 20-27% y el 20-24% del LT, respectivamente, en los diferentes tratamientos. Los TAG actúan como reserva energética y sirven como depósito de AGE y no esenciales. Además, pueden ser usados como precursores para la biosíntesis de fosfolípidos (Coleman y Lee, 2004), ya que las reservas de TAG, bajo ciertas circunstancias, pueden ser parcialmente hidrolizadas para formar diacil- y monoacilgliceroles (DAG y MAG, respectivamente), que actúan como precursores de los principales fosfolípidos (fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS)), especialmente en fases elevadas de formación de nuevos tejidos.

Los niveles de TAG aportados por las dietas comerciales, representan el 50% del LT en el caso de *APICOMIN complet* y el 14% en *APIPASTA PLUS* (Tabla 1). Sin embargo, tanto el polen recogido como el pan de abeja recolectado, presentan mayor contenido lipídico en las colmenas de las abejas que fueron suplementadas con *APIPASTA PLUS* ($p < 0,05$; Tablas 3 y 4). Asimismo, se aprecia un valor de TAG ligeramente superior en el polen recogido por las abejas de la colmena suplementada con *APICOMIN complet*, que se refleja igualmente en el contenido en TAG del pan de abeja formulado por la mismas. Sin embargo, dichas diferencias de aporte, no se ven reflejadas de manera evidente en el perfil lipídico de las larvas, no existiendo variaciones significativas entre tratamientos, aunque sí una ligera tendencia a una mayor acumulación de TAG en las larvas del tratamiento *APICOMIN complet*, que parece estar más relacionada con los valores encontrados en el polen y en el pan de abeja, que en el suplemento alimenticio en sí. La posible relación entre alguna deficiencia lipídica de los suplementos ensayados y las variaciones compensatorias en el polen recogido por las abejas, es un campo interesante de investigación que necesita de experimentaciones adicionales a la del presente trabajo.

Entre las CL más importantes para las abejas están los esteroides, donde se incluirían tanto los ésteres de esteroles (SE), como pigmentos carotenoides y ceras (Muniategui et al., 1991), que no pueden ser sintetizados por las abejas y, por lo tanto, deben ser obtenidos a través de la dieta. Los esteroides son imprescindibles para numerosos procesos fisiológicos como el proceso de muda para la formación de la pupa, el desarrollo ovárico o la diferenciación de las castas (Vanderplanck et al., 2020). Aunque la mayoría de los insectos utilizan colesterol como precursor en la síntesis de hormonas relacionadas con la

ecdysis, en las abejas este proceso se vuelve más complejo ya que el polen tiene principalmente fitoesteroles, siendo más bien raro el colesterol en su composición (Vanderplanck et al., 2020). La makisterona es la hormona de la muda en abejas, sintetizada a partir de estos fitoesteroles (sitosterol o campesterol concretamente) (Jing et al., 2020). El polen analizado en el presente trabajo presenta un elevado contenido en SE (30-35% del LT), valores que se reflejan igualmente en el pan de abeja. Por el contrario, los valores de colesterol (CHO) únicamente representaron entre 7-10% del LT en ambos (Tablas 3 y 4). En los alimentos comerciales, el contenido en CHO es similar al observado en el polen y pan de abeja, aunque mostraron un reducido valor de SE de entre el 8 y el 13% del LT. Esto podría indicar una importante insuficiencia nutricional de las dietas comerciales, de cara a la correcta nutrición lipídica de la colmena. Las abejas presentan capacidades fisiológicas y de adaptación de comportamiento para hacer frente a determinados desequilibrios nutricionales, buscando pólenes de múltiples familias botánicas y haciendo mezclas de estos, de cara a buscar y mantener un equilibrio nutricional óptimo (Vanderplanck et al., 2020). Además, las abejas nodrizas que están a cargo de la nutrición de las larvas, como hemos mencionado anteriormente, consumen el pan de abeja para completar el desarrollo de sus glándulas secretoras, pero no se alimentan fuera de la colonia y, por lo tanto, no pueden forrajear pólenes específicos para ajustar las deficiencias de nutrientes (Vanderplanck et al., 2020). Por lo que, a partir de sus secreciones orales podrían modificar el polen almacenado, además de que se sabe que transfieren selectivamente esteroides de sus reservas endógenas al alimento de las larvas secretado por sus glándulas hipofaríngeas y madibulares y/o el estómago de miel (buche) (Vanderplanck et al., 2020). Las abejas nodrizas poseen comportamientos de optimización centrados en la alimentación de las larvas (Vanderplanck et al., 2020), por lo que, a pesar de que los suplementos alimenticios ensayados no fueran nutricionalmente óptimos, las abejas pueden buscar la manera de solventar dicha carencia.

