



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

TESIS:

**EFFECTO DE LA ALIMENTACIÓN ARTIFICIAL CON UN
SUPLEMENTO PROTEICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
VITELÓGENINA EN *Apis mellifera* L.**

PARA OPTAR AL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

ING. LENNY FABIOLA ALVARADO MOO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ

COASESOR:

MC. AURORA XOLALPA AROCHE

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

19 DE DICIEMBRE DE 2018

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Mérida

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.

No. DE OFICIO: X-488/18

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN.

Mérida, Yucatán, 03/diciembre/2018

C. ALVARADO MOO LENNY FABIOLA.
Pasante de Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología.
PRESENTE

De acuerdo al fallo emitido por su asesor la **Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez co-asesorada por la M.C. Aurora Xolalpa Aroche** y la comisión revisora integrada por el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra, el Dr. Denis Israel Magaña Ortiz y el M.C. Gilberto José Ortega Santana Considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la Tesis.

“EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN ARTIFICIAL CON UN SUPLEMENTO PROTEICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE VITELÓGENINA EN *Apis Mellifera L*”

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES

M.C. DANIEL ARCÁNGEL LÓPEZ SAURI
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN.



S. E. P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MERIDA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

C.p. Archivo
DALs/fja,



SEP Instituto Tecnológico de Mérida. Km. 5 Carretera Mérida-Progreso A.P. 911
C.P. 97118 Mérida Yucatán, México. Tels. 964-50-00, Ext. 10001, 10401
10601, 10201 e-mail:itm@itmerida.mx <http://www.itmerida.mx>

RECONOCIMIENTO
A LA CALIDAD SEP
2012
100 POR CIENTO EN
SUS PROGRAMAS DE
BUENA CALIDAD



DEDICATORIA

A Dios

Por tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultados de tu ayuda, y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores. Gracias por haberme permitido cumplir un sueño más de la vida, ya que sin ti no lo lograría

A mis Padres

Miguel Arcángel Alvarado Cauich y María Teófila Moo Moo quienes me dieron la vida y la educación, le dedico a este trabajo ya que ellos me enseñaron los valores y principios, además de brindarme su apoyo incondicional al principio y fin de esta travesía en mi formación académica. Me han enseñado a no rendirme y luchar por los sueños, “Los amo”.

A mis hermanas

María Alejandra, Celia Magaly, Adriana Isabel y Aurora Gissel. Por acompañarme siempre, brindarme su ayuda, amor y cariño para poder cumplir mi sueño.

A mis abuelas

Alicia Cauich y Alejandra Moo (+), gracias por sus sabios consejos y su apoyo incondicional.

A mis tíos

Son mis segundos padres, gracias por su apoyo incondicional para lograr esta etapa de mi vida.

Con todo mi cariño y amor para cada una de las personas que nunca me dejaron caer, para que pudiera cumplir mi sueño, gracias por motivarme y darme la mano cuando sentía que ya no podía más.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Quintanarroense de Ciencia y Tecnología (COQCYT), al Programa de Fortalecimiento Académico para Indígenas Incorporación de Mujeres Indígenas al Posgrado Nacional para el Fortalecimiento Regional CONACYT – Gobierno del Estado de Quintana Roo, por permitirme ser parte del programa.

Al Instituto Tecnológico de Mérida (ITM), División de Estudios de Posgrados e Investigación, por haberme permitido formar parte la Maestría en Ciencia de los Alimentos y Biotecnología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca económica otorgada a lo largo de dos años de la maestría.

A la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, por su comprensión, paciencia y asesoramiento para poder realizar mi proyecto de investigación, y por permitirme formar parte del Laboratorio de Microbiología Aplicada y Molecular.

A la MC. Aurora Xolalpa Aroche, por su comprensión, paciencia y asesoramiento para poder realizar el proyecto de investigación.

Al MC. Jesús Manuel Ramón Sierra, por su paciencia para enseñarme cada una de las técnicas de laboratorio, por su comprensión, apoyo y asesoramiento para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Denis Magaña Ortiz, por su apoyo y revisión del desarrollo del proyecto de investigación.

Al Dr. Tomas Madera, por su apoyo en el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el proyecto de investigación.

Al Dr. José Javier Quezada Euan de la Universidad Autónoma de Yucatán por recibirme y enseñarme la técnica de la extracción de la hemolinfa de la abeja.

Al Dr. Víctor Manuel Toledo Lopez, por su apoyo para realizar los análisis bromatológicos de los suplementos proteicos en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de Origen Animal.

Al Dr. Valentino Mukthar Sandoval Peraza, por su apoyo en la parte de determinación de aminoácidos por HPLC y el análisis de los resultados.

A la empresa de Xnox Innovación SA de CV, por otorgarme las facilidades para realizar el proyecto de investigación, en el uso de infraestructura, insumos y semovientes.

Al MC. Edward Brito Estrella, por apoyo en la recolecta de materia prima para elaborar el suplemento proteico a base de harina de chaya.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Aplicada y Molecular: Ezequiel, Aron, Isela, Pamela, Gabriel, Roberto, Elva, Enrique, Jesús, Jair y Dr. Alejandro, por su apoyo durante mi estancia, ya que sin ellos habría sido difícil. Gracias por su paciencia y compartir su aprendizaje.

A mis dos únicos compañeros Ezequiel y Socorro, con quienes aprendí y me apoyaron para seguir en el camino, gracias por su paciencia y dedicación.

A mis amig@s y compañeros de otros laboratorios: Paola, Joel, Abraham, Anahí, Denisse, gracias por sus apoyo y consejos.

Al equipo UNAM-UIMQROO: Damián, Carlos, Francisco, Karla, Coral, Rodrigo, Omar, Rubén, Lenny, Alejandra, Carol, Fernanda, gracias por su apoyo incondicional, ya que son su apoyo no podría ser fácil desarrollar este proyecto en campo.

Contenido

Índice de tablas.....	10
Índice de figura	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
I. INTRODUCCIÓN	14
II. MARCO TEÓRICO.....	15
1. Evolución de las abejas.....	15
2. Habitantes de la colmena	15
1. Ciclo biológico de las abejas	15
3. Características fisiológicas y morfológicas de las castas	16
3. Fisiología de las abejas.....	18
1. Aparato digestivo	18
2. Aparato respiratorio	19
3. Sistema circulatorio.....	20
3. Nutrición de <i>Apis mellifera</i> L.....	21
1. Importancia de la nutrición de la colmena	21
2. La digestión de las abejas.....	22
3. Importancia de las proteínas en la vida de la colonia	24
4. Requisitos proteicos de las abejas	25
5. Requerimientos proteicos de acuerdo al desarrollo de las abejas.....	27
6. Las proteínas en las abejas	28
7. Criterios fisiológicos para la evaluación de la nutrición proteica	30
5. Vitelogenina	34
6. Alimentación artificial con suplementos proteicos.....	37

7. Fuente de proteína alternativa.....	41
1. Descripción general de <i>Cnidocolus chayamansa</i> Mc Vaugh	41
2. Taxonomía.....	41
3. Descripción de la planta.....	41
4. Distribución	42
5. Usos	42
III. JUSTIFICACIÓN	43
IV. HIPÓTESIS	44
V. OBJETIVOS	45
1. Objetivo general	45
2. Objetivos específicos	45
VI. METODOLOGIA.....	46
Primera fase:	46
1. Obtención de la materia prima	46
1. Hojas de <i>Cnidocolus chayamansa</i> Mc Vaugh	46
2. Jarabe de fructosa	46
3. Levadura de cerveza	46
4. Multivitamínico	47
5. Suplemento comercial Ultra Bee®	47
6. Suplemento comercial Nutra®	48
7. Selección de colonias	48
Segunda fase.....	48
1. Análisis proximales	48
2. Determinación de la calidad proteica	49
Tercera fase.....	52

1. Diseño experimental	52
2. Aplicación de los suplementos proteicos.....	53
3. Marcaje y recolecta de abejas nodrizas	53
4. La extracción de la hemolinfa.....	54
5. Variables de respuesta	54
6. Análisis estadístico	55
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
1. Materia prima	56
2. Análisis proximal del suplemento proteico a base de harina de chaya	56
3. Cuantificación de proteína soluble del suplemento a base de chaya	58
4. Perfil electroforético de los suplementos proteicos	58
5. Perfil de aminoácidos	60
1. Curva de calibración de los aminoácidos	60
2. Perfil de aminoácidos de los suplementos proteicos	63
6. Evaluación del consumo de suplementos proteicos en la colmena.	72
7. Evaluación del desarrollo del área de cría.....	73
1. Desarrollo de área de cría cerrada.....	73
2. Evaluación desarrollo de área de cría abierta	74
8. Evaluación del contenido proteico de la hemolinfa	75
9. Evaluación del efecto de los suplementos proteicos sobre la vitelogenina mediante la detección por SDS -PAGE.....	77
VIII. CONCLUSIONES.....	81
IX. BIBLIOGRAFÍA	82
X. ANEXOS	90
Anexo 1: Actividades realizadas para obtener la harina de <i>Cnidoscopus chayamansa</i>	90

Anexo 2: Determinación de humedad	90
Anexo 3: Determinación de ceniza	91
Anexo 4: Determinación de grasa	92
Anexo 5: Determinación de fibra cruda por el método gravimétrico	93
Anexo 6: Determinación de proteína cruda	94
Anexo 7. Grafica de consumo de suplemento proteico durante seis semanas ..	95
Anexo 8. Fotografía del consumo de los suplementos proteicos empleados	95
Anexo 9. Gráfica del área de cría cerrada	96
Anexo 10. Gráfica de área de cría abierta	96
Anexo 11. Analisis de Varianza del desarrollo de área de cría abierta.....	97
Anexo 12. Analisis de Varianza de desarrollo del área de cría cerrada.	97
Anexo 13. Extracción de hemolinfa de las abejas.....	98
Anexo 14. Gráfica de la cuantificación de la hemolinfa para cada uno de los tratamientos en los tres tiempos.	98
Anexo 15. Perfil proteico de la hemolinfa de las colmenas antes de iniciar el experimento: suplemento energético (A), Chaya (B), Ultra Bee® (C) y Nutra® (D).	99
Anexo 16. Perfil proteico de la hemolinfa de las colmenas a los 29 días de iniciar el experimento: suplemento energético (A), Chaya (B), Ultra Bee® (C) y Nutra® (D).	99
Anexo 17. Perfil proteico de la hemolinfa de las colmenas a los 48 días de iniciar el experimento: suplemento energético (A), Chaya (B), Ultra Bee® (C) y Nutra® (D).	100
Anexo 18. Curva de calibración de los aminoácidos	100
XI. Glosario	104

Índice de tablas

Tabla 1. Diferentes suplementos proteicos para una alimentación artificial.	38
Tabla 2. Composición de los puntos de la curva de calibración para determinar el perfil de aminoácidos.	51
Tabla 3. Gradiente de elución para determinar aminoácidos por RP-HPLC.	52
Tabla 4. Nomenclatura de los tratamientos distribuidos en el apiario.	53
Tabla 5. Resultado de análisis proximal de suplemento proteico a base de harina de chaya (<i>Cnidoscolus chayamansa</i>).	56
Tabla 6. Resultado de los análisis proximales de los suplementos evaluados en la alimentación de abejas <i>Apis mellifera</i> L.	57
Tabla 7. Resultado de los análisis de cuantificación proteica de suplementos evaluados en la alimentación de abejas <i>Apis mellifera</i> L.	58
Tabla 8. Tiempos de retención de los estándares de aminoácidos y sus coeficientes de variación.	62
Tabla 9. Contenido de aminoácidos por 100 g de proteína de los elementos para la formulación del suplemento proteico a base de harina de chaya, comparado con los requerimientos para el buen desarrollo de la colmena reportado por De Groot (1953).	64
Tabla 10. Contenido de aminoácidos por 100 g de proteína en el suplemento proteico comercial Ultra Bee®, comparado con requerimientos para un desarrollo de la colmena por De Groot (1953).	67
Tabla 11. Contenido de aminoácidos por 100 g de proteína en el suplemento comercial Nutra®, comparado con requerimientos para un desarrollo de la colmena por De Groot (1953).	70
Tabla 12. Consumo semanal de suplementos proteicos (g).	73
Tabla 13. Área de cría cerrada (cm ²) en desarrollo de área de cría de abejas <i>Apis mellifera</i> alimentadas con suplementos proteicos en condiciones de campo.	74
Tabla 14. Área de cría abierta (cm ²) en desarrollo abejas <i>Apis mellifera</i> alimentadas con suplementos proteicos en condiciones de campo.	75
Tabla 15. Contenido proteico (µg/mL) en la hemolinfa de las abejas nodrizas <i>Apis mellifera</i> alimentadas con suplementos proteicos en condiciones de campo.	76

Índice de figura

Figura 1. Modelo de la interacción de la Vg y JH en la relación de la nutrición (Corona et al. 2007).	36
Figura 2. Perfil proteico de los diferentes suplementos: 1 marcador molecular, 2 suplemento a base de Chaya, 3 Nutra® y 4 Ultra Bee ® determinado por el método SDS-PAGE.	59
Figura 3. Patrón de elución de los derivados N-[2,2-bis(etoxicarbonil)vinil] de los aminoácidos presentes en la mezcla estándar (2000 pmol de cada aa).	60
Figura 4. Patrón de elución de triptófano (120 pmol de aa).	60
Figura 5. Cromatogramas correspondientes análisis por RP-HPLC del suplemento proteico a base de harina de Chaya: a) hidrolisis o ácido; b) hidrolisis básico (para la detección del triptófano).	66
Figura 6. Cromatogramas correspondientes análisis por RP-HPLC del suplemento proteico comercial Ultra Bee®: a) hidrólisis ácida; b) hidrólisis básica (para la detección del triptófano).	69
Figura 7. Cromatogramas correspondientes análisis por RP-HPLC del suplemento proteico comercial Nutra®: a) hidrólisis ácida; b) hidrólisis básica (para la detección del triptófano).	71
Figura 8. Perfil proteico de la hemolinfa antes de iniciar el experimento en las diferentes colmenas: 0 marcador molecular, A el control, B suplemento a base de Chaya, C Ultra Bee® y D Nutra® determinado por el método SDS-PAGE.	77
Figura 9. Perfil proteico de la hemolinfa de 29 días después de iniciar la aplicación de los suplementos: 0 marcador molecular, A el control, B suplemento a base de Chaya, C Ultra Bee® y D Nutra® determinado por el método SDS-PAGE.	79
Figura 10. Perfil proteico de la hemolinfa a los 49 días de la aplicación de los suplementos: 0 marcador molecular, A el control, B suplemento a base de Chaya, C Ultra Bee® y D Nutra® determinado por el método SDS-PAGE.....	80

RESUMEN

Las proteínas constituyen es uno de los elementos más importantes en la dieta de las abejas. Un adecuado aporte proteico resulta indispensable para el buen desarrollo fisiológico de las abejas y por ende, para la productividad de la colmena. El polen representa la principal fuente de proteína para las abejas en condiciones naturales. Sin embargo, la disponibilidad del polen se ha visto reducida en múltiples regiones del mundo debido a factores tales como el cambio climático y la deforestación. Bajo estas circunstancias se hace necesario el suministro de suplementos proteicos con el objeto de garantizar la salud de la colmena. El desarrollo de suplementos alimenticios para uso apícola, con un adecuado perfil nutricional y costo reducido es una necesidad apremiante para este sector de la economía. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un suplemento proteico a base de Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) sobre el desarrollo de la colmena y la presencia de vitelogenina en la hemolinfa de abejas *Apis mellifera* L. Entre los resultados obtenidos se encontró que el suplemento alimenticio basado en Chaya presentó un contenido de proteína total de 10.24 ± 0.35 g/100g de base seca y un contenido de proteína soluble de 5.07 ± 0.02 g/100g de base seca. Se realizó la determinación del contenido de aminoácidos presentes en el alimento, encontrándose que está dentro de los límites requeridos para la alimentación apícola; siendo comparables al ofrecido por productos presentes en el mercado. Los perfiles electroforéticos del suplemento a base de harina de chaya demostraron que es un alimento de buena calidad proteica. Por otro lado, también se evaluó la presencia de vitelogenina en la hemolinfa de las abejas alimentadas con el suplemento a base de harina de chaya, cuyos resultados indicaron una similitud con el control y los suplementos comerciales evaluados. El suplemento a base de harina de chaya puede ser considerado como una alternativa en la alimentación artificial, siendo económica, importante y viable para el sector apícola de la región de la península de Yucatán.

ABSTRACT

Proteins are one of the most important elements on a bee's diet. An adequate protein amount is essential for the physiological development of the bees, and therefore, the beehive productivity in general.

Pollen represents the main source of protein for bees in natural conditions. However, the availability of pollen has been reduced in several regions of the world due to climate change and deforestation. Under these circumstances it's necessary to provide protein supplements for apiarian use, with an adequate nutritional profile and reduced cost as a necessity for this sector of the economy. Therefore, the object of this work was to evaluate the effect of a protein supplement from Chaya plant (*Cnidoscolus chayamansa*) on the development of a beehive, and the presence of vitellogenin in *Apis mellifera* L. bees' hemolymph. Among the results it was found that the Chaya based supplement had a total protein content of 10.24 ± 0.35 g/100g of dry base and soluble protein of 5.07 ± 0.02 g/100g of dry base. Amino acids presence was determined, results were comparable to products already present in the market. The electrophoretic profiles of the Chaya based supplement demonstrated that it is a high protein quality food. On the other hand, studies of the vitellogenin in the bees' hemolymph indicated similar presence between the control, bees fed with Chaya plant supplement and other commercial supplements.

The Chaya based supplement can be considered as an artificial feed alternative, with it being economical, important and viable to the apiarian sector of the Yucatán peninsula region.

I. INTRODUCCIÓN

En México la apicultura es una actividad de gran trascendencia social y económica pues representa una importante fuente de ingresos para las familias y la oportunidad de conservar ecosistemas y biodiversidad de plantas endémicas en las diversas regiones productoras; gracia al invaluable trabajo que llevan a cabo las abejas llamada polinización. México ha sido reconocido en el mercado internacional por la exportación de miel de excelente calidad. Para mantenerse dentro en este estatus es necesario cumplir con ciertos manejos en la producción, entre lo más importante se encuentra el manejo de plagas y la alimentación artificial (proteica y energética).

La nutrición juega un papel importante para la prevención de ciertas enfermedades trascendentales en el sector apícola, los cuales podrían perturbar la producción de miel. El presente estudio propone una alternativa de alimentación artificial con un suplemento proteico a base de *Cnidocolus chayamansa* (chaya) una especie botánica que se encuentra en la península de Yucatán, por su alto contenido proteico.

Por otro lado, se busca que el suplemento proteico cumpla con estándares de inocuidad para evitar los riesgos de contaminación de los productos derivados de la colmena, principalmente la miel; además de minimizar los costos de producción a los que se enfrentan los productores para mantener sus colmenas. Este suplemento proteico a base de chaya contiene la cantidad de proteína y de aminoácidos esenciales requeridos para un desarrollo de la colonia, y de esta manera, permite el desarrollo morfológico y fisiológico de las abejas.

El órgano más importante en las abejas obreras son las glándulas hipofaríngeas, ya que estas son las encargadas de la producción de jalea real, que es el alimento para la reina y las larvas menores de tres días. Es importante que las glándulas hipofaríngeas se desarrollen de la mejor manera, pues es la fuente de inicio de la nutrición de las abejas de la colmena y también se encuentra relacionada con la producción de proteínas que permiten el funcionamiento fisiológico de la colmena, una de las proteínas es la vitelogenina.

II. MARCO TEÓRICO

1. Evolución de las abejas

Las abejas evolucionaron a partir de las avispas, al desarrollar estructuras morfológicas que le permitieron obtener las proteínas de las flores. De ese modo pudieron cambiar su comportamiento de insectos parásitos característicos de sus ancestros e iniciar la coevolución con las angiospermas (plantas con flor) en uno de los fenómenos más trascendentes de la historia evolutiva de los últimos 100.000.000 de años, que dotó a las abejas de una extraordinaria adaptación y explica el éxito de estos insectos. Para el caso de *Apis mellifera* la dinámica de las proteínas son las que juega un rol determinante en la vida de la colonia (Vidal y Bedascarrasbure, 2009).

La *Apis mellifera* L. es un insecto social perteneciente a la familia Apidae. La abeja doméstica, o abeja melífera, es la única especie que forma colonias capaces de resistir el invierno, al contrario de las demás abejas, cuyos miembros mueren en otoño, con la sola excepción de algunas hembras fecundadas, que hibernan para reconstruir la colonia en la siguiente primavera (Rubilar, 2001; Olivos, 2010).

La colonia de abejas está compuesta principalmente por miles de abejas obreras, todas procedente de una sola reina, la cual es la única hembra fértil de la colonia y su función principal es la puesta de huevos (Butler, 1975; Olivos, 2010).

2. Habitantes de la colmena

1. Ciclo biológico de las abejas

La reina deposita huevos en las celdas, a los tres días eclosionan pequeñas larvas ápodas, estas son alimentadas por abejas nodrizas durante las siguientes 48 horas con un alimento proteico llamado jalea real, que ellas mismas producen. Después la dieta cambia a una mezcla de polen y miel a partir del día tres al siete, para el caso de las abejas obreras, para luego entrar en una etapa de reposo dentro de su celdilla cubierta con cera, en la cual la larva se transforma en ninfa, pasa al estado juvenil y emerge rompiendo el opérculo (Crea, 1993; Olivos, 2010). El desarrollo de

una abeja obrera es de 21 días, zánganos 24 días y en reina de 15 a 17 días (Crea, 1993; Olivos, 2010).

3. Características fisiológicas y morfológicas de las castas

Dentro de la colmena se presenta un orden jerárquico entre las tres principales castas: la reina, zánganos y obreras.

- La reina

La reina, a diferencia de las obreras, recibe una alimentación especial de jalea real, desde sus primeros días de larva y a lo largo de toda su vida, logrando así su desarrollo completo, lo cual le permite ser fecundada y contribuir a la conservación de la especie. Su metamorfosis es de 16 días, a partir de la postura del huevo fecundado que le dio origen. (BID, 2010).

La reina carece de las herramientas de trabajo que poseen las obreras, como cestas para el polen, glándulas que producen cera, y el buche bien desarrollado para la miel (Gould y Gould, 1998; BID, 2010).

Tiene un cuerpo más alargado que las obreras, alas más cortas y el abdomen en estado de virginidad, es más puntiagudo. Tiene un aguijón curvado y liso, que puede usar una y otra vez sin poner en peligro su vida (Gould y Gould, 1998; BID, 2010). La reina, una vez fecundada y desarrollado sus ovarios, su abdomen llega a ser casi el doble de una obrera y no alcanza a ser cubierto por sus alas. Deposita los huevos en cada una de las celdas hexagonales del panal (Crea, 1993; Olivos, 2010).

Dentro de la colonia, la reina es la única capaz de llevar a cabo la postura de huevos fecundados (obreras) y sin fecundar (zánganos). Las celdas destinadas para las reinas tienen posición vertical, con un diámetro de 0.8 cm y largo que oscila entre 1.5 y 2.5 cm aproximadamente (Massaccesi, 2002). Se apareja con una cantidad de machos (6 o más), en vuelos de apareamiento que realiza a los pocos días después de emerger (BID, 2010). Alcanza la madurez sexual entre el quinto y décimo día después de su nacimiento, realiza sus primeros vuelos de orientación, para llevar a cabo el vuelo nupcial y la fecundación (Massaccesi, 2002). Los espermatozoides

son almacenados en la espermateca, y son usados durante toda su vida para originar toda la descendencia. Su capacidad para poner huevos es alta: la producción diaria puede superar los 1,500 huevos (BID, 2010).

- **Los zánganos**

El zángano es el macho de la colonia, cuya única función biológica es la fecundación de la reina, ya que no está dotado para realizar otras funciones. Su ciclo biológico es de 24 días, a partir de un huevo no fecundado (IICA, 2009).

Los zánganos pueden tener tres orígenes según su progenitora: ya sea una reina fecundada, reina virgen o una obrera ponedora; la calidad reproductiva cambia según sea el origen, siendo la de menor calidad la de obrera ponedora (Nates, 1987; BID, 2010).

La colonia en los meses de floración existe un mayor número de zánganos, conforme se acerca el otoño o temporada de lluvias en climas tropicales, estos son expulsados de las colonias por las obreras, y los dejan morir en el exterior de la colmena (Gould y Gould, 1988; BID, 2010). Los zánganos carecen de aguijón y no tienen defensa alguna; no tienen cestilla para la recolectar polen ni glándulas productoras de cera, y no producen jalea real. Su única pero primordial función es aparearse con otras reinas vírgenes, consumado el apareamiento, que siempre tiene lugar durante el vuelo a cielo abierto, el zángano muere de forma inmediata.

- **Las obreras**

Las obreras son más pequeñas que las reinas y los zánganos (Garau, 1990; BID, 2010). Son hembras infértiles y viven aproximadamente tres meses (Massaccesi, 2002). Su desarrollo es a partir de un huevo fecundado hasta 21 días (Crea, 1993; Olivos, 2010). Son las encargadas de la elaboración de la miel, cuidar y atender la alimentación de las larvas (Rubilar, 2001; Olivos, 2010).

Las abejas obreras son las que constituyen casi toda la colonia y cumplen diversas funciones en la colmena, pudiéndose encontrar más de ochenta mil abejas en plena temporada. Es el elemento productor y directivo de la colmena (Epinosa, 2004;

Jiménez, 2013). Durante su vida adulta las abejas se dedican a una serie de tareas que va ocurriendo en función de su edad y asociado al desarrollo glandular (Massaccesi, 2002).

Durante los primeros cuatro días de vida, las obreras limpian las celdas y la colmena. De quinto a 11 días, es una abeja nodriza y produce jalea real para las larvas de las celdas reales. De 11 a 13 días, se convierte en almacenadora: su papel consiste en almacenar polen y néctar en las celdas, y ventilación en la colmena, agitando muy rápidamente sus alas, para mantener así una temperatura y humedad constante. De 14 a 17 días las glándulas productoras de cera de su abdomen ya están desarrolladas, se vuelven constructoras del panal. De 18 a 21 días son centinelas y están en guardia a la entrada de las colmenas para impedir la entrada de intrusos como las avispas, mariposas e incluso a los zánganos. A partir de 22 días hasta su muerte irán de flor en flor a cosechar néctar, polen y propóleo (IICA, 2009).

Las futuras obreras reciben jalea real sólo los primeros dos días, lo que explica el marcado contraste anatómico y funcional entre éstas y la reina, así entonces, la metamorfosis de la obrera es de 20 a 21 días.

3. Fisiología de las abejas

1. Aparato digestivo

El sistema digestivo de los insectos está formado de tubo digestivo y órganos relacionados tales como: las glándulas salivales, ciegos gástricos y tubos de Malpighi. Este sistema inicia desde la probóscide hasta el recto, con regiones muy diferenciadas. Cuando las obreras liban el néctar, usan las estructuras de la lengua haciendo un canal por el cual succiona el néctar, pasando por el esófago que atraviesa desde la cabeza hasta la parte anterior del abdomen, donde desemboca en el buche melario; le sigue el proventrículo. El ventrículo o estómago verdadero, continúa el intestino delgado, en el que se insertan numerosos tubos pequeños llamados tubos de Malpighi. Al final, encontramos el colon o papila rectal (Dustmann, 1993; BID, 2010).

Entre los órganos anexos al aparato digestivo, se encuentran las glándulas hipofaríngeas y mandibulares, localizadas en la cabeza, estas son muy importantes para la producción de jalea real y feromonas, útil para la comunicación de la colonia (Duttmann *et al.*, 2013).

Las glándulas hipofaríngeas se encuentran presentes únicamente en las abejas obreras, es un par de estructuras localizadas en la parte media de la cabeza a cada lado de la faringe, sus vueltas recubren totalmente la cara anterior del cerebro, cuando se extienden llegan a sobrepasar un cm de longitud, su tamaño y actividad varía conforme a la edad y función de las abejas obreras. Cada glándula consiste en un racimo de pequeños círculos sujetos por delicados canales a un ducto excretor, los ductos de estas glándulas desembocan separadamente en la parte distal de la placa hipofaríngea, donde se produce la jalea real (Argüello, 2010).

Las glándulas mandibulares están presentes en todas las castas con la diferencia de tamaño y función. En la reina son grandes por secretar la sustancia real, la cual es distribuida por trofolaxis y responsable de la unión de la colonia. En las obreras son pequeñas y en zánganos aún son más pequeñas. Son un par de estructuras huecas que se encuentran en cada lado de la cabeza y el orificio excretor se abre en la parte interna de la mandíbula y la cabeza. La secreción de las glándulas ayuda a remover y a componer la cera, el propóleos y a disolver el revestimiento grasoso del polen. También secreta la fracción lipídica presente en la jalea real (Argüello, 2010).

Los tubos de Malpighi son aproximadamente 100 túbulos largos, sinuosos, que se enrollan unos a otros sobre las vísceras y desembocan independientemente en la unión entre el ventrículo y el intestino delgado. Son órganos excretores (Argüello, 2010).

2. Aparato respiratorio

Consiste en una red de tubos y sacos aéreos, encargados de absorber oxígeno y desechar bióxido de carbono. Las tráqueas son los tubos primarios que luego se ramifican, se insertan desde el tórax y abdomen, dan al exterior por unos orificios

llamados espiráculos. Los cuales son fuente de ingreso de ácaros microscópicos al tubo respiratorio, perjudiciales para las abejas. Estas no presentan pulmones, si no que las tráqueas y sus ramificaciones llevan el aire directamente a los tejidos y células que lo requieren.

3. Sistema circulatorio

El sistema circulatorio provee una forma de intercambio químico entre los órganos. En los insectos está compuesto de: líquidos y células sanguíneas (hemolinfa), un vaso dorsal que hace posible la circulación y estructuras accesorias de pulsación que ayudan en la circulación. En los insectos el vaso dorsal consiste de una parte posterior llamada corazón y una anterior llamada aorta.

1. Sangre de los insectos

La sangre de los insectos comprende desde un 5-40% de su cuerpo. Carece de glóbulos rojos, por lo tanto, no existe hemoglobina y eso imposibilita el transporte de oxígeno y dióxido de carbono. Las células de la hemolinfa se llaman hemocitos estos asumen funciones de defensa como la fagocitosis, el encapsulado, la nodulación y la coagulación, e intervienen en el metabolismo, síntesis y almacenamiento de nutrientes. La hemolinfa es el medio de transporte de los nutrientes absorbidos en el mesenterón, al lugar donde se necesitan, recogiendo además los desechos producto del metabolismo, mismos que deposita en los tubos de Malpighi. Otra función de la hemolinfa es transportar hormonas, desde el lugar donde se forman hasta donde se lleva a cabo la acción.

2. Circulación de la hemolinfa

Para llevar a cabo la circulación, el vaso dorsal permanece en gran actividad, de esa manera la hemolinfa penetra a las cámaras del corazón a través de unas aberturas llamadas ostias u ostiolos. La cámara llena se dilata, a esta condición se le llama diástole. Luego se produce un movimiento de contracción que hace que la cámara quede vacía, en ese momento se dice que la cámara está en sístole. Estos

movimientos alternos hacen que la sangre llegue hasta la aorta de donde es vertida a la cavidad del cuerpo a la altura de la cabeza, para cumplir con las funciones.

3. Nutrición de *Apis mellifera* L.

Un individuo ingiere, digiere y asimila alimentos para transformarlos en nutrientes a nivel de las células, el cual se llama alimentación. El aporte de nutrientes a nivel de tejidos se le conoce como nutrición. Para las abejas existen dos tipos nutrición y se clasifican en energéticos aquellos que proveen la energía necesaria para el funcionamiento de los diferentes tejidos. Para las abejas el principal alimento energético es la miel. Por otro lado, se encuentran los proteicos aquellos que contribuyen a la formación de las estructuras de los tejidos, siendo la principal función del polen proveniente de las flores. Es necesario tener solo cuatro recursos (néctar, polen, agua y resina) para posibilitar la vida de una colonia. El néctar y polen son los alimentos esenciales de las abejas, y constituye la materia prima para la obtención de carbohidratos y proteínas respectivamente (Palacio, 2009).

1. Importancia de la nutrición de la colmena

La nutrición juega un papel fundamental en la prevención de las enfermedades como herramienta para mantener un buen estado fisiológico interno de los diferentes individuos, favoreciendo la defensa contra agentes patógenos. Ésta se basa en el mantenimiento de la homeostasis y el comportamiento higiénico, ambos están relacionados con la nutrición de la colonia. Un adecuado estado nutricional estimula el comportamiento higiénico y reduce la masa infectante, transformándose así en el principal componente ambiental que permite la expresión de los mecanismos genéticos de defensa. Los problemas de nutrición ciertamente tienen un rol en el desarrollo de enfermedades infecciosas y, por consiguiente, en el estado de salud de la colonia. Por ejemplo, se ha visto una alta concentración de esporas de nosema (*Nosema apis*) cuando la crianza se vuelve mínima como resultado de una deficiencia proteica (Hornitzky, 1990; Zilio y Rodriguez, 2009).

2. La digestión de las abejas

La clase de los insectos es muy amplia y variada, pero a pesar de esto su tubo digestivo, a nivel embriológico, morfológico y fisiológico, cuenta con tres divisiones básicas: estomodeo (anterior), mesenterón (medio) y proctodeo (posterior) (Natio 2002; Olivos 2010).

En el estomodeo, debido a su cutícula impermeable, hay poca, o nula, absorción de los alimentos ingeridos (Natio 2002; Olivos 2010). Algo importante en esta porción del tubo digestivo, es que en ella se encuentra el buche o estómago melífero y el proventrículo, ubicado al final de ésta (Olivos, 2010).

El estómago melífero almacena el néctar o miel recolectado por cada abeja. Es muy expandible y cuando una abeja ha recolectado suficiente néctar, el contenido es regurgitado de forma voluntaria, mediante la presión producida por la contracción de los segmentos abdominales (Seeley 1995; Olivos, 2010). Esta porción del tubo digestivo también es utilizada para recolectar agua (Snodgrass 1975; Olivos, 2010).

El proventrículo sirve como aparato regulador del alimento que entra al ventrículo o mesenterón. La parte anterior del proventrículo comunica al buche y tiene una válvula en forma de X. Mediante esta válvula, sumamente muscular, la abeja puede selectivamente, remover el polen del néctar y pasarlo al ventrículo (Seeley 1995; Olivos, 2010).

El ventrículo es el lugar principal donde se lleva la secreción de enzimas digestivas, para la digestión y absorción de los nutrientes ingeridos (Natio 2002; Olivos 2010). La parte anterior de ventrículo tiene una válvula que evita la regurgitación de material del estómago al buche (Snodgrass 1975; Olivos 2010). Las células del ventrículo secretan la membrana peritrófica, que envuelve la comida que ingresa al ventrículo, protegiendo a las microvellosidades del epitelio, del contacto físico directo de las partículas de comida ingerida. Esta membrana contiene quitina y

proteínas y dentro de ella ocurre la mayor parte de la digestión (Nation 2002; Olivos 2010).

Las principales enzimas que se encuentran en el tubo digestivo de las abejas es la sacarasa (Hrassnigg *et al.*, 2003; Olivos 2010) que actúan sobre la sacarosa, principal carbohidrato del néctar. Por medio de la sacarasa se obtienen glucosa y fructosa que son utilizadas como fuente energética y para la producción de miel (Nation 2002; Hrassnigg *et al.*, 2003; Olivos 2010).

También se encuentran las lipasas para obtener ácidos grasos y glicerol a partir de triacilglicéridos ingeridos. Para la digestión de lípidos cuentan con agentes emulsificantes, que permiten a las enzimas hidrofílicas tener contacto con las superficies hidrofóbicas de los triacilglicéridos (Nation 2002; Olivos 2010).

Para la digestión de las proteínas en las abejas se presentan enzimas proteolíticas en el intestino, utilizadas principalmente para degradar la proteína del polen (Hrassnigg *et al.*, 1998). Algunas de estas enzimas se encuentran libres en el lumen intestinal, mientras que otras están fijadas en la membrana (Nation 2002; Olivos 2010).

La producción de las enzimas depende de la actividad de las abejas obreras. En las abejas nodrizas, existe una mayor producción de enzimas proteolíticas, debido a su alto consumo de polen, mientras que las abejas pecoreadoras, se verá una mayor producción de enzimas especiales para la digestión de hidratos de carbono (Hrassnigg *et al.*, 2005; Olivos 2010).

Otro factor importante que se debe considerar en la acción de las enzimas es el pH del intestino. Las enzimas como la catépsina y la tripsina, trabajan de mejor forma en ambientes de pH ácido y alcalino respectivamente. Asimismo, las enzimas utilizadas para la digestión de carbohidratos trabajan mejor en un ambiente de pH neutro o ligeramente ácido. Las lipasas utilizadas para la digestión de triacilglicéridos y otros ésteres, trabajarán mejor en pH alcalino, cerca de pH 8 (Nation 2002; Olivos 2010).

La última porción del tubo digestivo es el proctodeo, que tiene como función principal remover agua y materiales de desecho. El recto funciona como un almacén de estos productos de desechos. Las abejas eliminan sus desechos metabólicos durante el vuelo, cuando no pueden salir de la colmena (en invierno) estos desechos se almacenan en la ampolla rectal, alcanzando a expandirse de tal forma que ocupa gran parte del abdomen (Snodgrass 1975; Olivos 2010).

En la unión del proctodeo con el ventrículo, se encuentra una red de túbulos llamados de tubos de Malpighi (Natio 2002; Olivos 2010). Estos son órganos de excreción de desechos nitrogenados y se extienden por la cavidad del cuerpo de la abeja (hemoceloma). Tienen por función remover desperdicios y sales de la hemolinfa. Estos productos de desecho pasan por los túbulos al recto y de ahí son eliminados (Snodgrass 1975; Olivos 2010).

3. Importancia de las proteínas en la vida de la colonia

El polen de las flores es el recurso proteico por excelencia utilizado por las abejas para la alimentación de sus crías y es manipulado antes de convertirlo en alimento larval, con el fin de eliminar ciertas capas de exinas indigeribles para estos insectos como rafinosa, lactosa, estaquiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, ácido galacturónico, ácido glucónico y pectina que pueden ser tóxicos para las abejas *Apis mellifera* (García *et al.*, 2006). El proceso de transformación del polen se inicia en el mismo momento en que las abejas lo recogen (agregándoles ricas enzimas), continua con la fermentación dentro de las celdas al nido de cría, las celdas son operculadas con una capa delgada de miel, en un ambiente anaeróbico a 38 °C, al sufrir cambios bioquímicos es transformado, llamándolo pan de polen (Valega, s/a).

El polen se compone de diferentes sustancias como lo son las proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, minerales y muchos otros. Es un factor importante que se ha encontrado para limitar el aumento de la población en las colonias, un

polen menos del 20% de proteína cruda no puede cumplir con los requisitos de la colmena para la producción óptima.

El contenido de proteínas al emerger depende de la disponibilidad de alimentos fuera de la colmena durante la estación: la diferencia entre abejas nacidas en condiciones críticas para la recolecta de polen entre las que nacen en condiciones buenas asciende a más del 13% (Crailsheim, 1990).

El peso y contenido de nitrógeno de las abejas al nacer depende del consumo de polen de las nodrizas que alimentaron sus larvas y este de la fluctuación en el ingreso del polen a la colonia. Pero las abejas recién nacidas deben crecer y desarrollarse, este fenómeno sucede al consumir polen (o más precisamente los productos de la fermentación del polen en los panales cercanos al área de cría). En primavera, los productos de la digestión del polen se dirigen principalmente a las glándulas hipofaríngeas y son destinados a la alimentación de la cría; cuando la colmena se prepara para invernar se reduce el área de cría y pasan a conformar las reservas corporales de las abejas invernantes, el nivel de reserva corporales determina la vida de dichas abejas y el arranque de la colonia en la salida de la invernada (Vidal y Bedascarrasbure, 2009).

4. Requisitos proteicos de las abejas

Para el desarrollo de las funciones vitales y perpetuar la especie, la abeja requiere carbohidratos, minerales, grasas, vitaminas y agua. Debe existir un balance y aporte adecuado de estos nutrientes, variando el consumo entre las diferentes castas y etapas de la vida de las abejas. Las proteínas son muy importantes para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de las estructuras corporales de los seres vivos; ya que están presentes, como formadores de los tejidos y cumplen funciones como catalizadores biológicos en numerosas funciones metabólicas. Las proteínas son necesarias para las abejas en la alimentación en estado larval, para el completo desarrollo de las abejas jóvenes y la reparación de las células y órganos de las abejas viejas (Klieinschimdt, 1990; Zilio, *et al.* 2009).

El polen es recolectado por las abejas de un gran número de plantas en floración. Estas aportan las proteínas y es un factor importante en la población de la colonia y en la producción de la miel (Klieinschmidt, 1990; Zilio, *et al.* 2009). Su composición química y valor nutritivo varían de acuerdo a la fuente floral (Haydak, 1970) y otros factores, como la humedad, temperatura, pH, fertilidad del suelo y recolecta (Somerville, 2001).

El polen de una fuente mono floral será químicamente diferente de un polen similar recolectado en otra área. El nivel de proteínas de polen recolectados de diferentes plantas varía entre 8 y 40 %, causando una gran variabilidad en el valor nutritivo para las abejas y consecuencia en efecto fisiológico producido (Herbert, 1992; Zilio *et al.*, 2009). De esta manera, la cantidad de proteína que se encuentra en el polen es importante conocer su calidad, es decir, la proporción de aminoácidos determina la calidad nutricional del polen para las abejas (Zilio *et al.*, 2009).

Las abejas necesitan de una dieta balanceada en aminoácidos para su satisfacer su desarrollo y crecimiento. Se han considerado diez aminoácidos esenciales y las proporciones expresadas en % de proteína cruda ha sido establecida por De Groot (1953): arginina (3.0), histidina (1.5), lisina (3.0), triptófano (1.0), fenilalanina (2.5), metionina (1.5), treonina (3.0), leucina (4.5), isoleucina (4.0) y valina (4.0). La serina, glicina y prolina, aunque no son esenciales para el crecimiento, ejerce un efecto estimulante a nivel de crecimiento subóptico. Cuando existe una carencia de proteína, la isoleucina es el aminoácido limitante más frecuente (Kleinschmidt, 1998; Zilio *et al.*, 2009). También se registran la deficiencia de lisina, histidina, arginina, valina y metionina en muchas fuentes florales (Somerville, 2009). Sin embargo, la colonia normalmente recolecta polen de diversos orígenes florales, los que al mezclar se logra un balance de los nutrientes esenciales para la abeja, resultando un alimento con alto valor nutritivo (Haydak, 1970). Por otro lado, si el balance de aminoácidos no es el apropiado y alguno se encuentra en cantidad deficiente en la dieta, las abejas aumentan el consumo de polen para suplir esas deficiencias (Zilio *et al.*, 2009).

Somerville (2001) describe la cantidad de proteína cruda que se encuentra en las diferentes especies florales clasificándolas en tres niveles: especies con nivel bajo de proteína cruda menor de 20 %, como cardos, arándano, cítricos, roseta, lavanda, maíz, girasol, pino y sauce. Estos son pólenes predominantes, puede asumirse que las colonias van a declinar su población, particularmente si están trabajando en un flujo mediano a fuente de miel. Las especies con un nivel medio de proteína cruda de 20 a 25%, como lo son eucaliptos, canola, mostacilla, haba y abrepuño, estos son considerados como pólenes con fuentes deseables cuando hay una amplia cantidad disponible. Las especies con nivel alto de proteína cruda de 25 a 30%, como flor morada, almendro, varios tréboles, algunas especies de eucalipto, lupines y pera son considerados importantes por su alto valor nutricional para las abejas.

Las abejas almacenan polen en las celdas en forma de pan de abeja, es una mezcla de polen, miel, enzimas, secreciones glandulares y microorganismos que ayudan a su conservación y valor nutritivo (Herbert, 1992; Zilio *et al.*, 2009). Bajo condiciones naturales, el polen recogido por las abejas se almacena generalmente en la periferia del área de cría. En una colonia que está en un periodo de crianza, este polen colocado en el panal al lado de los huevos es consumiendo temporalmente por las abejas nodrizas (Zilio *et al.*, 2009).

5. Requerimientos proteicos de acuerdo al desarrollo de las abejas

Las larvas, tanto como obreras, zánganos o reinas, necesitan grandes cantidades de proteínas para desarrollar desde sus estadios, que son provistos por las secreciones de las glándulas hipofaríngeas de las abejas nodrizas. Las larvas jóvenes de obreras reciben jalea, una sustancia blanco-grisácea y consistencia pastosa, resultante de la mezcla de dos componentes alimentarios en una proporción 3:1 o 4:1, a diferencia de la jalea real que tiene una proporción 1:1 (jalea real: polen). Las larvas de más de 3 días reciben, además de la secreción clara, un alimento amarillo que contiene polen (Hayday, 1970).

Después del nacimiento de las abejas, se desarrolla los tejidos corporales, músculos y glándulas, como las hipofaríngeas, estos dependen de una adecuada cantidad de

proteínas en la dieta (Herbert, 1990; Zilio, *et al.*, 2009). Si ha sido sometida a carencia de polen, las glándulas se desarrollan en forma incompleta y reduce la vida media de las abejas (Zilio, *et al.*, 2009).

Las abejas obreras comienzan el consumo de polen al emerger hasta tener cinco días para alcanzar un máximo consumo, en este periodo sus glándulas hipofaríngeas, cuerpos grasos y otros órganos internos se desarrollan (Zilio, *et al.*, 2009). Estos cambios dependen de las condiciones generales, tales como el estado, los requerimientos y la fuerza de la colonia, la crianza, la presencia de la reina, la entrada de néctar y polen, y las condiciones climáticas (Haydak, 1970). En los cinco días, el contenido de N se incrementa a un 93% en la cabeza, 76% en el abdomen y 37% en el tórax (Hayday, 1934; Zilio, *et al.*, 2009). Es muy importante una dieta balanceada y abundante para las nodrizas permitiendo un buen estado nutricional de la colonia (Haydak, 1970).

Las abejas nodrizas cambian de funciones cuando alcanzan el día 10 a 14, para pasar a ser forrajeras en ese momento se disminuye drásticamente el requerimiento proteico de las proteínas del polen, manteniendo una mínima ingesta para renovar proteínas corporales, encontrando la disminución en el peso y contenido de N de sus tractos digestivos (Haydak, 1934; Zilio *et al.*, 2009).

Las abejas viejas solo necesitan consumir carbohidratos para obtener energía, derivando todos los materiales necesarios para reparar sus órganos vitales del catabolismo de las reservas corporales depositadas durante periodos más tempranos (Haydak, 1970).

6. Las proteínas en las abejas

El contenido proteico del cuerpo de las abejas puede variar del 21 al 67 % y resulta un factor determinante en la longevidad de estas. Cuando la proteína corporal excede al 40 % la vida de las abejas aumenta a más de 45 a 50 días, mientras disminuye la proteína corporal al 40% las abejas tienen una esperanza de vida entre 20 y 26 días (Kleinschmidt, 1990; Zilio, *et al.*, 2009).

La proteína corporal de las abejas obreras se va reduciendo por la producción de miel y cera, condiciones climáticas y un aumento de la cría, especialmente en primavera. Por otra parte, la recolecta de mucho polen con más del 20% de proteína cruda, y no son forzadas a producir demasiada miel (Kleinschmidt, 1998).

El cuerpo graso está formado por delgadas capas celulares que se extienden por la cavidad corporal de la cabeza, tórax y abdomen de la abeja (Padilla, 2012). Es un centro metabólico y bioquímico, que participa en funciones de homeostasis, dándole importancia biológica a su capacidad de mantener un equilibrio entre los recursos y los requerimientos durante las diferentes fases de la vida de la abeja. Se encarga de la biosíntesis y acumular proteínas, lípidos, carbohidratos, aminoácidos y otros metabolitos (Stanley, 1997; Zilio, *et al.*, 2009). Este almacenaje es especialmente importante en las abejas recién nacidas durante el otoño, las cuales presenta también un mayor contenido proteico en su hemolinfa y glándulas hipofaríngeas (Fluri *et al.*, 1982), ya que son las responsables de segregar el alimento necesario para las larvas de los primeros ciclos de cría a la salida del invierno (Zilio, *et al.*, 2009).

El cuerpo graso modifica sus funciones en las diferentes etapas: en la etapa inmadura acumula los nutrientes necesarios para el desarrollo a la etapa adulta, es principalmente un órgano biosintético importante durante la vida de las abejas estado de larva y adulto (Keeley, 1985; Zilio, *et al.*, 2009).

Las glándulas hipofaríngeas constituyen el centro de la fabricación de alimento para las larvas y desarrollo están relacionada con el contenido proteico de la dieta (Standifer, 1970; Zilio, *et al.*, 2009). Las abejas nodrizas tienen sus glándulas hipofaríngeas bien desarrolladas, son las encargadas de segregar el producto rico en proteína la jalea real, que son distribuidos por medio de trofolaxis al resto de las castas de la colonia (Haydak, 1970). El consumo de polen de las abejas nodrizas incrementa a medida que crece el número de larvas que alimentan.

Standifer *et al.*, (1970) encontraron que el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas es relacionado con el contenido proteico de la dieta. El mejor desarrollo se ha visto

que se obtiene con altos niveles de proteínas, pero niveles menores promueven el incremento de la longevidad. Esta discrepancia indica diferencias en los requerimientos proteicos de abejas jóvenes y viejas.

7. Criterios fisiológicos para la evaluación de la nutrición proteica

Los criterios para evaluar el estado de nutrición proteica de las colonias de las abejas *Apis mellifera*, se enfoca a partir de la comparación de diferentes dietas, es decir, del potencial biológico de varios pólenes y otras fuentes de proteicas sobre el desarrollo y crianza de abejas, o respuesta de la colonia. La evaluación de la calidad del polen por medio del crecimiento de la colonia y su desarrollo podrían proveer la información más pertinente acerca del impacto potencial sobre el buen estado de las abejas (Zilio et al., 2009).

Consumo: este parámetro no tiene una relación entre el contenido de proteína cruda del polen y el consumo relativo por las obreras recientemente emergidas. Esto indica que las abejas jóvenes, particularmente las nodrizas, quizás no tengan un mecanismo a través del cual discriminen el contenido proteico de la dieta que consumen (Pernal y Currie, 2000). Tampoco entre el consumo de polen y el número de crías (Hrassnigg, 1998). Este parámetro mide únicamente la cantidad y no la calidad nutritiva de las dietas.

Longevidad: La longevidad de las abejas recientemente emergidas en relación con diferentes dietas fue estudiada por varios autores, entre ellos Standifer, *et al.*, (1969) y Kulinčević, *et al.*, (1982), que evaluaron la longevidad de abejas adultas y de las nodrizas criadas bajo diferentes dietas.