5.2 Perfil de ácidos grasos

Las larvas de *A. mellifera* de las diferentes colmenas presentan un perfil similar de AG, destacando en todas ellas su alto contenido de ácido oleico (18:1n-9; 42-44% del total de AG) y ácido palmítico (16:0; 38-39% del total de AG) (Tabla 6). Sin embargo, las dietas comerciales muestran un reducido contenido de 18:1n-9 en *APIPASTA PLUS* (6,5% del total de AG) y un reducido contenido de 16:0 en *APICOMIN complet* (17% en LT).

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos (% lípido total) de las larvas de *Apis mellifera* de más de tres días de desarrollo, alimentadas con diferentes dietas.

	Control	APICOMIN complet	APIPASTA PLUS
12:0	0,25 ± 0,01 ^{ab}	0,25 ± 0,06 ^a	0,36 ± 0,04 ^b
14:0	2,37 ± 0,06 ^{ab}	2,34 ± 0,10 ^a	2,53 ± 0,12 ^b
16:0	39,24 ± 1,40	39,82 ± 0,34	38,42 ± 1,48
18:0	9,73 ± 1,03	9,94 ± 0,69	9,64 ± 0,77
20:0	0,37 ± 0,05	0,35 ± 0,03	0,38 ± 0,02
22:0	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,02
24:0	0,22 ± 0,02 ^b	0,14 ± 0,11 ^{ab}	0,09 ± 0,01 ^a
Σ SFA	52,42 ± 1,83	53,15 ± 0,72	51,66 ± 1,77
16:1n-9	0,22 ± 0,04	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,02
16:1n-7	0,71 ± 0,03 ^a	0,70 ± 0,06 ^a	1,01 ± 0,12 ^b
18:1n-9	43,12 ± 1,96	41,93 ± 1,05	43,78 ± 1,53
18:1n-7	1,11 ± 0,31	1,01 ± 0,31	1,16 ± 0,06
20:1n-9	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Σ MUFA	45,45 ± 2,30	44,19 ± 1,25	46,49 ± 1,70
18:2n-6	0,86 ± 0,30	1,04 ± 0,13	0,81 ± 0,08
18:3n-3	1,11 ± 0,41	1,61 ± 1,10	0,94 ± 0,22
Σ PUFA	2,10 ± 0,72	2,65 ± 1,03	1,80 ± 0,30
n-3/n-6	1,39 ± 0,28	1,64 ± 1,33	1,16 ± 0,22

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=4). Letras diferentes en una misma fila representan diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05). SFA: ácidos grasos saturados, MUFA: ácidos grasos monoinsaturado, PUFA: ácidos grasos polinsaturados. Los sumatorios incluyen otros ácidos grasos menores no presentados en la tabla.

Estos datos parecen indicar la alta importancia de ambos AG para las larvas durante sus primeras etapas de vida, pudiendo ser bioacumulados o sintetizados *de novo*, ya que su contenido en las dietas (pan de abeja y dieta comercial) es inferior al observado en las abejas. Estos resultados concuerdan con los publicados previamente por Manning (2001), donde el 16:0 y el 18:1n-9 representaban un 40% de las grasas corporales de las larvas, un 60% en las abejas obreras adultas y en un 50% en las pupas de abejas reinas. Su relevancia podría estar relacionada con su papel como fuente energética o bien como precursores de otros ácidos grasos de mayor número de insaturaciones necesarios para el correcto desarrollo de las larvas.

Se observaron diferencias significativas en el contenido larvario de ácidos grasos como 12:0, el 14:0 y el 16:1n-7, que fueron más abundantes en las larvas de las colmenas alimentadas con APIPASTA PLUS ($p < 0,05$). Estos contenidos parecen tener relación con el contenido de este AG en los alimentos comerciales, ya que la dieta APIPASTA PLUS, presenta un aporte más elevado de todos ellos (Tabla 2). Asimismo, el ácido lignocérico (24:0) también presenta diferencias significativas entre los tratamientos en las muestras de larvas y pan de abeja. No obstante, hay que destacar su reducido porcentajes en las larvas, donde no llegan al 0,5%, a pesar de recibir un aporte importante de este AG por medio del polen y pan de abeja (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos (% lípido total) del pan de abeja colectado de las colmenas de los diferentes tratamientos

	Control	APICOMIN complet	APIPASTA PLUS
12:0	2,40 ± 0,57 ^{ab}	1,82 ± 0,41 ^a	3,23 ± 0,31 ^b
14:0	0,69 ± 0,32	0,74 ± 0,52	0,63 ± 0,17
16:0	29,68 ± 4,16 ^b	25,11 ± 1,35 ^b	21,53 ± 1,66 ^a
18:0	6,05 ± 2,36	3,28 ± 0,30	2,96 ± 0,60
20:0	1,44 ± 0,22	1,56 ± 0,16	2,17 ± 0,86
22:0	2,03 ± 0,67	1,83 ± 0,29	1,65 ± 0,39
24:0	2,17 ± 0,72 ^b	1,66 ± 0,24 ^{ab}	1,19 ± 0,35 ^a
Σ SFA	44,63 ± 5,77	36,71 ± 2,05	33,70 ± 2,48
16:1n-9	0,46 ± 0,01 ^a	0,50 ± 0,07 ^{ab}	0,66 ± 0,16 ^b
16:1n-7	1,39 ± 0,26 ^b	0,27 ± 0,03 ^a	0,22 ± 0,03 ^a
18:1n-9	16,90 ± 6,18	11,50 ± 2,49	8,99 ± 1,99
18:1n-7	1,78 ± 0,48 ^b	0,92 ± 0,22 ^a	0,63 ± 0,06 ^a
20:1n-9	0,45 ± 0,46	0,4 ± 0,05	0,30 ± 0,09
24:1n-9	0,66 ± 0,44	0,41 ± 0,07	0,42 ± 0,08
Σ MUFA	22,54 ± 5,78^b	13,99 ± 2,52^a	11,12 ± 1,99^a
18:2n-6	19,70 ± 4,21	21,37 ± 5,87	20,43 ± 3,11
18:3n-3	12,81 ± 1,79 ^a	27,51 ± 2,45 ^b	33,54 ± 1,81 ^c
Σ PUFA	32,52 ± 2,72^a	48,98 ± 4,60^b	54,22 ± 2,11^b
n-3/n-6	0,69 ± 0,26 ^a	1,41 ± 0,65 ^{ab}	1,67 ± 0,36 ^b

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=4). Letras diferentes en una misma fila representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). SFA: ácidos grasos saturados, MUFA: ácidos grasos monoinsaturado, PUFA: ácidos grasos polinsaturados. Los sumatorios incluyen ácidos grasos no presentados en la tabla.

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos (% lípido total) del polen recolectado por las abejas de las colmenas de los diferentes tratamientos.