Área de cría: El área de cría ha sido estudiada por varios autores, entre ellos Kleinschmidt (1990), encontró que al reducir la disponibilidad de polen, el área de cría disminuye. El número de crías en función de diferentes dietas también ha sido investigado por Kulinčević, *et al.*, (1982). Sin embargo, es un parámetro impreciso porque varía también en función de factores climáticos, duración del día y otros.

Proteína corporal: La proteína corporal de la abeja es un buen indicador de medida para la capacidad de las colmenas a sobrevivir del invierno y de superar enfermedades. Cuanto más alto es el nivel de la proteína corporal, más capaces son las abejas de producir miel (Kleinschmidt, 1998). En cuanto a la disponibilidad de polen disminuye, también disminuye la proteína cruda corporal. Aunque una buena cantidad de polen se encuentra disponible para el incremento del área de cría, con un polen de 20 a 21% de proteína cruda no es suficiente para incrementar la proteína corporal (Kleinschmidt, 1990).

Proteína en la hemolinfa: Bitondi, *et al.*, (1996) investigaron la relación entre la cantidad de polen ingerida por obreras, en condiciones de laboratorio, y el nivel de proteína presente en la hemolinfa, así como de la vitelogenina, que representa alrededor del 40% de la proteína total de hemolinfa. El incremento de la secreción de vitelogenina en la hemolinfa de las nodrizas causa un incremento considerable de la proteína total. En las forrajeras el contenido de proteínas en hemolinfa disminuye al disminuir el consumo de polen. Cremonez, *et al.*, (1998) establecieron que la medición del contenido proteico de hemolinfa es un método útil, rápido, práctico, preciso y más simple que la medición de vitelogenina para determinar si la dieta es adecuada para las nodrizas.

Desarrollo de órganos internos: El desarrollo de órganos es otra forma de evaluar la calidad de la dieta proteica consumida por una colonia. Entre los órganos factibles de ser evaluados se encuentran las glándulas hipofaríngeas, los ovarios y los cuerpos grasos.

Las obreras jóvenes son las responsables de alimentar a todas las abejas dentro de la colonia, la medición del desarrollo de las glándulas hipofaríngeas provee información acerca de la cantidad de proteína potencialmente diseminada al resto de la colonia. El contenido proteico de las glándulas hipofaríngeas es un parámetro fisiológico efectivo para evaluar la calidad del polen consumido por las obreras recientemente emergidas (Pernal, *et al.*, 2000).

La síntesis proteica de estas glándulas utiliza la proteína derivada del polen (Crailsheim *et al.*, 1992). La cantidad y calidad de alimento para las crías producida por las nodrizas tiene importante relación con el estado de la colonia como una unidad. La mayor parte del alimento se destina a desarrollar las larvas dentro de la colonia, sin embargo, una proporción significativa también alimenta a las abejas adultas por trofalaxis (Crailsheim, 1990). La calidad del alimento recibido de las abejas nodrizas hacia la cría y reina, tiene el potencial de influenciar en el crecimiento de la colonia (Pernal, 2000).

El desarrollo de las glándulas hipofaríngeas es influenciado por la cantidad y calidad de proteína ingerida por las obreras (Hrassnigg, 1998a; Standifer, 1960) y es evaluado en función de su diámetro o expresado en una escala del 1 a 4 (Mauricio, 1954: 1 sin desarrollo y 4 desarrollo completo, citada por Standifer, 1960).

El tamaño de las glándulas, la medida de su diámetro axial está relacionado con su contenido proteico total (Browsers, 1982). Para las abejas nodrizas, el contenido proteico de las glándulas hipofaríngeas puede ser usado como indicador de actividad glandular (Huang, *et al.*, 1989). El examen de las glándulas en las obreras recientemente emergidas es una medida fiable de la asimilación proteica, ya que su tamaño no es afectado por reducciones sucesivas de la cantidad de larvas (hasta el seis día, comenzando las diferencias luego de 15 a 23 días (Hrassnigg, 1998). Standifer (1960) determinó que luego de los 21 días hay un retroceso, por lo que se considera más adecuada la comparación de dichas glándulas ante el consumo de diferentes dietas a los 14 días.

En condiciones normales de crianza tiene una correlación positiva entre el peso del estómago, que representa el consumo de polen, y el volumen de los acinos; pero también en abejas después del invierno, que casi no consumen polen, hay un buen desarrollo glandular. Aquí las abejas acumulan nutrientes en sus glándulas, que se vuelven grandes y se mantienen en este estado por un largo período. Así, solo en colonias de crianza normal las abejas pueden ser clasificadas como nodrizas por su estómago pesado, conteniendo mucho polen y por el buen desarrollo de las

glándulas hipofaríngeas. Por lo que se deduce que no sólo la cantidad de cría es la que regula el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas (Hrassnigg, 1998).

La determinación del peso fresco de la cabeza puede servir parcialmente como un método rápido y fácil para describir el desarrollo glandular. Aunque exista una buena correlación entre esta medida y el volumen de los acinos, presenta algunas desviaciones (Hrassnigg, 1998). Cuando las glándulas degeneran, su espacio no es llenado sólo por hemolinfa, sino también por aire. La disminución del peso en un 30% en abejas forrajeras con respecto a las nodrizas, permitirían volar más económicamente, así también la reducción del peso del estómago (Hrassnigg, 1998).

El desarrollo de las glándulas hipofaríngeas y ovarios en obreras recientemente emergidas parece ser una medida fiable y sensible en donde se emplea las proteínas, y cuando se usan juntas proveen un buen indicador para la calidad del polen que está siendo consumido, dada la fuerte correlación entre la cantidad de proteína consumida de la dieta del polen y el alcance del desarrollo de glándulas hipofaríngeas y ovarios (Pernal y Currie, 2000). La significativa correlación positiva entre el contenido de proteína cruda de las dietas y el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas en las obreras, indica que el contenido de proteína cruda podría ser usado como guía general para evaluar la calidad del polen (Pernal y Currie, 2000). Aunque la mayoría de las especies florales han sido cuantitativamente analizadas exhiben perfiles similares de aminoácidos y contienen los niveles mínimos de aminoácidos esenciales necesarios para el crecimiento normal y desarrollo de las abejas, el contenido proteico es importante.

El rango de desarrollo de las glándulas en las obreras no está relacionado con la composición de aminoácidos esenciales del polen consumido (McCaughey, *et al.*, 1980), pero está correlacionado con el nivel de proteína en la dieta (Standifer, *et al.*, 1960) y con la cantidad de proteína que se ingiere (Standifer, *et al.*, 1970). Es más, la adición de aminoácidos esenciales frecuentemente ha probado ser innecesario para mejorar el estado nutricional de dietas específicas (Cremonez, *et al.*, 1998). Aún para especies como el diente de león, que no sostiene la crianza porque tiene

deficiencias de aminoácidos, el contenido de la proteína cruda es muy bajo (9,9%). Estos resultados sostienen el uso de proteína cruda como parámetro para evaluar la calidad de la dieta de polen (Pernal y Currie, 2000).

La proteína del polen promueve el crecimiento de los cuerpos grasos. Fluri, *et al.*, (1982) determinaron la relación que existe entre el contenido proteico de cuerpos grasos, de hemolinfa y de glándulas hipofaríngeas.

5. Vitelogenina

La importancia de la nutrición es cubrir todas las necesidades nutricionales de las abejas para las abejas jóvenes que son las encargadas de alimentar a las larvas; estas al digerir el grano de polen, incorporan grandes cantidades de aminoácidos en su hemolinfa con el objetivo de sintetizar nuevas proteínas tales como la vitelogenina (Vg) una glicolipoproteína (Otis *et al.*, 2004). Esta proteína es almacenada principalmente en los cuerpos grasos, hemolinfa y glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras (Amdan y Omholt, 2002; Sarlo *et al.* 2011).

El nivel de la proteína vitelogenina en los cuerpos grasos de las abejas se asocia directamente con la longevidad. Es una glicolipoproteína específica de los animales del sexo femenino la cual está relacionada con la reproducción y precursora en todos los animales ovíparos. En los animales invertebrados, los insectos la sintetizan en el cuerpo graso y los vertebrados en el hígado (Padilla, *et al.*, 2012).

La Vg representa más del 50% de las proteínas totales de la hemolinfa de la abeja reina (Guidugli, *et al.*, 2008). La presencia de la Vg en la hemolinfa ha sido relacionada con el consumo del polen en la dieta de las abejas obreras, el cual resulta un buen indicador para el estado de reserva proteica de las abejas (Amdan y Omholt, 2002; Sarlo *et al.*, 2011).

El nivel de Vg se encuentra influenciado por factores tales como el comienzo del pecoreo, la cantidad de cría, disponibilidad de polen y la presencia de parásitos como la varroa (*Varroa destructor*) (Amdam *et al.*, 2006; Sarlo, *et al.* 2011).

La vitelogenina presenta un peso molecular de 180-kDa con una densidad de 1.283 mg/mL. Está compuesta por un 91% de proteína, 7% de lípidos principalmente de fosfolípidos y diacilglicerol y 2% de carbohidratos principalmente de manosa, glucosa y N-acetilglucosamina. Esta glicolipoproteína es rica en los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico, y pobre en cisteína y triptófano (Wheeler y Kawooya, 1990).

La presencia de la Vg en las diferentes castas repercute sobre la expresión en niveles dinámicos sobre las actividades poliéticas según la temporada del año. La síntesis de Vg es baja cuando las obreras emergen de sus celdillas, pero incrementa notablemente del segundo al tercer día de edad (Hartfelder y Engels, 1998; Corona *et al.*, 2007) y alcanza su máximo nivel cuando estas abejas desempeñan su labor de nodrizas a partir del quinto al décimo día de emergidas (Nelson, *et al.*, 2007). Al décimo hasta el décimo quinto día de edad, la síntesis de la Vg se reduce a niveles indetectables, esto al comenzar a ser abejas forrajeras hasta la muerte (Padilla *et al.*, 2012).

Las abejas presentan una hormona juvenil (JH) es una gonadotropina la cual regula la vitelogénesis (proceso de formación de los materiales de reserva del citoplasma del huevo) en los insectos. En las abejas siempre se muestra un patrón inverso de titulación en cuanto a la JH y Vg (Robinson y Vargo, 1997; Corona *et al.* 2007). Cuando se encuentran los niveles altos de la JH el nivel de Vg es bajo, y un alto nivel de Vg la JH disminuyen en las abejas.

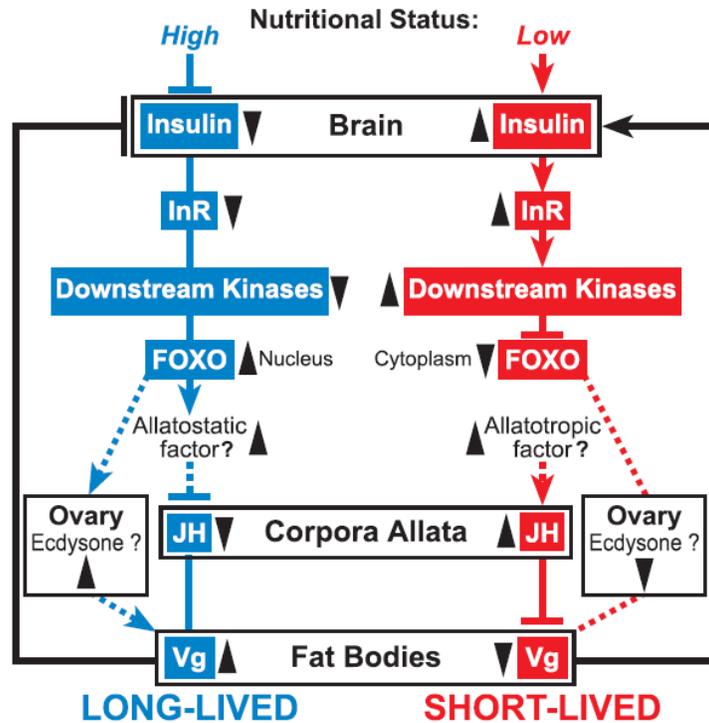


Figura 1. Modelo de la interacción de la Vg y JH en la relación de la nutrición (Corona *et al.*, 2007).

En la figura 1 se presenta un modelo donde se explica la relación de la Vg, JH e IIS (insulina) que interactúan para regular la longevidad en la abeja. El estado nutricional bajo (rojo): regula IIS (punta de flecha hacia arriba); los péptidos similares a la insulina (ILP) se unen a los receptores tipo insulina (InR) y la señal a través de quinasa, dando como resultado la fosforilación de FOXO y la localización del citoplasma. La JH alta reprime la vitelogénesis, dando como resultado bajos títulos de Vg. Baja concentración de Vg estimula la secreción de insulina por un mecanismo de bucle de retroalimentación. El alto estado nutricional (azul) da como resultado efectos opuestos, incluyendo la disminución de la actividad de IIS, la translocación nuclear de FOXO, baja JH y alta Vg. Además de su función antioxidante, la Vg podría promover la longevidad de la reina mediante mecanismos mediados por FOXO. El modelo proporciona una explicación de las diferentes longevidades entre reinas y obreras, también se explica las diferencias en la vida del trabajador que se relaciona con las fases de la colmena y la actividad forrajera (Corona, *et al.*, 2007).

La presencia de la proteína vitelogenina en abejas tiene la función de regular la organización social dentro de la colonia, a través de los efectos pleiotrópicos (de un gen que tiene más de un efecto; que afecta a múltiples características del fenotipo) en la división del trabajo y especialización de forrajeras. (Engels, 1974; Nelson, *et al.*, 2007).

En un estudio de transcripción del gen de la vitelogenina en abejas obreras fue obtenido en el cuerpo graso del abdomen en abejas de 5, 10, 15 y 20 días de edad en una colmena con una reina. El resultado que se presentó fue que los niveles de la proteína vitelogenina decrece progresivamente en función a la edad de las abejas, y se puede observar que a los 30 días de edad el nivel de la proteína es indetectable (Piulachs, *et al.*, 2003).

Corona, *et al.*, (2007) determinaron que las abejas reinas son las que presentan un alto nivel de expresión de la Vg, en comparación de las abejas obreras y los zánganos; las abejas reinas viejas presentan una mayor expresión de Vg que las abejas jóvenes.

6. Alimentación artificial con suplementos proteicos

La alimentación artificial es una técnica apícola utilizada para cubrir necesidades provocadas por las situaciones climáticas o por la propia manipulación del apicultor; así como, para estimular el desarrollo de la colmena en períodos específicos, especialmente a inicios de primavera, con el objetivo de disponer de colmenas fuertes para la polinización de árboles frutales y otros. Existen diferentes tipos de suplementos proteicos empleados dentro del sector apícola (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes suplementos proteicos para una alimentación artificial.

Tipo de suplemento artificial	Descripción
Suplemento proteico pos-cosecha	Se proporciona al final de la cosecha cuando se tiene abejas desgastadas y poca población en la colmena, con un contenido de proteína no mayor de 12%.
Suplemento proteico de estimulación	El objetivo de este suplemento es causar un sobre abasto de proteína disponible al 100%, la dosificación dependerá de la condición de las colmenas a estimular y de los recursos disponibles en la zona donde se encuentren.
Suplemento proteico de sostenimiento	Se usa una vez que se ha logrado la estimulación de las colmenas y se encuentran con la cantidad de cría necesaria para llegar a la cosecha, es muy adecuada en temporada de renta o polinización de cultivos, con esta alimentación se pretende lograr un sostenimiento de la cría para asegurar su nutrición, si faltara el alimento la reina suspendería su postura y las abejas en edad de maduración no desarrollarían sus glándulas, afectando así el desarrollo de las larvas en crecimiento.

Fuente: Ordoñez, 2002; Hernández, 2008.

Según Somerville *et al.*, (2000) citado por Burgos (2012), el nivel de proteína mínimo requerido en la elaboración de suplementos proteicos para abejas es del 20 %, pero si la colonia crece y se expande rápidamente, estos niveles se incrementarán al 25 y 30 %. Estos datos concuerdan con lo expuesto por Crailsheim, *et al.*, (1972) citado por Keller, *et al.*, (2005), que sugiere un mínimo del 20% de proteína para los suplementos apícolas.

Sin embargo, Ordoñez (1999) citado por Burgos (2012), el suplemento proteico de sostenimiento (colmenas con cría y poco polen) no debe superar el 24% de contenido proteico pues podría resultar tóxico para las abejas.

Avilez y Araneda (2007), acotan los valores del 10 al 30 % de proteína cruda son bien aceptados por las abejas, pero si estos decaen, los insectos probablemente consumirán más suplemento en su afán para mantener constante el ingreso de proteína. Ellos proponen una granulometría de los ingredientes mejor consumidos por las abejas son capaces de manipular con sus mandíbulas partículas que miden entre 0.5 a 100 μm .

Para la alimentación proteica de las abejas, es recomendable proveerla de suficiente polen natural, sin embargo, debido a la ausencia de polen en algunas ocasiones, se pueden emplear diversas fuentes con alto contenido de proteínas de origen natural, en la que se destacan los siguientes: harina de soya, yema de huevo en polvo, leche en polvo (descremada), levadura de cerveza (desamargada), algunas harinas de cereales, como maíz o trigo.

Pérez (2007), evaluó el efecto de tres suplementos proteicos sobre desarrollo de área de cría en periodos de escasez de polen en la Península de Yucatán, México. Los suplementos proteicos fueron elaborados a base de harina de soya, harina de maíz, sustituto lácteo en distintas proporciones. El resultado fue que la dieta elaborada con mayor cantidad de harina de maíz, presento mayor crecimiento en el área de cría, por lo que es una alternativa para alimentar de las colonias en época de escasez, además de ser la que presento un menor costo en producción del suplemento.

Franco, *et al.*, (2010) evaluó el impacto de tres suplementos de polen sobre los parámetros de incremento de peso, cantidad de cría y producción de miel. Los suplementos fueron formulados con 24 % de proteína cruda, con la mezcla de harina de soya (desgrasada), leche en polvo (descremada), levadura de cerveza (desmargada) y azúcar glass.

Robalino (2012), en su trabajo determinó los patrones de la alimentación energética y proteica (azúcar y polen) para la producción de jalea real. Se elaboró dos concentrados, la primera con azúcar y agua; y la segunda con azúcar, agua y polen granulado, con dos tiempos de cosecha (tres y cuatro días después del traslarve) y

un testigo (sin alimento). Las colmenas alimentadas con polen presentaron siempre mayor producción de jalea real, el porcentaje de copas llenas y población de abejas ($p < 0.05$) comparado con las colmenas que fueron alimentadas con alimento energético, la alimentación con polen permito aumentar la producción de jalea real en las colmenas con un 88.2% para tratamientos a los tres días y 206.6% a los cuatro días.

Mahmood *et al.*, (2013), en su trabajo presenta cuatro suplementos proteicos para la producción de miel. Las colonias fueron alimentadas con los diferentes suplementos: T₁ (soya + levadura de cerveza+ azúcar), T₂ (levadura de cerveza + azúcar), T₃ (maíz + levadura de cerveza + azúcar) y T₄ (solo azúcar). La producción de miel después de la alimentación con los tratamientos fue mejor para el grupo T₂ en comparación de los otros tratamientos. Otro factor fue la producción de la jalea real que no mostro alguna diferencia con respecto de los otros tratamientos.

De igual manera, se han ido estudiando nuevas fuentes de proteína de origen vegetal con un alto contenido de proteína disponible para el desarrollo nutricional de la colmena, en épocas de escasez de alimento natural en el medio natural.

Marrufo *et al.*, (2006), en su trabajo propone suplementos proteicos para abejas a base de harina de soya, azúcar y harina de chaya en diferentes proporciones y presentación (sólida y líquida). El tratamiento 1 de azúcar glass (75%) + harina de soya (25%); tratamiento 2 de azúcar glass (57%) + chaya molida (43%); tratamiento 3 de azúcar normal (50%) + jugo de chaya (50%); tratamiento 4 de azúcar normal (50%) + agua potable (50%). Los suplementos 1 y 2 presentaban con un 1% de proteína cruda y suplemento 3 presentó 17g de proteína por litro de jarabe. Los suplementos en presentación sólida (1 y 2) y líquida (3 y 4) se proporcionaron en alimentadores tipo Doolittle al interior del núcleo. Los resultados obtenidos en el consumo de los diferentes suplementos líquido no presento alguna diferencia significativa. En los tratamientos de presentación sólidos presentó una diferencia significativa con respeto de la harina de soya a la de harina de chaya. En el desarrollo del área de cria no presento diferencia significativa entre los suplementos

proteico, pero fue menor el desarrollo del área de cría con respecto al suplemento energético.

7. Fuente de proteína alternativa

1. Descripción general de *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh

La especie *Cnidoscolus chayamansa* conocida comúnmente como chaya, es una planta nativa de la Península de Yucatán, la cual ha sido utilizada exitosamente para la alimentación de animales domésticos, como lo son aves de traspatio y porcinos. Dada la facilidad de ser cultivada, su productividad potencial, y sobre todo su alto valor nutritivo. Menciona Kuti y Col. (1996) citado por Palos (2007) es una fuente alimentaria importante por su alto contenido de proteína de aproximado de 17% de proteína cruda, minerales como calcio, potasio, hierro, fósforo, vitaminas (A, C y E) además de riboflavina y tiamina; por lo que en términos nutricionales es superior a la acelga, lechuga y col.

2. Taxonomía

(Benson, 1979 citado por Rocha, 1998)

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotyledoneae

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Nombre científico: *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh

Sinonimia: *Jatrophaurens* var. *inermis* Calvino

Nombres comunes: chaya, chaya mansa, chaya de castilla, guarumbo, hormiguillo, guarumo, chacarro, trompeta, koochle, guarina y samura entre otros.

3. Descripción de la planta

Un arbusto caracterizado por ser una planta suculenta, de unos 2 a 3 m de altura, con ramas muy delgadas, médula blanca y gruesa con pocos pelos urticantes, con

1 a 2 glándulas en el ápice del pecíolo: hojas cardadas, trilobuladas, toscamente onduladas dentadas, más anchas que largas, verde brillante, de 10 a 16 cm de ancho y de 4 a 8 cm de largo, pecíolo de 8 a 15 cm de longitud, usualmente con vello urticante; flores tubulares y blancas, unisexuales, masculinas de 6 - 7 mm con estambres; las femeninas de 9 -10 mm; fruto una cápsula con 3 semillas. Planta nativa de México (Martínez, 1979 citado por Rocha, 1998).

4. Distribución

Esta planta se distribuye en el sureste mexicano, principalmente en Yucatán, Tabasco, sureste de Chiapas, centro y sur de Veracruz, parte de Campeche, sur de Quintana Roo y norte de Morelos. En el Estado de Nuevo León esta planta no presenta una distribución no uniforme.

5. Usos

La chaya ha sido uno de los recursos naturales con los que el estado de Yucatán ha contado desde los tiempos prehispánicos, ya que se sabe que los antiguos mayas poseían especial aprecio por esta planta, cuyo uso ha sido alimenticio y medicinal. Como resultado de largos años de selección, esta planta presenta actualmente algunas modificaciones: pérdida de vellosidad y tendencia a la desaparición de ciertos glucósidos cianogénicos. Parece ser que solo en la Península de Yucatán, el consumo de la chaya es a un nivel popular. En nuestros días se utiliza principalmente las hojas tiernas con todo y pecíolos (Barrera et al. 1981 citado por Rocha, 1998).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran demanda de proteína que se necesita para el buen desarrollo fisiológico de las abejas, y que en ocasiones se les hace difícil tener fuente de proteína natural (polen), a causa de problemas climáticos a los que se enfrentan las colmenas hoy en día. La deficiencia de proteína que enfrentan las colonias puede ser compensada por medio de la alimentación artificial, sea proteica o energética, para cubrir las necesidades nutricionales de las colmenas. Este manejo apícola permite a los apicultores mantener a sus colonias en buenas condiciones hasta el inicio de la temporada (flujo de néctar y polen). Por lo que es necesario un alimento artificial que cubra los requerimientos nutricionales de la colmena, y que sea, con componentes de alta calidad y de bajo costo. De acuerdo con lo anterior, el presente estudio presenta una alternativa de suplemento proteico con una especie botánica de alto valor proteico mediante la cuantificación proteica e identificación de vitelogenina presente en la hemolinfa de la abeja *Apis mellifera* L., con el propósito de mejorar la nutrición de las colmenas, reducir los costos de producción y evitar la contaminación de los productos derivados de la colmena.

IV. HIPÓTESIS

El suplemento proteico a base de harina de *Cnidoscolus chayamansa* tendrá un efecto sobre la producción de la vitelogenina, así como en el desarrollo del área de cría.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar el efecto de un suplemento proteico a base de *Cnidoscolus chayamansa* sobre el contenido proteico y la presencia de vitelogenina en la hemolinfa de abejas *Apis mellifera* L.

2. Objetivos específicos

1. Determinar el contenido nutricional del suplemento proteico a base de harina de *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh.
2. Evaluar el perfil de aminoácidos del suplemento proteico a base de harina de *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh
3. Evaluar el impacto del suplemento proteico en la postura de la reina.
4. Evaluar el contenido proteico y la presencia de vitelogenina en abejas obreras nodrizas de *Apis mellifera* L. alimentadas con el suplemento a base de harina *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh.