	Control	<i>APICOMIN complet</i>	<i>APIPASTA PLUS</i>
12:0	5,08 ± 2,71	3,16 ± 2,00	6,35 ± 2,69
14:0	0,73 ± 0,43	1,58 ± 0,49	1,14 ± 0,62
16:0	20,79 ± 1,63 ^a	26,77 ± 1,16 ^b	25,66 ± 2,85 ^b
18:0	3,08 ± 2,07	4,50 ± 1,47	4,24 ± 0,42
20:0	2,56 ± 0,37	2,24 ± 0,40	3,06 ± 1,02
22:0	2,09 ± 0,25	2,32 ± 0,40	2,26 ± 0,43
24:0	1,56 ± 0,27	1,89 ± 0,39	2,10 ± 0,56
Σ SFA	37,62 ± 4,03^a	43,32 ± 1,94^{ab}	45,86 ± 4,52^b
16:1n-9	0,79 ± 0,18	0,67 ± 0,14	0,94 ± 0,33
18:1n-9	16,76 ± 6,08	16,74 ± 3,38	12,84 ± 5,73
18:1n-7	0,94 ± 0,14	1,19 ± 0,10	1,10 ± 0,24
20:1n-9	0,97 ± 0,60	0,79 ± 0,15	0,88 ± 0,33
Σ MUFA	21,37 ± 8,14	20,61 ± 3,78	17,47 ± 6,59
18:2n-6	16,81 ± 3,52	11,47 ± 3,99	13,59 ± 3,26
18:3n-3	22,35 ± 4,08	23,64 ± 7,12	22,32 ± 4,39
Σ PUFA	39,80 ± 6,44	35,73 ± 5,24	36,28 ± 6,18
n-3/n-6	1,33 ± 0,16	2,21 ± 1,10	1,65 ± 0,34

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=4). Letras diferentes en una misma fila representan diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05). SFA: ácidos grasos saturados, MUFA: ácidos grasos monoinsaturados, PUFA: ácidos grasos polinsaturados. Los sumatorios incluyen ácidos grasos no presentados en la tabla.

Se ha visto que existe una gran importancia en la nutrición diferencial que hacen las abejas nodrizas durante las primeras etapas larvales, que determina el desarrollo de los fenotipos de reina y obrera (Wu et al., 2017). Al parecer, estas obreras producen en sus glándulas mandibulares una mezcla de compuestos que están estructuralmente relacionados con los AG de 10 carbonos (no determinados en este estudio) y que se relacionan con la inhibición del crecimiento de bacterias y la germinación de los granos de polen, además de agregarlos al alimento de las crías y al polen como conservante (Plettner et al., 1998).

Por otro lado, se ha evidenciado que el polen es la principal fuente de lípidos de las abejas, importantes para la síntesis de grasas de reserva y glucógeno, además de las estructuras celulares como se ha comentado con anterioridad. Los perfiles de AG del polen de diferentes plantas son básicamente consistentes, destacando la presencia de 16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 (Wang et al., 2021). Hecho que se puede evidenciar en las Tablas 7 y 8 del presente trabajo, donde estos AG suponen una media del 85% del total de AG. Sorprendentemente, estos AG suponen un 94% y 85% del total de AG de los

alimentos comerciales APICOMIN *complet* y APIPASTA PLUS, respectivamente, aunque sus proporciones relativas en ellos son muy diferentes. Se sabe que una cantidad elevada de SFA (concretamente 16:0 > 37% del total de AG) y MUFA (18:1n- ω > 44% del total de AG) causa una especie de síndrome metabólico en las abejas, donde se incluye un aumento del peso corporal y el cambio en la homeostasis de la glucosa (Wans et al., 2021). Por otro lado, una elevada cantidad de PUFA, con 18:2n- ω > 50% total de AG, da lugar a un bloqueo en el aumento del peso corporal y de los niveles de glucosa y trehalosa en la hemolinfa. En este sentido, es importante destacar el reducido porcentaje de PUFA en las larvas analizadas (< 3% de su contenido lipídico), a pesar los altos valores encontrados en el polen y en el pan de abeja, lo que sugiere la posible beta-oxidación de estos AG para producción de energía. Los presentes resultados de composición de AG, aportan nuevamente evidencias de que las abejas modulan su forrajeo en función de sus carencias nutricionales.

Asimismo, podemos apreciar (Tabla 7) cómo hay diferencias significativas de 18:3n-3 en el pan de abeja de los distintos tratamientos. A pesar de no haber diferencias significativas de 18:2n-6 entre los tratamientos, sí que las podemos ver en el sumatorio de PUFA y en el ratio de omega-3/omega-6, existiendo diferencias claras entre el control y los dos tratamientos, lo que evidencia una vez más que las abejas modulan su ingesta, prefiriendo dietas que compensen estas deficiencias. De hecho, las colonias alimentadas con pólenes naturales deficientes en ALA o LA exhiben tasas más altas de baile de meneo hacia los pólenes que nivelen esa deficiencia (Zurchin et al., 2017). Una vez más los presentes resultados indican que los alimentos comerciales testados, no están formulado de manera adecuada para aportar los requerimientos lipídicos necesarios en épocas de escasez de polen.

En base a todo lo anterior, se podría pensar que los alimentos comerciales utilizados en nuestro trabajo no parecen satisfacer las necesidades nutricionales de las abejas y podrían estar favoreciendo la aparición de abejas “obesas”.

6. Conclusiones

1. La comparación del contenido lipídico de los alimentos comerciales con el del polen y el pan de abeja, sugiere que su proporción en los piensos comerciales influye en la tendencia de las abejas a buscar pólenes más grasos, confirmándose que son capaces de modular su forrajeo en base a las carencias nutricionales detectadas.
2. El perfil de ácidos grasos y clases lipídicas de las muestras procedentes de las colmenas, confirman que los dos alimentos comerciales testados parecen no ser nutricionalmente adecuados para sustituir el contenido lipídico del polen.
3. Para poder determinar el potencial efecto de los piensos comerciales utilizados en la evolución de las colmenas, sería necesario ampliar nuestro estudio en el tiempo y centrarnos en muestrear en épocas del año donde un aporte de estos piensos sea imprescindible para la supervivencia de la colmena.
4. Este trabajo ha aportado datos valiosos que podrían servir como punto de partida para estudiar más en profundidad la importancia de los perfiles lipídicos en la nutrición y composición corporal de *Apis mellifera*.

6. Conclusions

1. The comparison of the lipid content of commercial foods with that of pollen and bee bread suggests that the proportion of lipids in commercial feeds influences bees' tendency to seek out higher-fat pollens, confirming their ability to modulate foraging based on detected nutritional deficiencies.
2. The fatty acid profile and lipid classes of the samples obtained from the beehives confirm that the two tested commercial foods do not appear to be nutritionally suitable for replacing the lipid content of pollen.
3. In order to determine the potential impact of the commercial feeds used on the evolution of the beehives, it would be necessary to extend our study over time and focus on sampling during seasons when the provision of these feeds is essential for the survival of the beehive.
4. This study has provided valuable data that could serve as a starting point for further investigating the importance of lipid profiles in the nutrition and body composition of *Apis mellifera*.

7. Bibliografía

- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562-565. doi:10.1098/rsbl.2009.0986
- Arien, Y., Dag, A., & Shafir, S. (2018). Omega-6: 3 ratio more than absolute lipid level in diet affects associative learning in honey bees. *Frontiers in Psychology*, 9, 1001.
- Arien, Y., Dag, A., Yona, S., Tietel, Z., Lapidot Cohen, T., & Shafir, S. (2020). Effect of diet lipids and omega-6:3 ratio on honey bee brood development, adult survival and body composition. *Journal of Insect Physiology*, 124, 104074. doi:10.1016/j.jinsphys.2020.104074
- Arien, Y., Dag, A., Zarchin, S., Masci, T., & Shafir, S. (2015). Omega-3 deficiency impairs honey bee learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), 15761-15766.
- Avni, D., Hendriksma, H. P., Dag, A., Uni, Z., & Shafir, S. (2014). Nutritional aspects of honey bee-collected pollen and constraints on colony development in the eastern mediterranean. *Journal of Insect Physiology*, 69, 65-73. doi:10.1016/j.jinsphys.2014.07.001
- Christie, W. W. (1982). *Lipid analysis* Pergamon press Oxford.
- Coleman, R. A., & Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research*, 43(2), 134-176.
- Collett, M., Chittka, L., & Collett, T. S. (2013). Spatial memory in insect navigation. *Current Biology*, 23(17), R789-R800.
- Corby-Harris, V., Bennett, M. M., Deeter, M. E., Snyder, L., Meador, C., Welchert, A. C., et al. (2021). Fatty acid homeostasis in honey bees (*apis mellifera*) fed commercial diet supplements. *Apidologie*, 52(6), 1195-1209. doi:10.1007/s13592-021-00896-0
- Crailsheim, K., Schneider, L., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., et al. (1992). Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology*, 38(6), 409-419.
- Crone, M. K., & Grozinger, C. M. (2021). Pollen protein and lipid content influence resilience to insecticides in honey bees (*apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology*, 224(9), jeb242040. doi:10.1242/jeb.242040
- Dharampal, P. S., Carlson, C., Currie, C. R., & Steffan, S. A. (2019). Pollen-borne microbes shape bee fitness. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1904), 20182894.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., et al. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? *Plos One*, 8(8), e72016. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>