VI. METODOLOGIA

El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en tres fases, que se describe a continuación:

Primera fase:

1. Obtención de la materia prima

1. Hojas de *Cnidocolus chayamansa* Mc Vaugh

La recolecta de las hojas de la chaya fue obtenida de los huertos familiares y parcelas de la comunidad de José María Morelos y Candelaria, Quintana Roo. Las hojas recolectadas se le eliminaron los pecíolos dejando las láminas foliares, estas mismas se cortaron en pequeños trozos para su fácil deshidratación a temperatura ambiente durante tres días en un horario de 9:00 a 17:00 horas sobre bolsas de polipropileno, y se manipularon dos veces al día, permitiendo que la deshidratación sea homogénea. Ya deshidratadas las hojas procedió a la molienda con un molino manual (casero) para obtener partículas muy finas. La harina obtenida se le realizó un tamizado con una malla de tamaño de partícula de 50 μm .

2. Jarabe de fructosa

El jarabe de fructosa es un derivado del almidón que se utiliza como agente edulcorante y que después de un proceso bastante complejo da lugar a un producto rico en fructosa. El jarabe de fructosa se obtuvo de manera comercial en presentación almidones de 20 litros.

3. Levadura de cerveza

La levadura de cerveza se compone de microorganismos muy activos, con una gran capacidad de reproducción. Durante este proceso, se generan prácticamente todas las vitaminas y proteínas vegetales de gran valor biológico, enriquecidas con oligoelementos y minerales procedentes de su substrato alimentario. Se adquirió de manera comercial.

4. Multivitamínico

Se empleó un multivitamínico comercial Multivitactive® (EASY PHARM S. De CV) es un complemento alimenticio oral que contiene los 10 aminoácidos esenciales y 14 vitaminas, necesarias para el óptimo funcionamiento del organismo. Además de ayudar a compensar cualquier desbalance proteico ocasionado por un consumo de alimento limitado. Favorece la recuperación, reacomodos, convalecencia. Ayuda a igualar lotes, mejora la conversión alimentaria y la ganancia de peso. Contenido neto por cada litro: Vit A 2,500,000 I.U, Vit E 10.000 I.U, VitB2 4,5g, Vit B12 0.01g, Ácido fólico 0.25g, Vit C 30g, Biotin 0.05g, Metionina 200g, Arginina 10g, Leucina 12g, Treonina 2g, Triptófano 6g, VitD3 2,250,000 I.U., Vit B1 1.5g, Vit B6 2.5g, VitK3 4.5 g, Nicotinamida 22g, Acido pantoténico 9g, Colina 50g. Lisina 50g, Valina 22g, Isoleucina 8g, Fenilalanina 10g, Histidina 6g.

5. Suplemento comercial Ultra Bee®

El Ultra Bee® es un alimento comercial que brinda la mayor cantidad de proteína disponible en un suplemento seco. Permite construir colonias a finales del invierno o principio de primavera para prepararse para la polinización o en cualquier momento para mantener o aumentar la producción antes de una mielada. Su presentación es en forma de base seca. Su contenido nutricional de proteína cruda es de 60%, grasa mínima 5%, fibra cruda bruta de 3%, humedad con 6%. La composición de este suplemento es de productos de proteína vegetal, aceite de canola, aceite de pasto cedrón, cloruro potásico, cloruro de sodio, niacinamida, suplemento de vitamina E, ácido ascórbico estabilizado, citrato de sodio, pantotenato de calcio, suplemento de vitamina A, suplemento de vitamina D3, riboflavina, botina, suplemento de vitamina B12 piridoxina HCl, tiamina HCl, sulfato de magnesio, ácido fólico, sulfato ferroso, sulfato de cobre, sulfato de cinc, sulfato de manganeso, sulfato de cobalto, lactato de calcio, sulfato de potasio, carbonato de magnesio, dihidroyoduro de etilendiamina.

6. Suplemento comercial Nutra®

Es un suplemento proteico y energético comercial empleado en el sector para la nutrición y desarrollo de las colmenas. La presentación del producto es una pasta ya elaborada y finalizada para suministrar a la colmena. Su composición nutricional presenta un contenido de humedad al 8.25%, proteína de 27.06%, grasas 1.27%, minerales 2.09% carbohidratos 59.98%.

7. Selección de colonias

Se emplearon 16 núcleos tipo Langstroh de *Apis mellifera*, cada núcleo presentaba con 6 bastidores, y una reina de un año, con el propósito que todos los núcleos se encuentren en las mismas condiciones. Los núcleos fueron creados después de la temporada de cosecha en el mes de junio del 2017. Para mantener a las colmenas homogéneas tres semanas antes de ejecutar el experimento todas las unidades experimentales se les proporciono 150 gramos de suplemento comercial Ultra Bee®.

Segunda fase.

1. Análisis proximales

Se llevaron a cabo los análisis proximales de dos suplementos proteicos comerciales (Nutra® y Ultra Bee®) y el suplemento proteico a base de harina de chaya. En el laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de Origen Animal, ubicado en el Instituto Tecnológico de Mérida. Los análisis proximales nos permitieron conocer el estado nutricional de los suplementos que se emplearon para llevar a cabo la investigación.

Los métodos a empleados son los propuestos por la AOAC (1990) .

Determinación de humedad

La técnica que se empleo fue por medio del método por secado de estufa (Anexo 2).

Determinación de ceniza

El procedimiento utilizado para la determinación de ceniza fue el método de cenizas totales (Anexo 3).

Determinación de grasa

El procedimiento utilizado para la extracción de grasa es el método de Soxhlet (Anexo 4).

Determinación de fibra cruda

El procedimiento utilizado para la extracción de la fibra cruda por el método gravimétrico (Anexo 5).

Determinación de proteína cruda

El procedimiento utilizado para la cuantificación de nitrógenos total por método de Micro Kjeldahl (Anexo 6).

2. Determinación de la calidad proteica

1. Determinación de la composición de aminoácidos

La determinación de los aminoácidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), de acuerdo con la metodología de Alaiz, *et al.*, (1992) con algunas modificaciones, se empleó un cromatógrafo de líquido de alta eficiencia marca Dionex UltiMate 3000 de Thermo scientific, con las siguientes especificaciones.

2. Hidrólisis proteica

Se colocó 40 mg de suplemento en un tubo de 15 mL, posteriormente se añadió 5 mL de HCL 6N. Los tubos fueron sellados con gas CO₂ y se colocaron en una estufa durante 20 horas con una temperatura a 110°C para llevarse a cabo la hidrólisis ácida. Después de la hidrólisis, las muestras fueron secadas con una fuente de calor bajo condiciones anaeróbicas en ambiente de CO₂, y se procedió a realizar la derivativación precolumna.

Para el aminoácido triptófano, se realizó por medio de una hidrólisis básica de acuerdo a Yust, *et al.*, (2004), se colocó 40 mg de la muestra y fueron disueltas en 6 mL de hidróxido de sodio 4N, se colocó en tubos de 50 mL bajo condiciones de CO₂ y se encubaron a una temperatura de 110°C por 4 horas. Pasado el tiempo, los hidrolizados fueron sumergidos en hielo y neutralizados a pH 7 con HNO₃ 12N. Posteriormente fueron diluidos con 25 mL de borato de sodio 1 M (pH 9). Se tomaron alícuotas de estas soluciones y se filtró a través de filtros Millex 0.45 µm (Milliporre) previo a la inyección.

3. Derivatización

Antes de analizar los hidrolizados proteicos ácido, se llevó a cabo una derivatización precolumna (Alaiz, *et al.*, 1992). A las muestras hidrolizadas y secas se le añadió 0.8 µL de etoximetilenmalonato de dietilo (EMMDE) como agente derivatizante. Seguidamente, se le agregó borato de sodio 1M (pH 9) hasta alcanzar un volumen final de 1 mL, llevo a cabo la reacción durante 50 min a 50°C. Transcurrido el tiempo de la reacción se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente y se filtraron con filtros Millex 0.45 µm (Milliporre), se tomó 20 µL de la muestra y se inyectó al cromatógrafo de líquidos.

4. Curva de calibración

Para realizar la curva de calibración se empleó la mezcla de estándares de aminoácidos en una concentración de 2.5 µmol/mL para cada uno, excepto para la L-cisteína con 1.25 µmol/mL. A partir de las cuales se prepararon soluciones estándares en un rango de concentración de 50 a 4000 pmol aa/20 µL como se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de los puntos de la curva de calibración para determinar el perfil de aminoácidos.

Concentración (pmol/20µL)	Estándar de aminoácidos (µL)	EMMDE (µL)	Borato de sodio (µL)
50	1	0.8	998
250	5	0.8	994
500	10	0.8	989
1000	20	0.8	979
2000	40	0.8	959
4000	80	0.8	919

La mezcla de los aminoácidos empleados para obtener la curva de calibración se sometió a las mismas condiciones que las muestras, para evitar los errores producidos por la pérdida de algunos aminoácidos durante la hidrólisis ácida. El volumen final de todas las soluciones fue de 1 mL y el cálculo de la concentración se efectuó para 20 µL correspondiente al volumen de inyección.

5. Condiciones del análisis cromatógrafo y gradientes de elución

El análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos se llevó a cabo por medio de un gradiente de elución, empleando dos fases móviles A y B:

1. Fase A: Acetato de sodio 25 mM con 0.02% de azida de sodio pH 6.
2. Fase B: Acetonitrilo grado HPLC.

Las fases móviles se filtraron a través de un filtro de membrana Millipore con un tamaño de poro de 0.45 µm antes de ser utilizadas.

El gradiente empleado para la determinación por medio del RP-HPLC se presenta en la tabla 3. Los cambios de gradiente se realizaron de manera lineal y el análisis cromatográfico se llevó a cabo a una temperatura de columna de 25°C, con una velocidad de flujo de 0.9 mL/min, en un ciclo de tiempo de inyección de 40 min. La longitud de onda del detector para la lectura fue de 280 nm. La columna empleada fue de Nova Pak® C18 (4 µm) 3.9 x 300 mm.

Tabla 3. Gradiente de elución para determinar aminoácidos por RP-HPLC.

Tiempo (min)	Gradiente lineal (A : B)
0 - 3	91 : 9
3 - 13	84 : 14
13 - 30	86 : 14 – 69 : 31
30 - 35	69 : 31
35 - 40	91 : 9

Para el triptófano, fueron inyectados la cantidad de muestras de 20 µL dentro de la columna, el gradiente de elución se sustituyó por una elución socrática consistente en acetato de sodio 25 mM, 0.02 % de azida de sodio (pH 6) y acetonitrilo (91: 9) a una velocidad de flujo constante de 0.9 mL/min, manteniendo las condiciones anteriormente descritas sin ninguna variación (Yust *et al.k*, 2004).

Tercera fase.

1. Diseño experimental

El diseño experimental se estableció en la localidad de José María Morelos, Quintana Roo en un apiario con 25 núcleos tipo Langstroh, de las cuales se seleccionaron 16 núcleos y agrupándolos en cuatro tratamientos con cuatro núcleos cada una. Todos los núcleos se alimentaron con jarabe de azúcar a una

concentración (1:1) suministrado en alimentadores externos en botellas Pet de 500 mL cada siete días durante seis semanas.

Cada grupo se distribuyó de manera al azar dentro del apiario para la aplicación de los tratamientos control, Chaya, Ultra Bee® y Nutra® (Tabla 4).

Tabla 4. Nomenclatura de los tratamientos distribuidos en el apiario.

Control (A)	Suplemento a base de harina de chaya (B)	Suplemento Ultra Bee® (C)	Suplemento Nutra® (D)
A1	B1	C1	D1
A2	B2	C2	D2
A3	B3	C3	D3
A4	B4	C4	D4

2. Aplicación de los suplementos proteicos

Cada tratamiento se le proporciono el suplemento proteico correspondiente con un peso de 150 g para cada colmena, colocando el suplemento cerca del nido. Para cada tratamiento se realizó una aplicación en un intervalo de siete días durante seis semanas.

3. Marcaje y recolecta de abejas nodrizas

Se realizó tres marcajes de las abejas nodrizas durante el experimento, esta actividad consistió en marcar (plumón para reinas) a abejas obreras recién emergidas de sus celdillas marcarlas en el tórax, para cada tratamiento se le asignó un color. El primer marcaje de abejas fue antes de iniciar con el experimento esto para conocer el nivel de proteína presenta en la hemolinfa en cada uno de los tratamientos, a los siete días después de marcar a las abejas se recolecto para la extracción de la hemolinfa. El segundo marcaje de abejas se llevó a cabo después de los 21 días de iniciar con el experimento, y su recolecta fue a los ocho días de nacidas (29 días de su desarrollo). El tercer marcaje fue después de los 36 días de

iniciar con el experimento, y su recolecta fue a los 44 días. La metodología fue desarrollada en relación al ciclo biológico de la abeja, la recolecta de las abejas marcadas se encuentran dentro del rango de ser abejas nodrizas. La cantidad de abejas marcadas por cada unidad experimental fue de 30 abejas aprox., durante el proceso de la recolecta se capturaron 13 a 16 abejas por unidad experimental aprox. estas se colocaron en frascos transparentes de plástico de volumen de 100 mL con tapa de rosca se les realizó algunas perforaciones para permitir la entrada de aire y evitar la muerte de las abejas. Cada frasco se etiquetó con el número y tratamiento.

4. La extracción de la hemolinfa.

La extracción de hemolinfa se llevó a cabo en dos etapas: La primera consistió en la anestesia las abejas por medio de congelación en un estado de hibernación, para el fácil manejo para la extracción de la hemolinfa. La segunda consistió en la extracción por metodología propuesta por Chan, *et al.* (2006) modificada por García (2010), y presentando algunas modificaciones en la utilización de materiales, se empleó pipetas pasteur de 5" se calentaron para obtener la apariencia de un microcapilar. La extracción se realizó en el abdomen en los 2° y 3° tergitos. La gota de la hemolinfa en la pipeta de pasteur fue recuperada en tubos de PCR con pequeña cantidad de una solución 30% de β -mercaptoetanol en un buffer de fosfato. Esta solución nos permitió retardar la oxidación de la hemolinfa y llevar a congelación hasta el momento de la cuantificación del contenido de proteína (Anexo 13).

5. Variables de respuesta

1. Determinación del consumo del suplemento

Esta variable se consideró el peso inicio para cada uno de los suplementos y un peso final después de los siete días de exposición en la colmena, se empleó la fórmula de peso inicio (Pi) menos el peso final (Pf), durante seis semanas.

$$\text{Consumo} = \text{Pi} - \text{Pf}$$

2. Cuantificación proteica de la hemolinfa

Se empleó la metodología de Sarlo *et al.* (2011) donde realiza la cuantificación proteica por el método de Bradford.

3. Identificación de la vitelogenina

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica. La técnica de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) (Wheeler y Kawooya, 1990) permite el cálculo de parámetros moleculares, pues los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular, interacciona con las proteínas formando complejos de características comunes independientemente de las de cada proteína.

4. Desarrollo de área de cría

Para medir el área de cría se empleó la metodología de Olivos (2010) con algunas modificaciones, se tomaron fotografías a los bastidores por ambos lados (cada lado del bastidor fue etiquetado por el número de colmena y lado a o b), se consideró todas las celdas que presentan diferentes estados de desarrollo de cría (huevo, larva, pupa). Las fotos se obtuvieron de una cámara digital, la distancia de toma de la fotografía fue de 20 cm de cámara – panal, para tener fotografías homogéneas, se colocó sobre el bastidor una hoja de acetato cuadriculado en 2.5 cm * 2.5 cm (contienen 21 celdas aproximadamente), que permito el conteo de área de cría.

6. Análisis estadístico

El diseño experimental fue complemente al azar teniendo como variable de respuesta el consumo de suplemento, el área de cría y la cuantificación de proteína aplicando una ANOVA. La base de datos fue procesada con NCSS 11.0.13 con un alpha de 0.05.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Materia prima

Se recolectaron 122.00 Kg de hojas frescas de *Cnidocolus chayamansa*, que al deshidratarse y molerse se obtuvo 20 Kg de harina de con el tamaño de partícula de 50 μm , el tamaño de partícula que se encuentra dentro del rango reportado por Avilez y Araneda (2007) citado por Burgos (2012). El rendimiento de 1000 g de material húmedo fue de 165.00 g en materia base seca. Puc (2016) quien obtuvo un rendimiento de 150 g de materia seca por 1000 g de materia fresca (Anexo 1).

2. Análisis proximal del suplemento proteico a base de harina de chaya

El resultado del análisis proximal realizado al suplemento a base de la harina de chaya se presenta la tabla 5.

Tabla 5. Resultado de análisis proximal de suplemento proteico a base de harina de chaya (*Cnidocolus chayamansa*).

Análisis proximal	Suplemento proteico %
Humedad**	23.27 \pm 0.3946
Cenizas**	4.16 \pm 0.0381
Lípidos**	2.64 \pm 0.2911
Proteína*	10.24 \pm 0.3564
Fibra cruda**	1.80 \pm 0.3660
Carbohidratos**	56.99 \pm 0.2125

*Análisis a base húmeda

**Análisis a base seca

Avilez y Araneda (2007) citado por Burgos (2012), acotan a valores de 10 al 30% de proteína cruda los cuales son bien aceptados por las abejas, por lo que el suplemento proteico a base de harina de chaya se encuentra dentro de los rangos de contenido de proteína recomendados para el sector. Por otro lado, otros autores como Somerville *et al.* (2000) citado por Burgos (2012), el nivel de proteína mínimo requerido en la elaboración de suplementos proteicos para abejas es del 20% de

proteína cruda, pero si la colonia crece y se expande rápidamente, estos niveles se incrementarán al 25 y 30 % de proteína.

Los análisis proximales realizados a los suplementos comerciales Ultra Bee® y Nutra® se observan en la tabla 6.

Tabla 6. Resultado de los análisis proximales de los suplementos evaluados en la alimentación de abejas *Apis mellifera* L.

Análisis Proximal	Chaya (%)	Ultra Bee® (%)	Nutra® (%)
Humedad**	23.27 ± 0.3946	20.52 ± 0.2712	13.97 ± 0.3737
Cenizas**	4.16 ± 0.0381	1.93 ± 0.0213	1.91 ± 0.2054
Lípidos**	2.64 ± 0.2911	5.46 ± 0.4905	4.74 ± 0.2191
Proteína*	10.24 ± 0.3564	17.04 ± 0.3451	11.93 ± 0.1068
Fibra cruda**	1.80 ± 0.3660	0.43 ± 0.0811	0
Carbohidratos**	56.99 ± 0.2125	54.73 ± 0.2301	67.37 ± 0.2469

*Análisis a base húmeda

**Análisis a base seca

Estos resultados demuestran que el contenido proteico del suplemento elaborado a base de harina de chaya es comparable al de los suplementos comerciales que se mencionó anteriormente quedan dentro del rango de proteína cruda obtenida por Avilez y Araneda (2007) citado por Burgos (2012), donde mencionan valores de 10 a 30 % de proteína cruda en suplementos apícolas son bien aceptados por las abejas. La presencia de lípidos fue mayor en el suplemento Ultra Bee® con 5.46%, seguida por el suplemento Nutra® con 4.74% y por último el suplemento a base de chaya con 2.64%. El contenido de cenizas del suplemento a base de harina de chaya fue el mayor con 4.16 % y los suplementos comerciales fueron 1.93 y 1.91 % en Ultra Bee® y Nutra®, respectivamente; el contenido de ceniza del suplemento proteico a base de harina de chaya se encuentra dentro del rango reportado por Silvia, *et al.*, (2008) con un 3.8 y 4.2% de cenizas en pan de abeja de una mezcla de flores y de girasol respectivamente.

3. Cuantificación de proteína soluble del suplemento a base de chaya

Los dos ingredientes añadidos del suplemento fueron la harina de chaya y levadura de cerveza, los cuales contenía 8.06 y 2.21 % de proteína soluble respectivamente. Al realizar la mezcla de los dos ingredientes para el elaborar el suplemento proteico se obtuvo un 5.07 % de proteína soluble, el contenido de proteína soluble fue dividida proporcionalmente dentro de la mezcla con los respectivos ingredientes, los alimentos comerciales Ultra Bee® y Nutra® tuvieron 0.41 y 3.88 % respectivamente.

La cuantificación de proteína soluble de los tres suplementos se determinó por el método de Bradford. Los valores de proteína soluble oscilan entre 0.41 hasta 5.07 % de la proteína (Tabla 7), siendo el suplemento a base de chaya con un mayor contenido de proteína soluble, y de menor porción el Ultra Bee®. Los valores de proteína soluble en el que se encuentra el pan de polen varían desde 2.9 hasta 7.7 mg proteína/ g (Mesa *et al.*, 2015), dos de los suplementos proteicos se encuentran dentro del rango de proteína soluble que se presenta en el pan de abeja (Anexo 14).

Tabla 7. Resultado de los análisis de cuantificación proteica de suplementos evaluados en la alimentación de abejas *Apis mellifera* L.

Suplementos	Proteína soluble %
Suplemento de chaya	5.07 ± 0.0245
Nutra®	3.88 ± 0.0693
Ultra Bee®	0.41 ± 0.0588

4. Perfil electroforético de los suplementos proteicos

El perfil electroforético de los suplementos proteicos nos permitió determinar el número aproximado de proteínas. Este análisis se realizó por medio de gel de poliacrilamida al 10% en el sistema SDS-PAGE. En el primer carril se encuentra el marcador de 15 - 250 KDa. Los carriles 2, 3 y 4 corresponden al suplemento a base de chaya, Nutra® y Ultra Bee® respectivamente. El suplemento a base chaya fue el que presentó un mayor número de bandas con pesos moleculares que van de 100 – 25 KDa y el suplemento Nutra® no presentó bandas definidas de pesos moleculares de 60 – 20 KDa, siendo el suplemento a base de harina de chaya la

que presenta una amplia gama de proteínas. Las bandas que se presentan son las proteínas solubles, por lo que presentan aminoácidos libres que no son detectados. Estos son los primeros reportes de perfil proteico con geles de poliacrilamida (Figura 2).

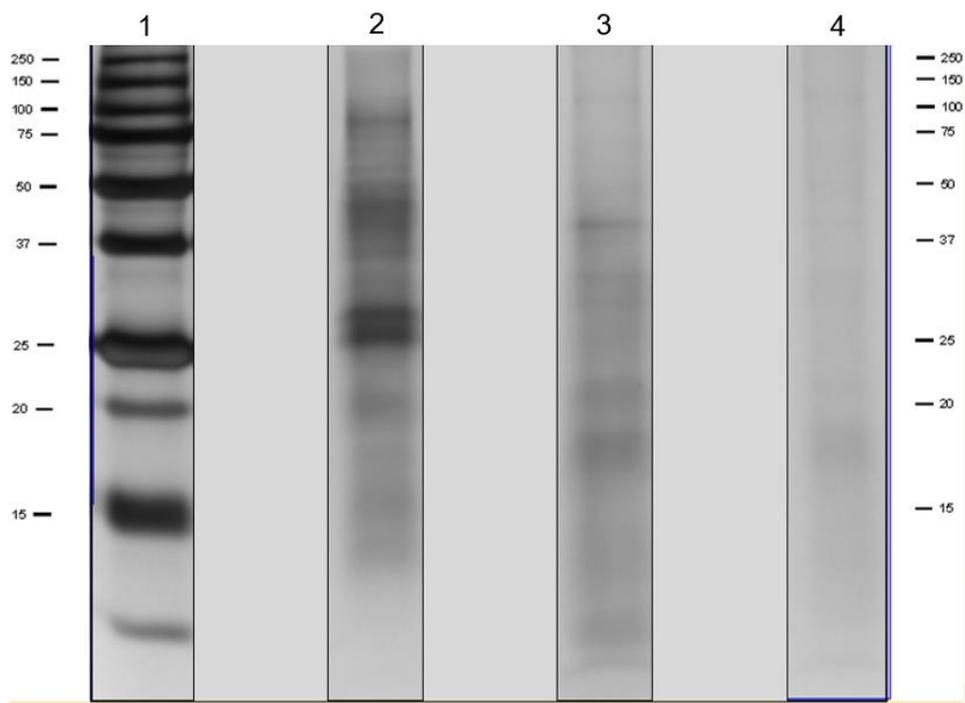


Figura 2. Perfil proteico de los diferentes suplementos: 1 marcador molecular, 2 suplemento a base de Chaya, 3 Nutra® y 4 Ultra Bee® determinado por el método SDS-PAGE.

5. Perfil de aminoácidos

1. Curva de calibración de los aminoácidos

En la figura 3 se puede observar el cromatograma de la mezcla de los estándares de aminoácidos obtenidos por medio de una hidrólisis ácida y la figura 4 corresponde a la determinación del triptófano mediante una hidrólisis básica.

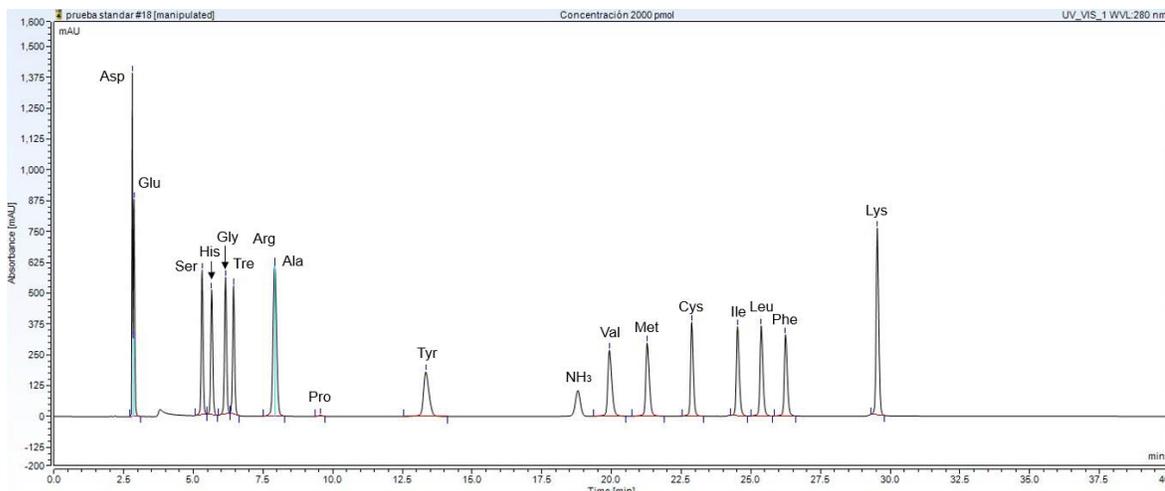


Figura 3. Patrón de elución de los derivados N-[2,2-bis(etoxicarbonil)vinil] de los aminoácidos presentes en la mezcla estándar (2000 pmol de cada aa).

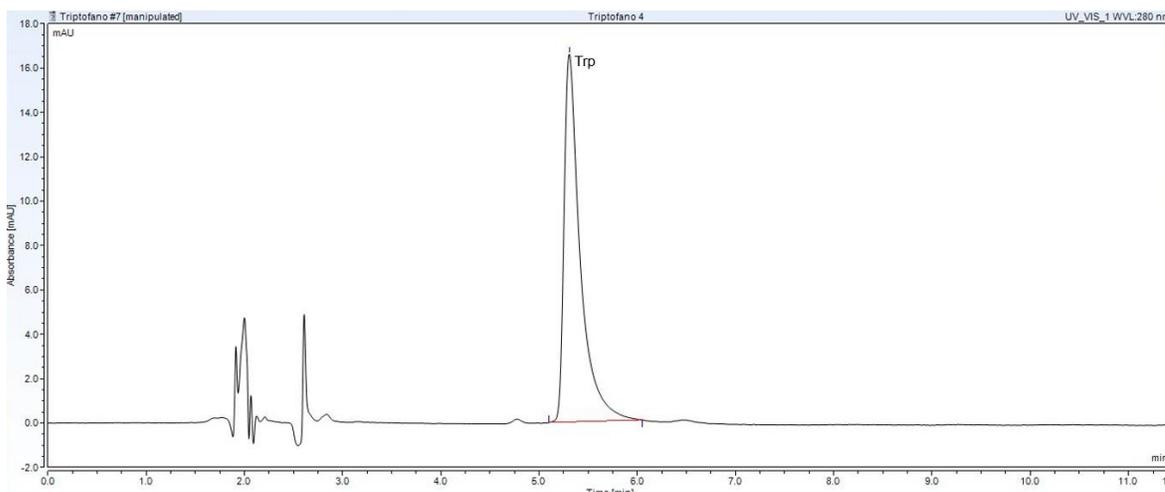


Figura 4. Patrón de elución de triptófano (120 pmol de aa).

En los picos cromatográficos se pudo observar un patrón de elucidación correspondiente a cada uno de los estándares de aminoácidos, por lo que se considera que las condiciones empleadas en el gradiente de elución son las

adecuadas para cada una de las muestras. Para los derivados del ácido aspártico y glutámico, la separación de los picos fue pequeña, los tiempos de retención fueron reproducibles y la integración de las áreas de los picos fue relativamente sencillo para realizar los cálculos correspondientes. Se observó que el derivatizante EMMDE no presentó un pico cromatográfico que pudiera interferir con la identificación y cuantificación de los aminoácidos (Alaiz, *et al.*, 1992). Por otro lado, el amonio (NH_3) presentó tiempos de retención similares en todas las concentraciones empleadas para la curva de calibración, de este modo se garantiza la precisión de los resultados.

En la tabla 8 se presentan los tiempos de retención para cada uno de los aminoácidos. Analizando los coeficientes de variación, se observó pequeña y las señales cromatográficas que generan son reproducibles. El factor de respuesta corresponde a la pendiente de la curva de calibración de cada aminoácido analizado.

Tabla 8. Tiempos de retención de los estándares de aminoácidos y sus coeficientes de variación.

Aminoácidos	t_R (min)	Coefficiente de variación
Ácido Aspártico (Asp) ^a	3.164 ± 0.231	0.0219
Ácido Glutámico (Glu) ^b	3.248 ± 0.285	0.0228
Serina (Ser)	5.909 ± 0.475	0.0202
Histidina (His)	6.373 ± 0.485	0.0229
Glicina (Gly)	6.839 ± 0.463	0.0223
Treonina (Thr)	7.168 ± 0.471	0.0194
Arginina (Arg)	8.817 ± 0.492	0.0229
Alanina (Ala)	8.912 ± 0.643	0.0241
Prolina (Pro)	10.322 ± 0.608	0.0003
Tirosina (Tyr)	14.910 ± 0.851	0.0226
Valina (Val)	21.163 ± 0.547	0.0233
Metionina (Met)	22.518 ± 0.701	0.0209
Cisteína (Cys)	23.634 ± 0.332	0.0239
Isoleucina (Ile)	25.445 ± 0.399	0.0188
Leucina (Leu)	26.226 ± 0.402	0.0226
Fenilalanina (Phe)	27.061 ± 0.393	0.0218
Lisina (Lys)	30.319 ± 0.353	0.0432
Triptófano (Trp)	5.560 ± 0.048	0.0109

^a Reportado como la suma de ácido aspártico y asparagina; ^b reportado como suma de ácido glutámico y glutamina.

2. Perfil de aminoácidos de los suplementos proteicos

Composición de aminoácidos de la proteína del suplemento a base de harina de chaya

En la tabla 9 se presenta el contenido de aminoácidos en g aa/100 g de proteína presente en suplemento proteico a base de harina de chaya, mismo que incluye la composición de aminoácidos presentes en los insumos empleados para la elaboración del suplemento, en la misma tabla se presenta los requerimientos mínimos de aminoácidos esenciales para el desarrollo de la abeja reportado por De Groot (1953). Los resultados mostraron que el suplemento a base de harina de chaya posee el 70% de los aminoácidos requeridos por la colmena (De Groot, 1953), excepto el caso de la valina, metionina e isoleucina que fueron los aminoácidos que presentaron una menor concentración a lo requerido por las abejas. Aun cuando el suplemento a base de harina presento una concentración inferior en 3 aminoácidos, este puede ser considerado un suplemento de buena calidad, ya que los aminoácidos limitantes pueden ser compensados con aminoácidos provenientes del polen de algunas plantas tal como reporta Corby, *et al.*, 2018.

En la misma tabla se presenta el perfil de aminoácidos de la levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) reportado por Khudiyi, *et al.*, (2018), perfil de aminoácidos de chaya (Sarmiento, *et al.*, 2003) y perfil de aminoácidos del Multivitactive® estos fueron los ingredientes empleados para formular el suplemento proteico a base de harina de chaya. Los perfiles de aminoácidos muestran que los componentes del suplemento le aportan las concentraciones adecuadas para el buen desarrollo de las abejas.

Para los aminoácidos serina, glicina y treonina su concentración fue mayor a lo que se presenta por Khudiyi, *et al.*, 2018 para la levadura de cerveza y Sarmiento, *et al.*, 2003 para el caso de la harina de chaya; ya que estos presentan bajas concentraciones y al mezclar los ingredientes los aminoácidos presentaron una alta concentración, por lo que se considera que los ingredientes puede presentar mayor concentración a los que se reportan.

Tabla 9. Contenido de aminoácidos por 100 g de proteína de los elementos para la formulación del suplemento proteico a base de harina de chaya, comparado con los requerimientos para el buen desarrollo de la colmena reportado por De Groot (1953).

Aminoácidos	Levadura de cerveza <i>S. cerevisiae</i> (Khudiyi, <i>et al.</i> , 2018) (g aa / 100 g)	Chaya (Sarmiento, <i>et al.</i> , 2003) (g aa / 100 g)	Multivitactive® (g aa / 100 mL)	Suplemento proteico a base de harina de chaya (g aa / 100 g).	De Groot 1953 (g aa /100 g)
Ácido Aspártico (Asp)	9.25	2.57	-	6.90	-
Ácido Glutámico (Glu)	16.69	3.16	-	10.10	-
Serina (Ser)	5.54	0.88	-	10.05	-
Histidina (His)	2.93	0.58	0.6	4.46	1.5
Glicina (Gly)	4.41	0.12		12.79	-
Treonina (Thr)	-	0.105	0.2	6.42	3.0
Arginina (Arg)	7.03	1.152	1.0	9.76	3.0
Alanina (Ala)	6.08	1.5	-	5.52	-
Prolina (Pro)	3.37	0.98	-	2.70	-
Tirosina (Tyr)	3.59	0.89	-	6.35	-
Valina (Val)	-	1.5	2.2	2.78	4.0
Metionina (Met)	1.02	0.43	2.0	0.42	1.5

Continuación de la **tabla 9**.

Aminoácidos	Levadura de cerveza <i>S. cerevisiae</i> (Khudyi, <i>et al.</i> , 2018) (g aa / 100 g)	Chaya (Sarmiento, <i>et al.</i> , 2003) (g aa / 100 g)	Multivitactive® (g aa / 100 mL)	Suplemento proteico a base de harina de chaya (g aa / 100 g).	De Groot 1953 (g aa /100 g)
Cisteína (Cys)	1.85	0.31	-	0.69	-
Isoleucina (Ile)	4.12	1.09	0.8	1.30	4.0
Leucina (Leu)	8.71	1.92	1.2	6.54	4.5
Fenilalanina (Phe) ⁶⁵	5.52	1.38	1.0	7.97	2.5
Lisina (Lys)	7.62	1.27	5.0	3.54	3.0
Triptófano (Trp)	-	0.49	0.6	1.30	1.0

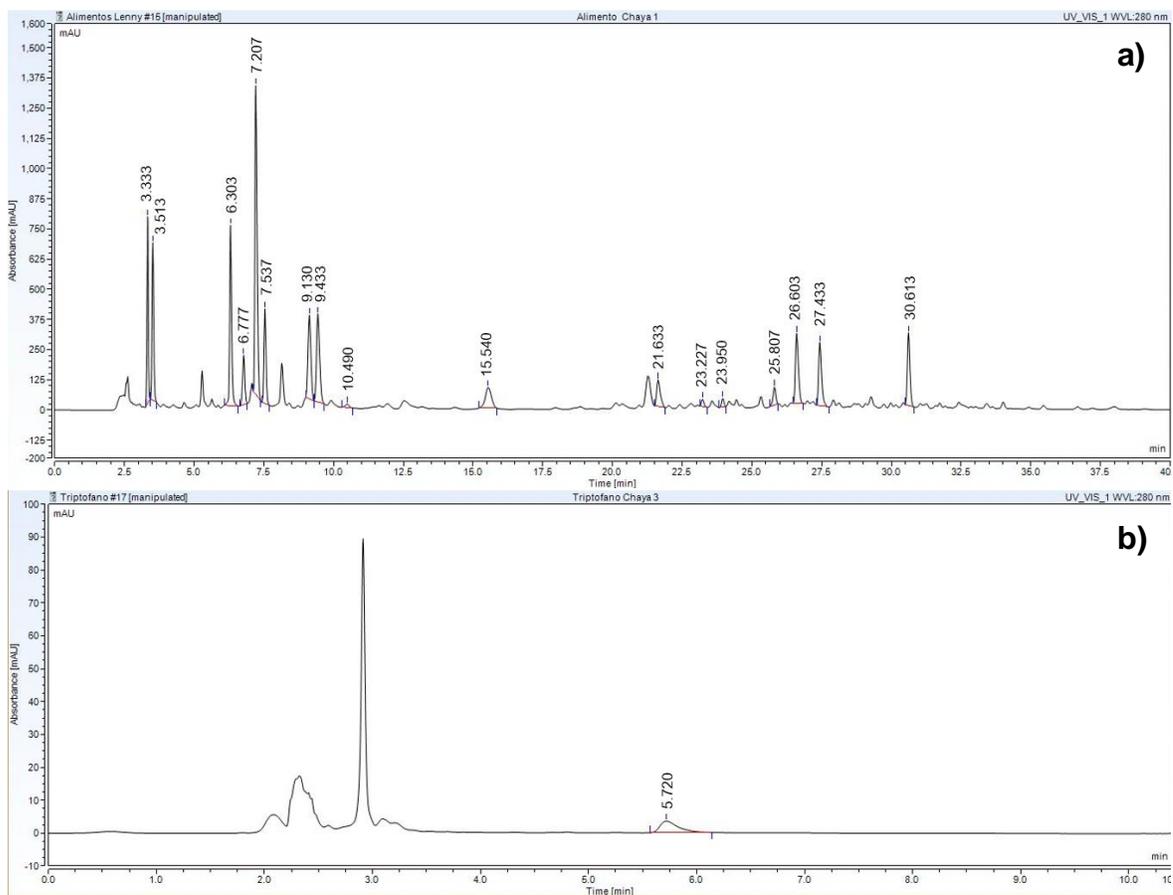


Figura 5. Cromatogramas correspondientes análisis por RP-HPLC del suplemento proteico a base de harina de Chaya: **a)** hidrolisis o ácido; **b)** hidrolisis básico (para la detección del triptófano).

En la figura 5a se observa el perfil cromatográfico del suplemento a base de harina de chaya, con sus respectivos tiempos de retención: Asp (3.333 ± 0.125), Glu (3.513 ± 0.089), Ser (6.303 ± 0.219), His (6.777 ± 0.221), Gly (7.207 ± 0.233), Thr (7.537 ± 0.244), Arg (9.130 ± 0.348), Ala (9.433 ± 0.301), Pro (10.490 ± 0.424), Tyr (15.540 ± 0.417), Val (21.633 ± 0.139), Met (23.227 ± 0.089), Cys (23.950 ± 0.033), Ile (25.807 ± 0.052), Leu (26.603 ± 0.045), Phe (27.433 ± 0.021) y Lys (30.613 ± 0.094), en figura 5b se puede observar al Trp (5.720 ± 0.157).

Composición de aminoácidos de la proteína del suplemento comercial Ultra Bee®

En la tabla 10 se presenta el contenido de aminoácidos en g aa/100 g de proteína que presentó el suplemento proteico comercial Ultra Bee®. Se puede observar la deficiencia en concentración de los aminoácidos: valina, metionina, isoleucina, leucina y triptófano que son los aminoácidos esenciales para el buen desarrollo de abeja (De Groot, 1953). Por otro lado, al comparar el perfil de aminoácidos del Ultra Bee® con el de harina de chaya, ese último presenta una mayor cantidad y concentraciones de aminoácidos esenciales.

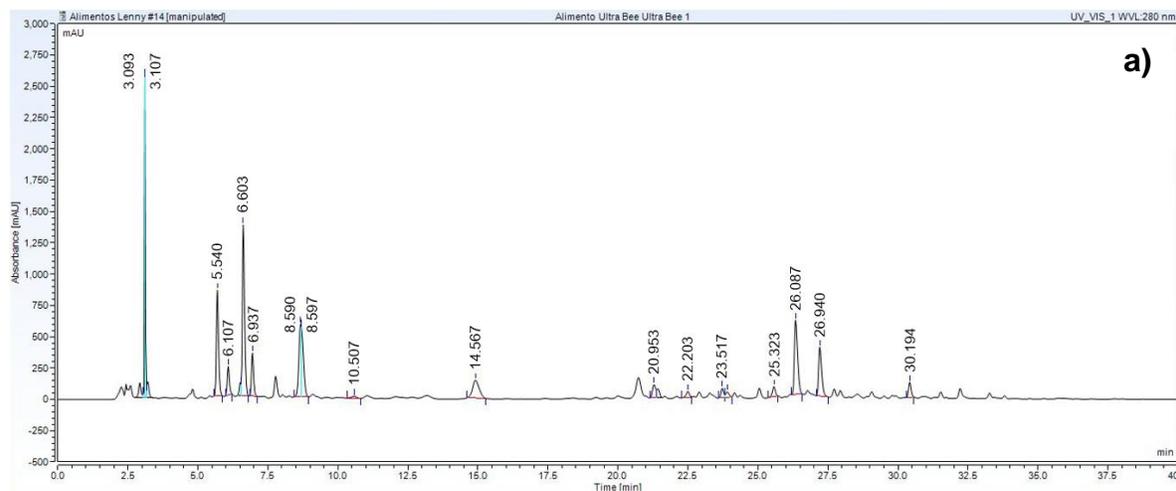
Tabla 10. Contenido de aminoácidos por 100 g de proteína en el suplemento proteico comercial Ultra Bee®, comparado con requerimientos para un desarrollo de la colmena por De Groot (1953).

Aminoácidos	g aa/ 100 g proteína	Groot (g por 16g N)
Ácido Aspártico (Asp)	5.538 ± 0.172	-
Ácido Glutámico (Glu)	10.418 ± 1.100	-
Serina (Ser)	9.732 ± 0.144	-
Histidina (His)	3.586 ± 0.058	1.5
Glicina (Gly)	10.755 ± 0.211	-
Treonina (Thr)	4.185 ± 0.139	3.0
Arginina (Arg)	10.224 ± 0.469	3.0
Alanina (Ala)	4.795 ± 0.185	-
Prolina (Pro)	2.742 ± 0.360	-
Tirosina (Tyr)	8.087 ± 0.152	-
Valina (Val)	1.692 ± 0.024	4.0
Metionina (Met)	0.936 ± 0.049	1.5
Cisteína (Cys)	1.195 ± 0.088	-
Isoleucina (Ile)	1.292 ± 0.069	4.0
Leucina (Leu)	11.257 ± 0.240	4.5
Fenilalanina (Phe)	9.390 ± 0.163	2.5

Continuación de la **tabla 10**

Aminoácidos	g aa/ 100 g proteína	Groot (g por 16g N)
Lisina (Lys)	0.997 ± 0.023	3.0
Triptófano (Trp)	0.927 ± 0.030	1.0

En la figura 6a se observa el perfil cromatográfico del suplemento comercial Ultra Bee®, con sus respectivos tiempos de retención: Asp (3.093 ± 0.007), Glu (3.107 ± 0.002), Ser (5.540 ± 0.106), His (6.107 ± 0.016), Gly (6.603 ± 0.009), Thr (6.937 ± 0.002), Arg (8.590 ± 0.054), Ala (8.597 ± 0.065), Pro (10.507 ± 0.051), Tyr (14.567 ± 0.240), Val (20.953 ± 0.233), Met (22.203 ± 0.205), Cys (23.517 ± 0.143), Ile (25.323 ± 0.172), Leu (26.087 ± 0.181), Phe (26.940 ± 0.188) y Lys (30.194 ± 0.158), en figura 6b se puede observar el Trp (5.667 ± 0.030).



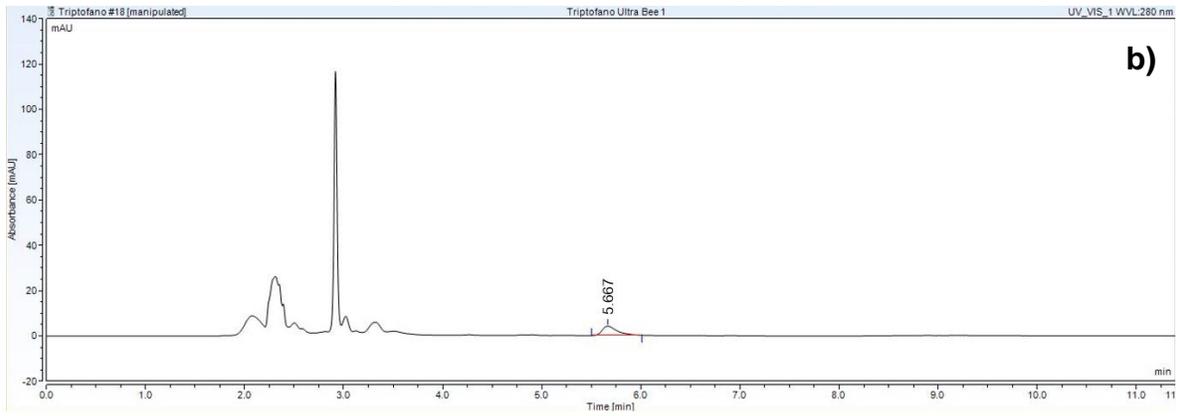


Figura 6. Cromatogramas correspondientes análisis por RP-HPLC del suplemento proteico comercial Ultra Bee®: a) hidrólisis ácida; b) hidrólisis básica (para la detección del triptófano).

Composición de aminoácidos de la proteína del suplemento comercial Nutra®

En la tabla 11 se presenta el contenido de aminoácidos en g aa/100 g de proteína que presentó el suplemento proteico comercial a Nutra®. Se puede observar la deficiencia de la concentración de los aminoácidos: valina, metionina, isoleucina y triptófano que son esenciales para el buen desarrollo de la abeja (De Groot, 1953). Por lo tanto, al comparar el perfil del Nutra® y el suplemento a base de harina de chaya, este último presenta la mayor cantidad de concentración de aminoácidos esenciales.

Tabla 11. Contenido de aminoácidos por 100 g de proteína en el suplemento comercial Nutra®, comparado con requerimientos para un desarrollo de la colmena por De Groot (1953).

Aminoácidos	g aa/ 100 g proteína	Groot (g por 16g N)
Ácido Aspártico (Asp)	9.430 ± 0.169	-
Ácido Glutámico (Glu)	14.488 ± 1.515	-
Serina (Ser)	8.894 ± 0.545	-
Histidina (His)	2.321 ± 0.057	1.5
Glicina (Gly)	5.843 ± 0.614	-
Treonina (Thr)	6.177 ± 0.252	3.0
Arginina (Arg)	8.985 ± 0.567	3.0
Alanina (Ala)	6.516 ± 0.772	-
Prolina (Pro)	1.076 ± 0.027	-
Tirosina (Tyr)	3.692 ± 0.268	-
Valina (Val)	3.785 ± 0.050	4.0
Metionina (Met)	1.114 ± 0.131	1.5
Cisteína (Cys)	0.531 ± 0.020	-
Isoleucina (Ile)	3.273 ± 0.107	4.0
Leucina (Leu)	8.445 ± 0.452	4.5
Fenilalanina (Phe)	4.745 ± 0.233	2.5
Lisina (Lys)	5.902 ± 0.233	3.0
Triptófano (Trp)	0.656 ± 0.067	1.0

En la figura 7a se observa el perfil cromatográfico para el suplemento comercial Nutra®, con sus respectivos tiempos de retención: Asp (3.047 ± 0.103), Glu (3.129 ± 0.084), Ser (5.750 ± 0.188), His (6.243 ± 0.214), Gly (6.277 ± 0.200), Thr (7.010 ± 0.219), Arg (8.647 ± 0.282), Ala (8.647 ± 0.282), Pro (9.893 ± 0.364), Tyr (14.437 ± 0.394), Val (20.920 ± 0.395), Met (22.147 ± 0.323), Cys (23.480 ± 0.240), Ile (25.260 ± 0.301), Leu (23.030 ± 0.282), Phe (26.843 ± 0.256) y Lys (30.160 ± 0.263), en la figura 7b se puede observar el Trp (5.593 ± 0.115).

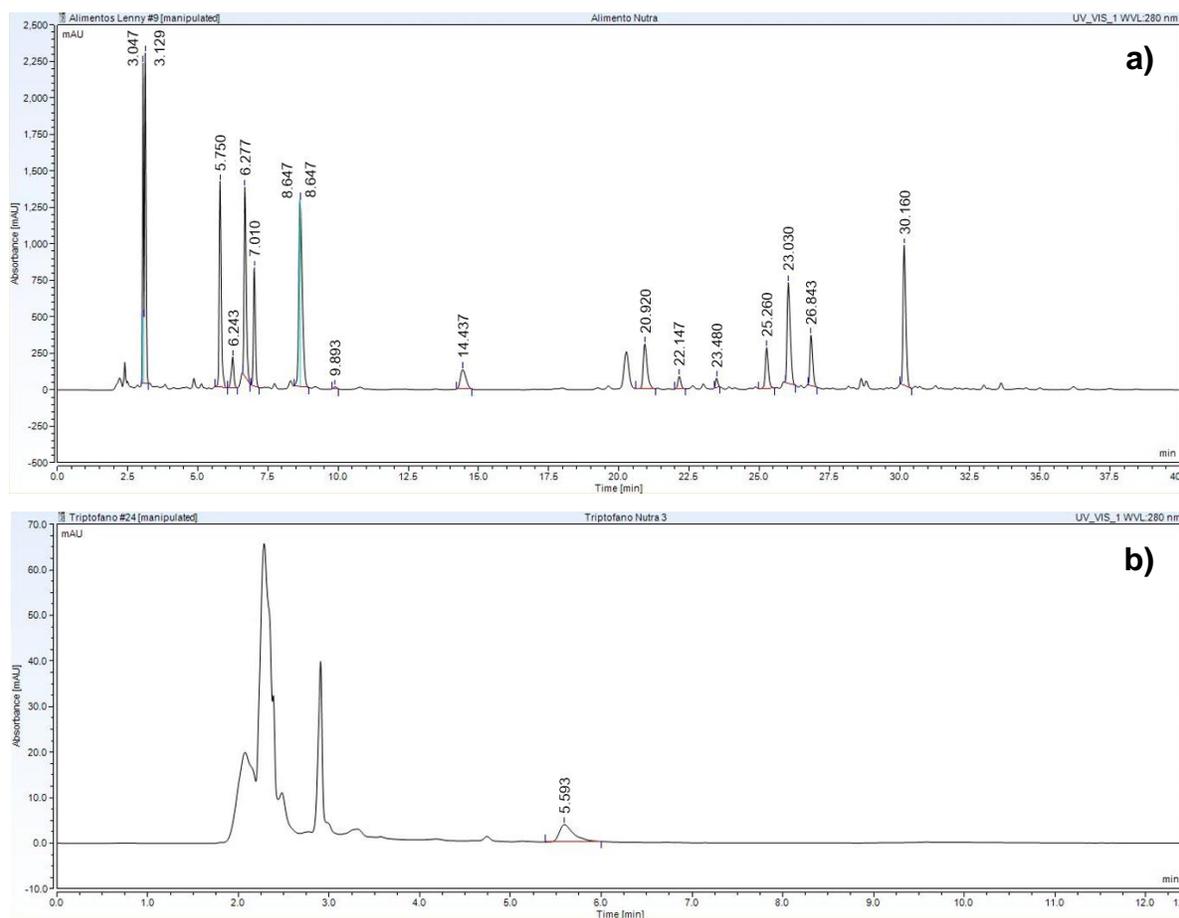


Figura 7. Cromatogramas correspondientes análisis por RP-HPLC del suplemento proteico comercial Nutra®: **a)** hidrólisis ácida; **b)** hidrólisis básica (para la detección del triptófano).