- Galindo, A., Reis, D. B., Rodríguez, I., Pérez, J. A., Abdul-Jalbar, B., Zárate, R., et al. (2022). Lipid characterization of 14 macroalgal species from madeira archipelago: Implications for animal and human nutrition. *Botanica Marina*, 65(1), 51-67.
- Jing, X., & Behmer, S. T. (2020). Insect sterol nutrition: Physiological mechanisms, ecology, and applications. *Annual Review of Entomology*, 65(1), 251-271. doi:10.1146/annurev-ento-011019-025017.
- Li, S., Yu, X., & Feng, Q. (2019). Fat body biology in the last decade. *Annual Review of Entomology*, 64, 315-333.
- Manning, R. (2001). Fatty acids in pollen: A review of their importance for honey bees. *Bee World*, 82(2), 60-75.
- Muniategui, S., Sancho, M. T., Lopez, J., Huidobro, J. F., & Simal, J. (1991). Separación de las clases de lípidos neutros de polen apícola mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). *Grasas Y Aceites*, 42, 277-280.
- Parreño, M. A., Alaux, C., Brunet, J. -, Buydens, L., Filipiak, M., Henry, M., et al. (2022). Critical links between biodiversity and health in wild bee conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 37(4), 309-321. doi:10.1016/j.tree.2021.11.013
- Plettner, E., Slessor, K. N., & Winston, M. L. (1998). Biosynthesis of mandibular acids in honey bees (*Apis mellifera*): De novo synthesis, route of fatty acid hydroxylation and caste selective β -oxidation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(1), 31-42.
- Ricigliano, V. A., Ihle, K. E., & Williams, S. T. (2021). Nutrigenetic comparison of two varroa-resistant honey bee stocks fed pollen and spirulina microalgae. *Apidologie*, 52(4), 873-886. doi:10.1007/s13592-021-00877-3
- Rodríguez, C. (1994). Estudio de los requerimientos de ácidos grasos esenciales de la dorada europea (*sparus aurata*, L.) durante las primeras semanas de alimentación. *PhD Thesis. Universidad De La Laguna*,
- Simopoulos, A. P. (2009). Omega-6/omega-3 essential fatty acids: Biological effects. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 99(1), 1-16.
- Vanderplanck, M., Zerck, P., Lognay, G., & Michez, D. (2020). Sterol addition during pollen collection by bees: Another possible strategy to balance nutrient deficiencies? *Apidologie*, 51(5), 826-843. doi:10.1007/s13592-020-00764-3.
- vanEngelsdorp, D., Hayes Jr, J., Underwood, R. M., & Pettis, J. S. (2010). A survey of honey bee colony losses in the united states, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 7-14.

- Vaudo, A. D., Tooker, J. F., Grozinger, C. M., & Patch, H. M. (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science*, *10*, 133-141. doi:10.1016/j.cois.2015.05.008.
- Wang, X., Zhong, Z., Chen, X., Hong, Z., Lin, W., Mu, X., et al. (2021). High-fat diets with differential fatty acids induce obesity and perturb gut microbiota in honey bee. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2) doi:10.3390/ijms22020834.
- Wu, Y., Zheng, H., Corona, M., Pirk, C., Meng, F., Zheng, Y., et al. (2017). Comparative transcriptome analysis on the synthesis pathway of honey bee (*Apis mellifera*) mandibular gland secretions. *Scientific Reports*, *7*(1), 4530.
- Zarchin, S., Dag, A., Salomon, M., Hendriksma, H. P., & Shafir, S. (2017). Honey bees dance faster for pollen that complements colony essential fatty acid deficiency. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *71*(12), 172. doi:10.1007/s00265-017-2394-1