Con los resultados obtenidos del análisis del perfil de aminoácidos del suplemento a base de harina de chaya se puede observar una alta concentración de 7 de los 10 aminoácidos esenciales para el buen desarrollo de las abejas. Por lo que, este suplemento pudiese afectar de manera positiva el desarrollo fisiológico y biológico de las abejas en la etapa larval (Haydak, 1970). El suplemento a base de harina de chaya presentó bajas concentraciones de los aminoácidos metionina, isoleucina y valina, los cuales también son importantes para el buen desarrollo de la colmena, (Brodschneider, *et al.*, 2010) no obstante, estas bajas concentraciones de aminoácidos pueden ser compensadas por las abejas por medio de polen.

Además, el suplemento a base de harina de chaya presenta una alta concentración de los aminoácidos histidina, prolina y tirosina, y la deficiencia de la metionina los cuales permiten el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas. Es importante mencionar que para evaluar la calidad de un suplemento se debe considerar no solo la presencia de aminoácidos si no también otros compuestos como: los ácidos palmitoleico, margárico y linoleico (Corby, *et al.*, 2018). Los tres suplementos proteicos evaluados presentan deficiencia de los aminoácidos metionina, valina e isoleucina.

Por otro lado, Omar *et al.*, (2017) reportan que la alta concentración de aminoácidos fenilalanina y arginina son los que estimulan el crecimiento de las glándulas hipofaríngeas en las abejas nodrizas. Este requisito nutrimental lo cumple el suplemento a base de harina de chaya la cual presenta una concentración 3.2 veces mayor que la requerida para estos aminoácidos.

6. Evaluación del consumo de suplementos proteicos en la colmena.

Los resultados del consumo semanal de los suplementos a base de harina de chaya (B), Ultra Bee® (C) y Nutra® (D) se muestra en la tabla 12. Al realizar el análisis estadístico se pudo observar que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en el consumo del suplemento a base de chaya (65.64 g) y Nutra® (64.72 g). Mientras que el suplemento Ultra Bee® fue el que presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los suplementos anteriores, alcanzando un promedio de consumo de 89.83 g. Esto indica que el suplemento proteico comercial Ultra Bee® fue el que presentó

mayor palatabilidad en las abejas, seguida por el suplemento a base de chaya (Anexo 7).

Tabla 12. Consumo semanal de suplementos proteicos (g).

Semana	Suplementos proteicos		
	Harina de chaya (g)	Ultra Bee® (g)	Nutra® (g)
1	47.22	53.55	30.85
2	56.95	81.22	57.52
3	65.50	90.45	62.72
4	56.35	96.95	56.15
5	95.12	43.42	103.62
6	72.72	119.4	77.50
Promedio	65.64	89.83	64.72

Estos resultados son comparables a los obtenidos por Marrufo *et al.*, (2010) donde las dietas sólidas evaluadas a base de harina de chaya y soya durante 42 días presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). Por lado, el tamaño de partícula de la harina de chaya fue de 100 μm , de acuerdo con Avilez y Araneda (2007), que aquellos ingredientes con una menor granulometría demuestran ser mejor consumidos por las abejas, pues ellas son capaces de manipular con sus mandíbulas que miden entre 0.5 a 100 μm ; en este sentido, a la harina de chaya empleada en este experimento se le realizó un tamizaje con una malla de 50 μm . Por lo que se concluye, el suplemento a base de harina de chaya tiene la misma aceptación en las abejas que los alimentos comerciales evaluados (Anexo 8).

7. Evaluación del desarrollo del área de cría

1. Desarrollo de área de cría cerrada

Se estableció que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos Control (A), Chaya (B), Ultra Bee® (C) y Nutra® (D), en relación al desarrollo de área de cría cerrada de las colmenas ($p > 0.05$). Todos los tratamientos presentaron un comportamiento creciente en relación con el tiempo, las colonias de control fue la que presentó un crecimiento gradual con el tiempo. Por otro lado, el desarrollo de área de cría cerrada de los tratamientos con suplementos proteicos presentó un comportamiento creciente a los 30 días, así como una diferencia significativa ($p < 0.05$)

con el control para el mismo tiempo. A los 38 días, los tratamientos de suplementos proteicos presentaron un decremento, aunque este no significativo con respecto al control (Tabla 13). En el anexo 9 se presenta la gráfica del área de cría de cada uno de los suplementos en las tres mediciones.

Tabla 13. Área de cría cerrada (cm²) en desarrollo de área de cría de abejas *Apis mellifera* alimentadas con suplementos proteicos en condiciones de campo.

Días	Suplementos proteicos			
	Control*	Harina de Chaya	Ultra Bee®	Nutra®
1	198.61 ± 33.40	208.63 ± 30.92	151.17 ± 35.43	242.08 ± 36.59
30	230.78 ± 27.27	297.29 ± 25.87	304.77 ± 24.30	340.05 ± 30.21
38	278.12 ± 24.30	275.34 ± 23.62	250 ± 22.99	255.43 ± 29.55

* Control es jarabe de azúcar

Marrufo *et al.*, (2010), evaluaron el desarrollo de área de cría en colonias de abejas *Apis mellifera* alimentadas con jugo de chaya, harina de chaya, harina de soya y jarabe de azúcar reportando que no presentó una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los tratamientos, pero el desarrollo de área de cría fue menor para el tratamiento alimentado con jarabe de azúcar. Aunado a Olivos (2010) en su trabajo de evaluación de suplementos para abejas no observó una diferencia significativa entre los tratamientos y el control. Los autores antes mencionados señalan, que las colonias alimentadas con suplementos de polen, mantienen por lo general niveles más altos de postura, en comparación con suplementos energéticos.

2. Evaluación desarrollo de área de cría abierta

Los resultados indicaron que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los tratamientos, no obstante, estos mostraron un comportamiento diferente con respecto al tiempo. Los tratamientos control y chaya presentaron un crecimiento progresivo del área de cría abierta con respecto del tiempo, sin presentar diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ambos tratamientos. Donde a los 30 días el tratamiento chaya fue el que presentó un mayor desarrollo de área de cría, aunque esta no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$). A los 38 días hubo un incremento en el área de cría abierta en

todos los tratamientos, sin presentar una diferencia significativa ($p>0.05$). Es importante mencionar que no existen reportes de estudios de cría abierta con suplementos a base de harina de chaya (Tabla 14). En el anexo 10 se presenta la gráfica del área de cría de cada uno de los suplementos en las tres mediciones.

Tabla 14. Área de cría abierta (cm^2) en desarrollo abejas *Apis mellifera* alimentadas con suplementos proteicos en condiciones de campo.

Días	Suplementos proteicos			
	Control*	Harina de Chaya	Ultra Bee®	Nutra®
1	156.25 ± 28.23	161.07 ± 25.53	220.13 ± 28.23	196.25 ± 30.92
30	186.77 ± 23.49	217.99 ± 20.85	184.75 ± 20.54	157.06 ± 24.97
38	231.07 ± 19.96	228.84 ± 19.18	236.55 ± 20.85	241.87 ± 26.78

* Control es jarabe de azúcar

Avilez y Araneda (2007) evaluaron alimentos energéticos y proteicos en abejas *Apis mellifera* para comparar el nivel de postura (larva/ cm^2), los autores no encontraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p>0.05$) para ambos períodos. Solignac *et al.* (2014) evaluaron suplementos proteicos en colmenas de *Apis mellifera*. Estos autores observaron que no hubo presenta una diferencia significativa en la cantidad de bastidores cubiertos por abejas ($p=0.6382$); tampoco en la cantidad de bastidores con crías ($p=0.2878$).

8. Evaluación del contenido proteico de la hemolinfa

La hemolinfa tuvo un comportamiento creciente con respecto al tiempo, aunque esta no presentó una diferencia significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos. A los 29 días, el contenido proteico de la hemolinfa mostró un decremento promedio, aunque este no presenta diferencia significativa ($p>0.05$) con los diferentes tratamientos.

A los 48 días, se observó un incremento de cuatro veces en la concentración proteica de la hemolinfa para todos los tratamientos. Los valores altos sobre la concentración proteica fueron presentados por el tratamiento control y el suplemento a base de harina de chaya con 2.05 y 2.13 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Seguidamente por Ultra Bee® con

1.88 µg/mL y el Nutra® 1.85 µg/mL, entre los tratamientos no se presentó una diferencia significativa ($p > 0.05$). (Tabla 15).

Tabla 15. Contenido proteico (µg/mL) en la hemolinfa de las abejas nodrizas *Apis mellifera* alimentadas con suplementos proteicos en condiciones de campo.

Días	Suplementos proteicos			
	Control*	Harina de Chaya	Ultra Bee®	Nutra®
1	0.21 ± 0.29	0.38 ± 0.33	0.41 ± 0.41	0.47 ± 0.29
29	0.36 ± 0.29	0.37 ± 0.33	0.45 ± 0.33	0.49 ± 0.29
48	2.05 ± 0.29	2.13 ± 0.29	1.88 ± 0.29	1.85 ± 0.33

* Control es jarabe de azúcar

Estos resultados son comparables con lo reportado por Morais, *et al.* (2013) donde evaluaron el contenido de proteína de la hemolinfa de abejas de un día de nacidas (18-21 µg/µL aproximadamente) y después de los siete días de ser alimentadas el contenido de proteína se incrementan en ~37-49 µg/µL. Además, compararon la producción de proteína en dos genotipos de abejas africanas y europeas, donde las europeas son las que producen menor contenido de proteína en la hemolinfa. El trabajo de Cappalari, *et al.*, (2009) confirma lo antes mencionado, reportando que las abejas africanas desarrollaron niveles de proteína más alto en la hemolinfa que las abejas europeas alimentadas con la misma dieta.

Frias, *et al.*, (2016) reportó que los suplementos que contienen una buena calidad de polen y cantidad de proteína influyen en la fisiología y sobrevivencia de las abejas. Además de la cantidad de proteína en el suplemento, otros factores pueden influenciar el efecto del suplemento, de la misma manera considerando el número de abejas dentro de la colmena (Bitioli y Chaud Netto, 1992) y de los nutrientes esenciales (Stace y White, 1994).

9. Evaluación del efecto de los suplementos proteicos sobre la vitelogenina mediante la detección por SDS -PAGE

En la figura 8 se observa el perfil proteico de la hemolinfa previo a la alimentación de las colmenas con los suplementos a base de chaya, Nutra® y Ultra Bee®. En todos los casos se detecta la presencia de la Vitelogenina (180 kDa). Con respecto al patrón de bandeo mostrado por los grupos de estudio, se observa que todos los grupos tienen un aproximado de 16 bandas de proteína con pesos moleculares comprendido entre 15 a 300 kDa. Tres bandas con pesos moleculares de 40, 70 y 180 (esta última correspondiente a la vitelogenina) kDa se mostraron similares en intensidad de banda en todos los tratamientos. La similitud de los perfiles proteicos y de la banda correspondiente a la vitelogenina de los diferentes grupos de abejas previo a la alimentación con los suplementos, asegurando que las colmenas se encuentren en las mismas condiciones de nutrición.

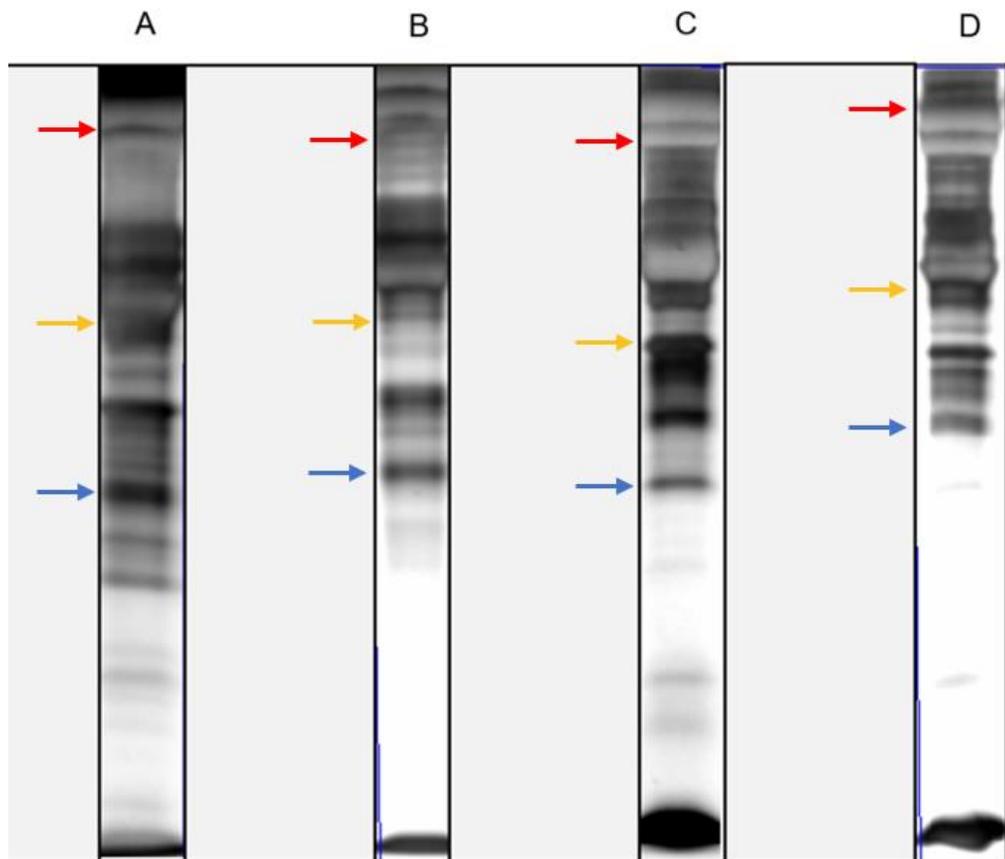


Figura 8. Perfil proteico de la hemolinfa antes de iniciar el experimento en las diferentes colmenas: A el control, B suplemento a base de Chaya, C Ultra Bee® y D Nutra® determinado por el método SDS-PAGE.

* Rojo (180 kDa), Amarillo (70 kDa), Azul(40 kDa)

En la figura 9 se muestra el efecto de los suplementos en la producción de vitelogenina a los 29 días de iniciar con el tratamiento. El análisis electroforético muestra que la banda proteica correspondiente a la vitelogenina está presente en el control y en los tres tratamientos. Además, se puede observar que las colmenas alimentadas con el suplemento a base de chaya y Ultra Bee® mostraron una similitud en intensidad de esta banda. Es importante mencionar que las colmenas alimentadas con el suplemento Nutra® presentaron niveles inferiores de intensidad en la banda correspondiente a la vitelogenina.

Con respecto al patrón de bandeo proteico presentado por las colmenas alimentadas con los suplementos fue diferente al control, las colmenas alimentadas con suplemento a base de harina de chaya y Ultra Bee® presentaron un mayor número de bandas, se puede asumir que los suplementos tienen un efecto positivo en la producción de las proteínas de la hemolinfa de las abejas.

Por otro lado, al comparar los perfiles proteicos de cada uno de los tratamientos con respecto al tiempo, se observó que los tratamientos con los suplementos a base de harina de chaya y Ultra Bee® mantienen sus perfiles, estos resultados podrían relacionarse con la buena salud y desarrollo de la colmena (Rocha *et al.*, 2003).

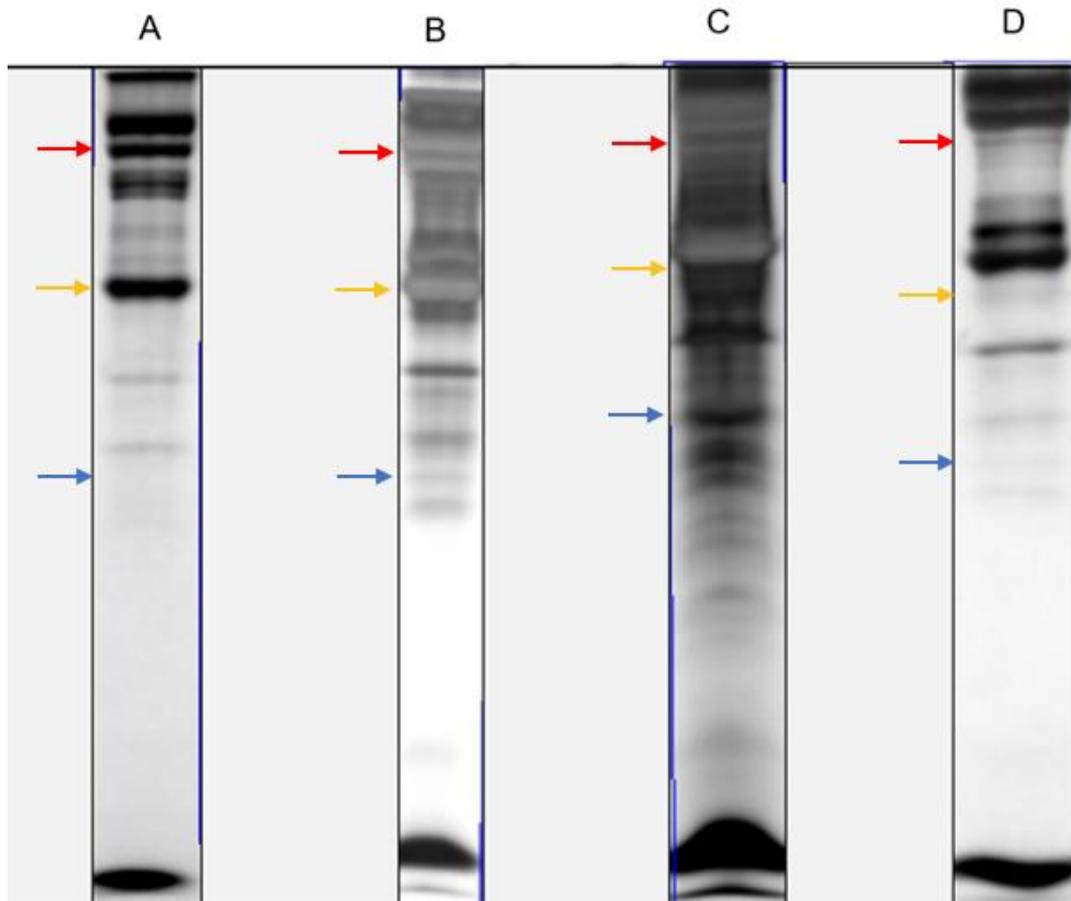


Figura 9. Perfil proteico de la hemolinfa de 29 días después de iniciar la aplicación de los suplementos: A el control, B suplemento a base de chaya, C Ultra Bee® y D Nutra® determinado por el método SDS-PAGE.

* Rojo (180 kDa), Amarillo (70 kDa), Azul(40 kDa)

Posterior a los 48 días, de iniciar con los tratamientos se pudo observar la presencia de la banda de 180 kDa correspondiente a la vitelogenina (Figura 9). El suplemento a base de harina de chaya mostró un perfil proteico similar al número de bandas del control, con pesos moleculares comprendidos en el rango de 40-280 kDa y se observó mayor número de bandas en los dos suplementos comerciales. Por otro lado, la banda de 180 kDa correspondiente a la vitelogenina en el tratamiento a base de harina de chaya mostró una intensidad similar al control y superior a los dos suplementos comerciales. Indicando que el suplemento a base de harina de chaya tiene un efecto positivo en el desarrollo y salud de la colmena

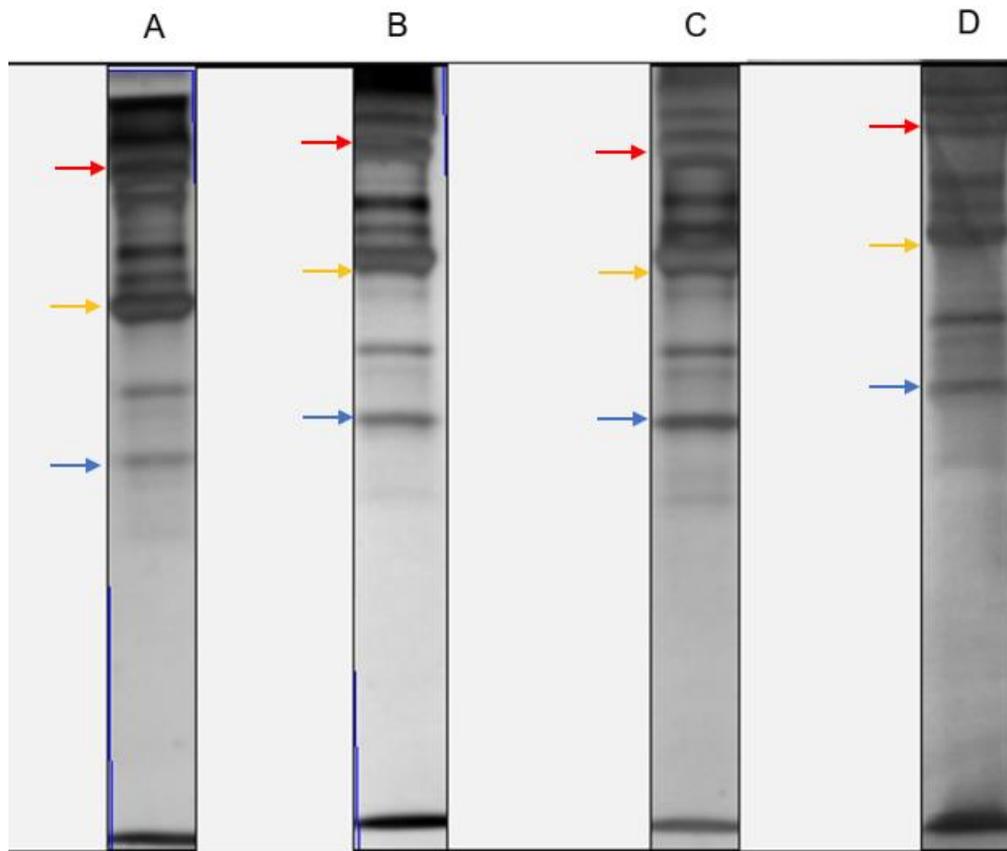


Figura 10. Perfil proteico de la hemolinfa a los 49 días de la aplicación de los suplementos: A el control, B suplemento a base de Chaya, C Ultra Bee® y D Nutra® determinado por el método SDS-PAGE.

* Rojo (180 kDa), Amarillo (70 kDa), Azul(40 kDa)

Es importante mencionar que el número de bandas presentadas en los perfiles de todos los tratamientos fue disminuyendo con respecto al tiempo. Estos resultados son comparables a los reportados por Rocha *et al.*, (2003), donde obtuvieron perfiles similares en hemolinfa de abejas recién emergidas hasta alcanzar los 12 días de nacidas, observaron que el perfil proteico que corresponde a los siete días de nacidas se presenta un alto número de bandas que corresponde a proteínas que van de 70-300 kDa. Y concluyeron que cuando las abejas tienen más edad, los niveles de concentración y número de proteínas en su hemolinfa van disminuyendo, manteniéndose las proteínas de 100 – 300 kDa y desapareciendo las proteínas de menor peso molecular.

VIII. CONCLUSIONES

El suplemento proteico a base de harina de *Cnidocolus chayamansa* cuenta con los requerimientos nutricionales para el buen desarrollo fisiológico de las abejas, siendo estos valores comparables con los presentados por el suplemento Ultra Bee®.

El perfil de aminoácidos del suplemento proteico a base de harina de chaya presenta los aminoácidos requeridos por las abejas para su buen desarrollo fisiológico. Confirmando la buena calidad proteica que presenta el suplemento.

La palatabilidad del suplemento a base de harina de chaya fue alta para las abejas, siendo similar al presentado en el consumo del Nutra®.

El suplemento a base de chaya resultó ser un alimento de buena calidad proteica, mostrando perfiles proteicos similares a los suplementos comerciales como el Ultra Bee®

La postura de la reina no se vio afectada en ninguno de los tratamientos aplicados, mostrando un aumento de la población con respecto al tiempo en el control y los tratamientos.

La presencia de la proteína vitelogenina en la hemolinfa de las abejas alimentadas con el suplemento a base de harina de chaya presentó una similitud con el control.

El suplemento a base de harina de chaya puede ser considerado como una alternativa en la alimentación artificial, siendo económica, importante y viable para el sector apícola de la región de la península de Yucatán.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Alaiz, M., Navarro, J.L., Girón, J. y Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethylethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, 591,181-186.
2. AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th Ed. Association of Official Agricultural Chemistry. Washington, D.C., USA. 500 pp.
3. Argüello, O. (2010). Módulo IV: Nutrición de las abejas y apicultura migratoria. León, Nicaragua. 2-37.
4. Avilez, J. y Araneda, X. (2007). Estimulación de la puesta en abejas (*Apis mellifera*). *Archivos de Zootecnia*.56 (216): 885-893.
5. Banco Interamericano de Desarrollo "BID". (2010). Guía Práctica Sobre Manejo Técnico de la Colmena. Recuperado de <http://teca.fao.org/sites/default/files/resources/manejocolmenas.pdf>
6. Bitioli, J. y Chaud, J. (1992). Consumption of Food by Workers of *Apis mellifera* Confined with and without a Queen. In: Brazilian Meeting on Biology of Social Bees and other Insects, *Naturalia*, 253.
7. Bitondi, M. y Simoes, Z. (1996). The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titers in Africanized *Apis mellifera* workers. *Journal of Apicultural Research*. 35:27-36.
8. Brodschneider, R. y Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41, 278-294.
9. Browsers, E. (1982). Measurement of hypopharyngeal gland activity in the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 21 (4): 193-198.
10. Burgos, A. (2012). Comparación de la producción de polen con tres fuentes alternativas de proteínas en la dieta de *Apis mellifera*. (Tesis de pregrado). Universidad central del Ecuador, Quito. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/336/1/T-UCE-0014-3.pdf>
11. Cappelari, F., Turcatto, P., Morais, M. y De Jong D (2009). Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (*Apis mellifera carnica*). *Genetics and Molecular Research*. 8 (4) 1245-1249.

12. Corby, V., Snyder, L., Meador, C. y Ayotte, T. (2018). Honey bee (*Apis mellifera*) nurses do not consume pollens based on their nutritional quality. *PLOS ONE* 13 (1).
13. Corona, M., Velarde, R., Remolina, S., Moran, A., Wang, Y., Hughes, K. y Robinson, G. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling and queen honey bee longevity. *The National Academy of Sciences of the USA*, 104 (17): 7128-7133.
14. Crailsheim, K. (1990). The protein balance of the honey bee worker. *Apiedologie*, 21, 417-429.
15. Crailsheim, K., Schneider, L., Hrasnigg, N., Brosch, U., Gmeinbauer, R. y Schöffmann, B. (1992). Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *J. Insect Physiol.* 38 (6), 409-419.
16. Cremonez, T., De Jong, D. y Bitondi, M. (1998). Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal Econ. Entomol.* 91 (6): 1284-1298.
17. De Groot, A. P. (1953). Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifera* L.). Recuperado de <http://194.47.52.113/janlars/partnerskapalnarp/ekonf/20130516/deGroot1953.pdf>
18. De Groot, P. (1951). Effect of protein containing diet on the longevity of age bees. *Proc. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap.*, Ser. 54(3), 272-274.
19. Duttmann, C., Castillo, G., Lorenzo, J. y Verde, M. (2013). Investigación Intersectorial de la Sanidad Apícola en el Occidente de Nicaragua. No 1, León – Nicaragua: Impresos TESORO.
20. Fluri, P., Sabatini, A., Vecchi, M. y Wille, H. (1982). Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titres in laying and non-laying queen honeybees. *Journal of Apicultural Research* 20(4): 221-225.
21. Franco, V., Echezarreta, C. y Hernández, E. (2010). Respuesta del uso de suplementos de polen sobre los patrones de postura y la productividad en

- colmenas de abejas de *Apis mellifera*. En memorias de la II Reunión mesoamericana de Ciencia Animal 2010 (CD). Pp 71.
22. Frias, B., Barbosa, C. y Lourenço, A. (2016). Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impacto n adult health. *Apidologie*, 47: 15-25.
 23. García, D., Rojas, M. y Sánchez, J. (2006). Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Vol. 11, No. 1, pp: 123-129.
 24. García, S. (2010). Informe sobre la cuantificación de proteínas totales en la hemolinfa de abeja melífera (*Apis mellifera* L.) en época invernal.
 25. Guidugli, L. K. R., Mendes, N.A., Donato, T. E., Dolors, P.M., Hartfelder, K., Gentile, B., M. y Paulino, S. Z. L. (2008). Expression analysis of putative vitellogenin and lipophorin receptors in honey bee (*Apis mellifera* L.) queens and workers. *El sevier*. 54, 1138- 1147.
 26. Hayday, H. (1970). Honey bee nutrition. *Copyright All rights reserved*. 15, 143-156.
 27. Hernández, M. (2008). Evaluación de la respuesta a la alimentación artificial de las abejas (*Apis mellifera*), en la región de la costa del Estado de Oaxaca. (Tesis de pregrado). Universidad del Mar Campus Puerto Escondido, Puerto Escondido, Oaxaca. Recuperado de http://www.umar.mx/tesis_PE/Tesis_Digitales/Hern%20Hern%20Hern%20Mar%20Mar%20Isabel/tesis%20ABEJASfinaly%2022-10-08OK.pdf
 28. Hrassnigg, N. y Crailsheim, C. (1998). The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 44: 393-404.
 29. Huang, Z., Otis, G. y Teal, P. (1989). Nature of brood signal activating the protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera). *Apidologie* 20:455-464.
 30. IICA. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2009). Manual de apicultura básica para Honduras. p 1-67.
 31. Jiménez, J. (2013). Deriva de abejas *Apis mellifera* en colmenas colocadas en línea. (Pregrado). Universidad Autónoma Agraria, Antonio Narro, Unidad Laguna. Torreón, Coahuila.

32. Keller, I., Fluri, P. y Imdorf, A. (2005). Pollen nutrition and colony development in honey bees: Parte II. *Ibra*. 86(2), 27-34.
33. Khudyi, O., Kushniryk, O., Khuda, L. y Marchenko, M. (2018). Differences in nutritional value and amino acid composition of *Moina macrocopa* (Straus) using yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula glutinis* as fodder substrates. *International letters of Natural Sciences*.68: 27-34.
34. Kleinschmidt, G. (1990). The parameters of protein in bee biology. *En Report of the honey research council workshop*. Review of nutrition work in Queensland and New South Wales. Australia, pp 7-12.
35. Kleinschmidt, G (1998). Strategic Planning and Action Meeting for Honeybee Nutrition. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation.
36. Kulinčević, J. y Rothenbuhler, W. (1982). Effect of certain protein sources on brood rearing and length of life in the honey bee under laboratory conditions. *Am. Bee. J.* 123(1):50-53.
37. Mahmood, R., Wagchoure, E.S. y Sarwar, G. (2013). Influence of supplemental diets on *Apis mellifera* L. colonies for honey production. *Honeybee Research Institute, National Agricultural Research Centre, Islamabad, Pakistan*. Vol. 26 No.4, pp. 290-294
38. Marrufo, J., Ortiz, E. y Sarmiento, L. (2006). Desarrollo y crecimiento del área de cría de abejas (*Apis mellifera*) en núcleos langstroht alimentada a base de chaya (*Cnidioscolus aconitifolius*), soya (*Glycine max*) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en época de escasez en el estado de Yucatán, México. Recuperado el 23 de enero del 2012.
39. Massaccesi, C. A. (2002). Apicultura en la Patagonia Andina. Lago pueblo.:1-63.
40. Mccaughey, W., Gilliam, M. y Standifer, L.(1980). Amino acids and protein adequacy for honey bees of pollens from desert plants and other floral sources. *Apidologie* 11: 75-86.
41. Mesa, A. y Gil, J. (2015). Caracterización fisicoquímica y funcional del polen de abeja (*Apis mellifera*) como estrategia para generar valor agregado y

- parámetros de calidad al producto apícola (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
42. Morais M., Turcatto, A., Pereira, R., Francoy, T., Guidugli-Lazzarini, K., Goncalves, L., de Almedia, J., Ellis J. y De Jong D. (2013). Protein levels and colony development of Africanized and European honey bees fed natural and artificial diets. *Genetics and Molecular Research*. 12(4). 6915-6922.
 43. Nelson M., Ihle K., Fondrk M., Page R., Amdam G. (2007). The Gene vitellogenin Has Multiple Coordinating Effects On Social Organization. *PLOS BIOLOGY* 5 (3): 673-677.
 44. Olivos, M. M. (2010). Evaluación de suplementos alimenticios para *Apis mellifera* L. adaptados a la Araunía (pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia. Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2010/fvo.49e/doc/fvo.49e.pdf>
 45. Omar, E., Abd-Ella, A., Khodairy, M., Moosbeckhofer, R., Crailsheim, K. y Brodschneider, R. (2017). Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 48:425-436.
 46. Otis, G. W., Wheeler, D. E., Buck, N. y Mattila, H.R. (2004). Storage proteins in winter honey bees. *APIACATA* (38), 352-357.
 47. Padilla, F., García, A., Flores, J. (2012). Envejecimiento de las abejas: abejas de verano y abejas de invierno. *Apicultura sin fronteras* (N 66). 6-13.
 48. Palacio, M. (2009). ALIMENTACION NATURAL. Recuperado el 2 de octubre del 2014. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3076-File2960-mat-act-san-apicola.pdf>
 49. Palos, M. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante de la chaya (*Cnidoscolus chaya mansa*) en un modelo experimental de diabetes en ratas wistar. Recuperado el 5 de diciembre del 2014. Disponible en <http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/868/1/EvaluacioncapAOx.pdf>
 50. Pérez, G. (2007). Respuesta de colonias *Apis mellifera* m., a 3 sustratos proteicos como promotores de área de cría en periodos de escasez en Yucatán,

- México. En A. Correa (Presidencia), 14° Congreso Internacional de Actualización Apícola. Dirigido la Asociación Nacional de Médicos veterinarios Especialistas en Abejas, A.C. Veracruz.
51. Pernal, S. y Currie, R. (2000). Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 31 387-409.
 52. Piulachs, M.D., Guidugli, K. R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simões, Z.,L. y Bellés, X. (2003). The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 459-465.
 53. Puc, M. (2016). Caracterización nutricional y morfológica de los tipos de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) en cinco comunidades de Quintana Roo, México. (Tesis de pregrado).
 54. Robalino, F. (2012). Efecto de do tipos de alimento y dos tiempos de cosecha en la producción de jalea real. Recuperado 27 de Marzo del 2017. Disponible en <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1085/1/T3359.pdf>
 55. Rocha Estrada, A. (1998). *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaughn como fuente de proteína incorporando en dietas para *Penaeus strlirostris*. Recuperado el 10 de noviembre del 2014. Disponible en <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080087135.PDF>
 56. Rocha, H. C., Rodriguez, R. P. R. y Cuncha, F. S. R. (2003). Protein eletropherogram of haemolumph from *Apis mellifera* L. bees submitted to royal jelly production. *B. Indústr.anim.*, N. Odessa, vol. 60, n. 2, p. 147 -153.
 57. Sarlo, E., Quintana, S., Medici, S., Eguaras, M., Fey, M. (2011). Efecto de la suplementación proteica *Apipromotor*® a distintos de pH sobre los niveles de expresión de vitelogenina y proteínas totales en cuerpo grasos abdominales de *Apis mellifera*. Recuperado el 27 de Agosto del 2016. Disponible en <http://www.colmenassangabriel.cl/INFORME%20EMPRESA%20APIFEY%201.pdf>
 58. Sarmiento, L., Sandoval, C., McNab, J., Quijano, R. y Reyes, R. (2003). Effect of age of regrowth on chemical composition of chaya (*Cnidoscolus aconitifolios*) leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83: 609-612.

59. Silvia, P., Jivan, A. y Harmanescu, M. (2008). Researches regarding the mineral content of pollen and bee bread samples rise from Banats area. Bulletin UASVM
60. Solignac, J., Delpiano, J., Arza, R., Figini, E., Spagnuolo, C., Poffer, D., Rodríguez, G., Basualdo, M. y Fondevila, N. (2014). Evaluación de suplementos proteicos en colonias de *Apis mellifera*. *Memoria técnica*: 153-159.
61. Somerville. (2001). Nutritional value of bee collected pollens. NSW Agriculture: Rural Industries Research and Development Corporation.
62. Stace, P. y White, E. (1994). The use of isoleucine as a supplement feed for honey bees (*Apis mellifera*) in Australia. *Aust. Beekeeper* 96: 159-161.
63. Standifer, L., Macdonald, R. y Levin, M. (1970). Influence of the quality of protein in pollens and of a pollen substitute on the development of hypopharyngeal glands of honey bees. *Annals of the Entomological Society of America* 63 (3): 909-910.
64. Standifer, L., McCaughey, W., Todd, F. y Kemmerer, A. (1960). Relative availability of various proteins to the honey bee. *Annals of the Entomological Society of America*. 53. 618-625.
65. Valega, O. (s/a). ¡Mucho más que proteínas! Función en la colmena. Consultado el 5 de diciembre del 2016. Disponible en <http://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/1168-proteinas-funcion-en-la-colmena>
66. Vidal, M. y Bedascarrasbure, E. (2009). ALIMENTADO A NUESTRAS ABEJAS: SUPLEMENTO PROTEICIA. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3076-File2960-mat-act-san-apicola.pdf>
67. Wheeler, D. E. y Kawooya, J. K. (1990). Purification and Characterization of Honey Bee Vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 14: 253-267.
68. Yust, M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Vioque, J., Millán, F. y Alaiz, M. (2014). Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry* 85, 317-320.

69. Zilio, L. y Rodríguez, G. (2009). Calidad nutricional en colonias de *Apis mellifera*. Recuperado el 2 de octubre del 2014. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3076-File2960-mat-act-san-apicola.pdf>

X. ANEXOS

Anexo 1: Actividades realizadas para obtener la harina de *Cnidoscolus chayamansa*.



Anexo 2: Determinación de humedad

El procedimiento utilizado para la extracción de la humedad es el método por secado de estufa AOAC (1990).

Se pesaron 5 gr de muestra en una charola cuyo peso ya fue anotado, el análisis se realizó por triplicado, es decir, tres replicas. La muestra se sometió a deshidratar en un horno durante 48 horas a una temperatura constante de 80 °C, pasado el tiempo se dejó enfriar la muestra en un temperatura ambiente y se pesó.

La determinación de la humedad en la muestra se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{P_i - P_f}{M} * 100$$

Donde

P_i = Es el peso inicial de la muestra

P_f = Es el peso final de la muestra – el peso de la charla

M = Es la masa en gramos de la muestra.

Anexo 3: Determinación de ceniza

El procedimiento utilizado para la determinación de ceniza es el método de cenizas totales descrita por AOAC (1990), que se describe a continuación:

Se pusieron los crisoles a peso constante en una mufla a 550 °C por 2 horas, y después se pesó en una balanza analítica una vez fríos, y se le pesó 1 g de muestra, para luego ser preincineradas con un mechero de Bunsen tomando como referencia que la muestra dejó de desprender humo, seguidamente se metieron las muestras en una mufla durante 8 horas al alcanzar la temperatura a 550 °C, hasta obtener cenizas blancas o ligeramente grises y homogéneas. Cumplido el tiempo se dejó enfriar y se pesó.

La determinación de ceniza de la muestra se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(P - p)}{M} * 100$$

P = masa del crisol con ceniza en gramos

p = masa de crisol vacío en gramos

M = masa de muestra en gramos

Anexo 4: Determinación de grasa

El procedimiento utilizado para la extracción de grasa es el método de Soxhlet descrita por AOAC (1990), se describe a continuación:

Teniendo la muestra homogeneizada se pesó 5 g de la misma, sobre un papel se envolvió y se colocó en el cartucho de celulosa y se cubrió con algodón, luego el cartucho se depositó en el equipo Soxhlet. Posteriormente el matraz de 250 ml de extracción se puso a un peso constante en un horno a 70°C por 30 minutos, transcurrido el tiempo se dejó enfriar, se tomó con una pinza para no alterar el peso y se pesó el matraz de extracción, se registró el peso y se le agregó 125 ml de hexano. Se conectó el matraz de extracción en el equipo soxhlet y se extrae la muestra con hexano durante 6 horas, calentando el matraz con parrilla a ebullición suave.

Cumplido las 6 horas de extracción se recuperó el solvente antes de que descargue nuevamente en el matraz, se calentó de nuevo el matraz en un calentador colocado en la campaña de extracción para volatizar el solvente y lograr que se quede la grasa. Al terminar se colocó a un horno con una temperatura de 80 ° C por 30 minutos, dejó enfriar y pesó.

La determinación de la grasa de la muestra se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de grasa} = \frac{M_f - M_i}{m} \times 100$$

M_f = Peso final del matraz

M_i = Peso inicio del matraz

m = gramos de muestra

Anexo 5: Determinación de fibra cruda por el método gravimétrico

El procedimiento utilizado para la extracción de la fibra cruda por el método AOAC (1990), que se describe a continuación:

Se utilizó la muestra procedente de la determinación de grasas, que previamente se puso a secar en un horno eléctrico a 103°C durante 12 horas. Para realizar esta técnica fue necesario preparar una solución de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) con 0.255 N (1.25 %) valorada y NaOH (hidróxido de sodio) con 0.313 N (1.25 %) valorada.

Se pesó 1 g de la muestra, seguidamente se colocó la muestra en el matraz, y se agregó 100 ml de H₂SO₄ 0.255 N y pedazos de porcelana, una vez agregado el ácido, se conectó al aparato extractor de fibra cruda y se puso a hervir exactamente durante media hora. Después de retiró el matraz del aparato de fibra cruda y se filtró la muestra digerida al vacío en un matraz quitazato con tela de algodón y embudo Buchner, se lavó el matraz con 3 porciones de 50 ml de agua hirviendo por 6 veces para alcanzar un pH neutro. Se recolecto nuevamente la muestra al matraz, y se agregó 100 ml de NaOH 0.313 N y se regresó al aparato extractor se dejó en ebullición por media hora. Seguidamente se retiró el matraz y se filtró de la misma manera que la anterior. Se lavó con 25 ml de H₂SO₄ 0.255 N hirviendo, con tres porciones de 50 ml de agua hirviendo y con 25 ml de etanol al 95 %. Por último se removió el residuo de la tela de algodón y se transfirió a un crisol a peso constante*, se secó en estufa a 130°C por 2 horas, se dejó enfriar en un desecador y pesó, y se incineran por 45 minutos en una mufla a 550 °C, se dejó enfriar y pesó las cenizas.

*Nota para obtener el peso constante del crisol poner el crisol en mufla a 550 °C por 2 horas dejar enfriar y pesar.

Para la determinación de fibra cruda de la muestra se realizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de fibra cruda} = \frac{\text{Pérdida de peso en incineración}}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

$$\text{Pérdida de peso en incineración} = M1 - M2$$

Dónde:

M1 = Peso inicial del crisol + residuo de la digestión

M2 = Peso final del crisol + residuo incinerado

Anexo 6: Determinación de proteína cruda

El procedimiento utilizado para la extracción de proteína por método de Micro kjeldahl descrita por AOAC (1990), se describe a continuación:

Se pesó 70 mg de la muestra en tubo de ensayo y se le añadió 0.5 g de sulfato de sodio para la digestión, seguidamente se le agregó 3 ml de solución digestora para proteína (sulfato de cobre, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y agua), se colocó al micro digestor Kendal durante 15 minutos al momento de emitir humo, se retiró y se deja enfriar durante 20 minutos para agregar 1.5 ml de peróxido de hidrogeno y se coloca al digestor hasta que la solución sea transparente, y dejar por 20 minutos más en ebullición. Se retiran y se deja enfriar para realizar la destilación. Para destilar la muestra se agregó agua purificada hasta la mitad del matraz del aparato de destilación se agregó 5 ml de agua a la muestra se mueve, se depositó en la parte inferior de la trampa y se dejó caer al matraz, al hervir el agua se le agregó 10 ml de NaOH al 30% donde se colocó la muestra, la solución empezó a evaporarse y se recuperó 20 ml en un vaso precipitado con 5 ml de ácido bórico y 5 gotas del indicador tashiro, se verifico que la punta del destilador se encuentre sumergida dentro de la solución. Se valoró con HCl 0.1 N hasta el viraje del color (verde → morado).

Para la determinación de proteína cruda se realizó la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{14 * MHCl * mLHCl}{g (muestra) * 1000} * 100$$

Donde:

14 (g/mol) = Peso atómico del Nitrógeno (N)

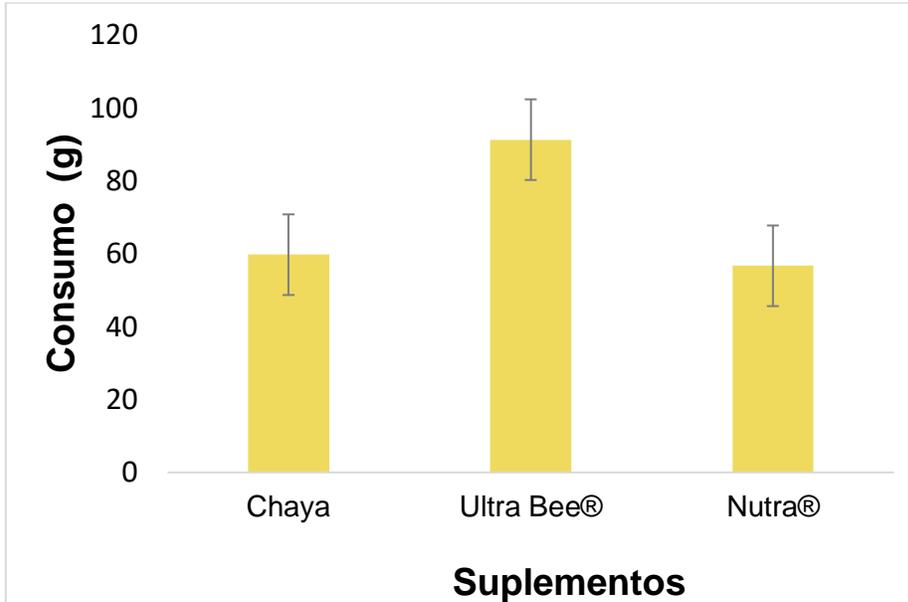
M (mol /L) = Es la concentración del ácido HCl utilizado en la titulación final

mL (ml) = Es la cantidad de ml utilizada en la titulación final

g (g) = Es la cantidad de muestra utilizada inicial

1000 = Factor de conversión ml/L

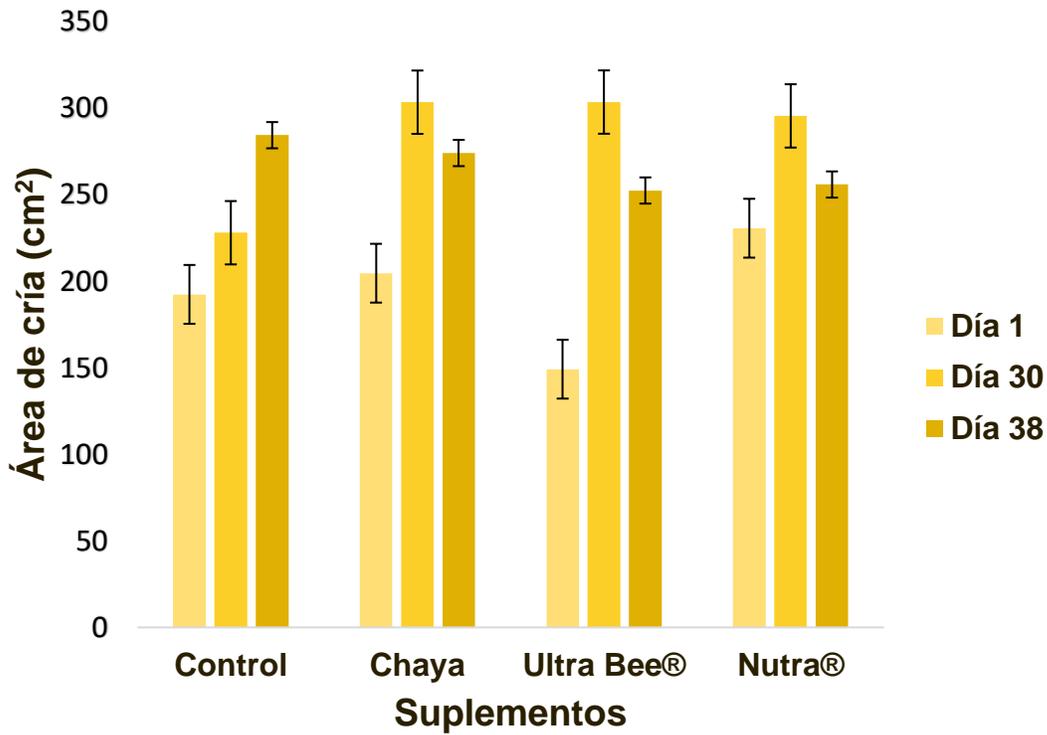
Anexo 7. Grafica de consumo de suplemento proteico durante seis semanas



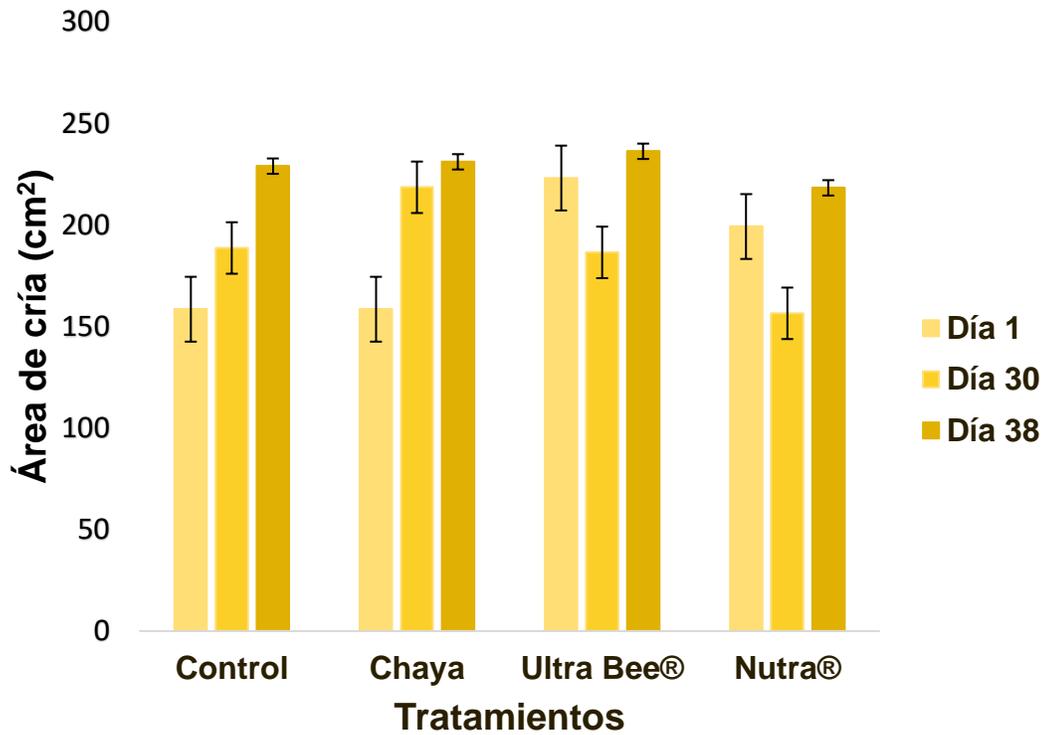
Anexo 8. Fotografía del consumo de los suplementos proteicos empleados



Anexo 9. Gráfica del área de cría cerrada



Anexo 10. Gráfica de área de cría abierta



Anexo 11. Analisis de Varianza del desarrollo de área de cría abierta.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: alimento	3.51	3	1.17	8.7	0.0009
B: colmena	2.01	3	671130	4.99	0.0108
C: tiempo	9.23	2	4.62	34.31	0
INTERACCIONES					
AB	6.04	9	671331	4.99	0.0018
AC	1.44	6	239704	1.78	0.1597
BC	1.01	6	167731	1.25	0.3295
RESIDUOS	2.42	18	134548		
TOTAL (CORREGIDO)	2.57	47			

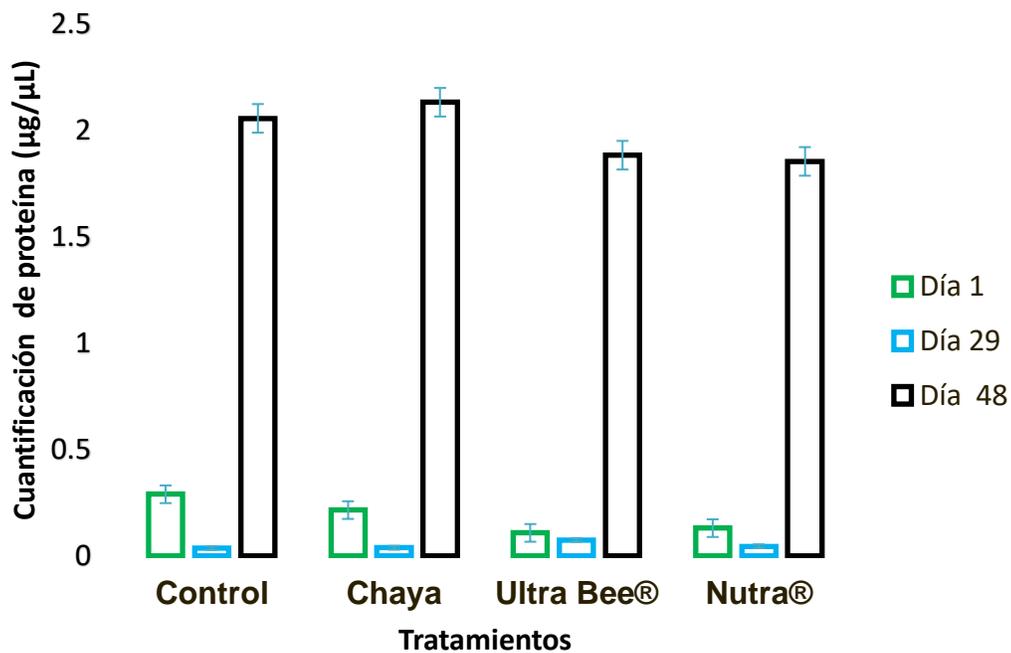
Anexo 12. Analisis de Varianza de desarrollo del área de cría cerrada.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: alimento	2.03E+06	3	677310	2.08	0.1381
B: colmena	7.87E+06	3	2.62E+06	8.07	0.0013
C: tiempo	1.65E+07	2	8.27E+06	25.44	0
INTERACCIONES					
AB	9.05E+06	9	1.01E+06	3.09	0.0198
AC	3.52E+06	6	586622	1.81	0.1547
BC	1.04E+06	6	173792	0.53	0.7749
RESIDUOS	5.85E+06	18	324966		
TOTAL (CORREGIDO)	4.59E+07	47			

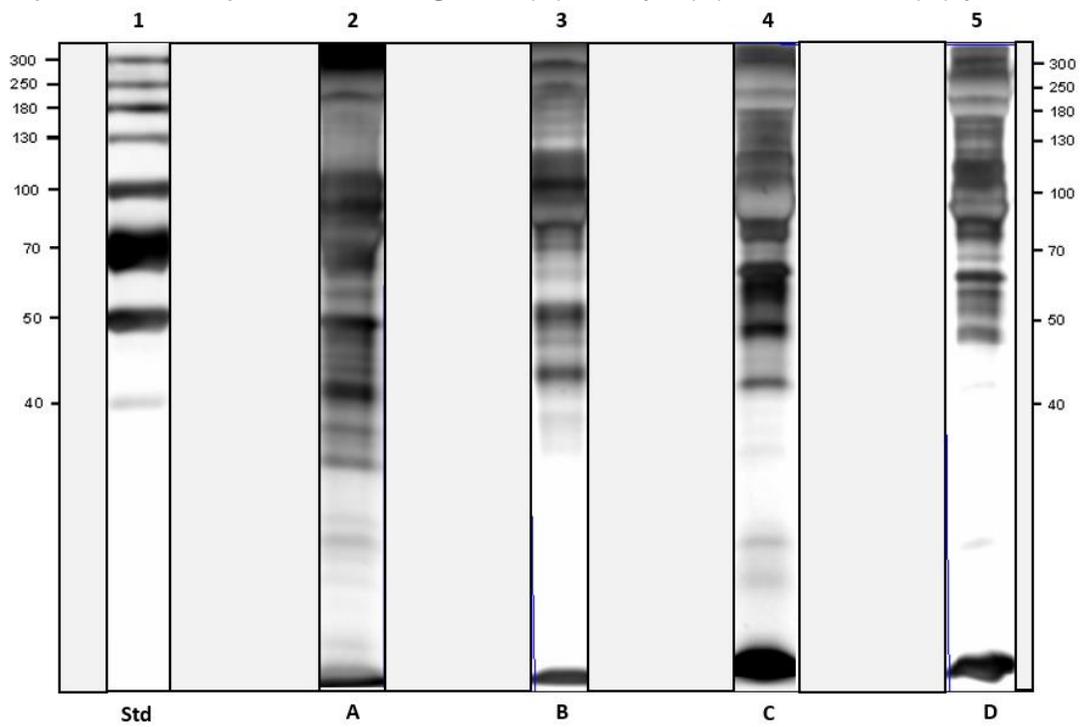
Anexo 13. Extracción de hemolinfa de las abejas



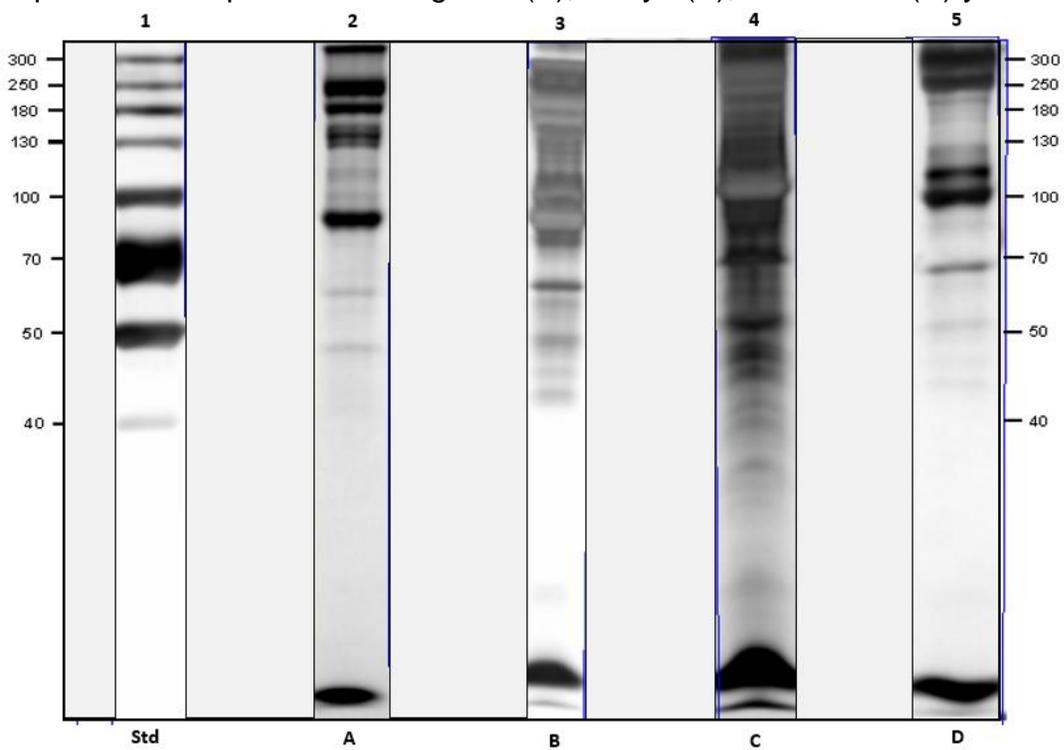
Anexo 14. Gráfica de la cuantificación de la hemolinfa para cada uno de los tratamientos en los tres tiempos.



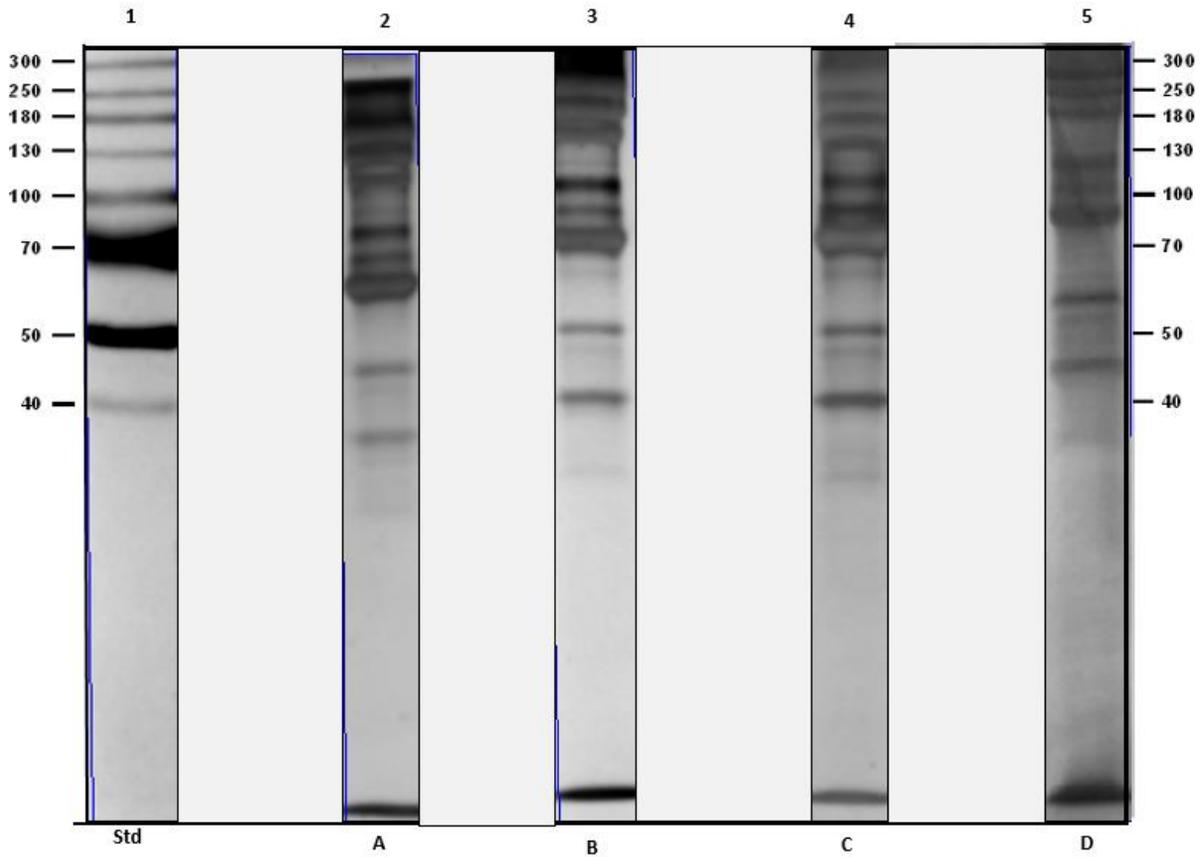
Anexo 15. Perfil proteico de la hemolinfa de las colmenas antes de iniciar el experimento: suplemento energético (A), Chaya (B), Ultra Bee® (C) y Nutra® (D).



Anexo 16. Perfil proteico de la hemolinfa de las colmenas a los 29 días de iniciar el experimento: suplemento energético (A), Chaya (B), Ultra Bee® (C) y Nutra® (D).

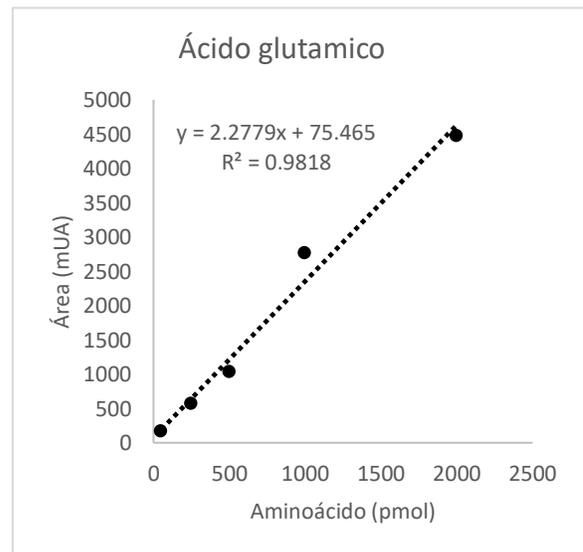
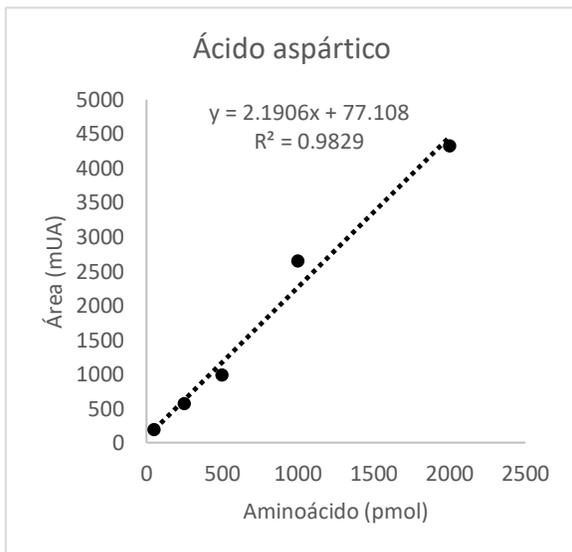


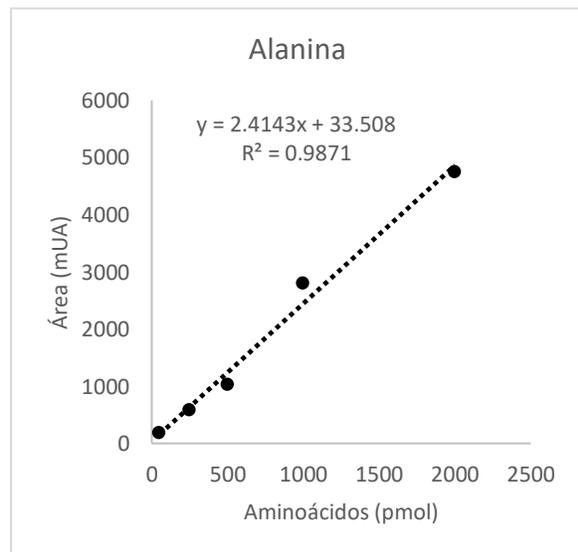
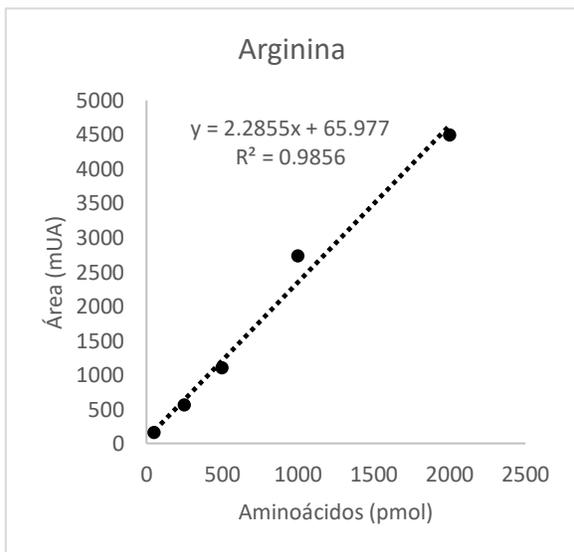
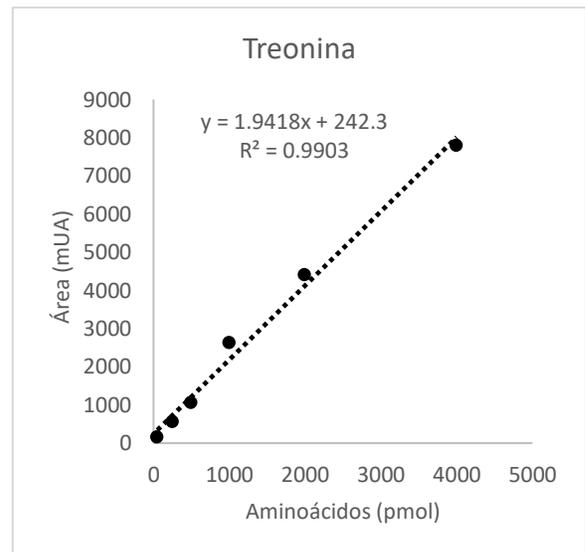
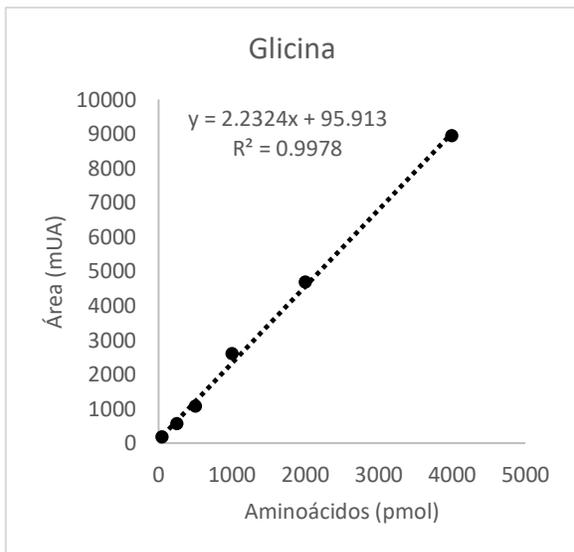
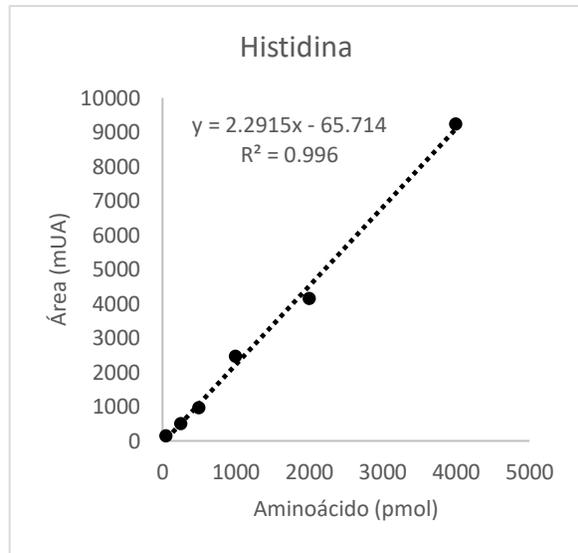
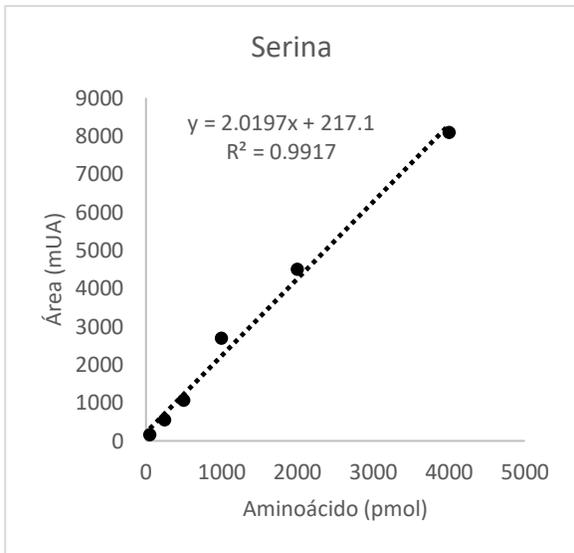
Anexo 17. Perfil proteico de la hemolinfa de las colmenas a los 48 días de iniciar el experimento: suplemento energético (A), Chaya (B), Ultra Bee® (C) y Nutra® (D).

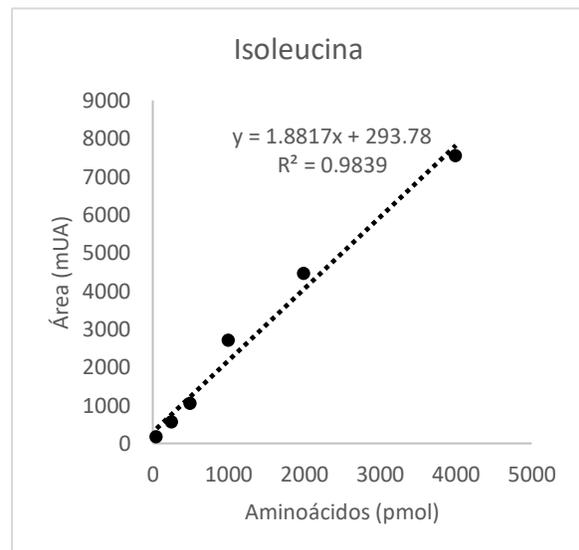
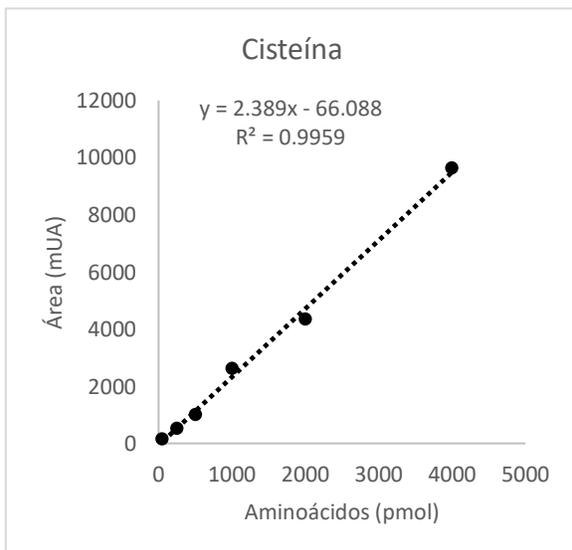
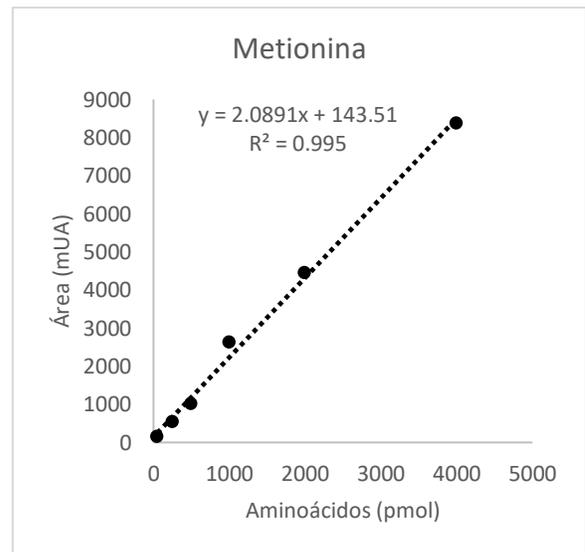
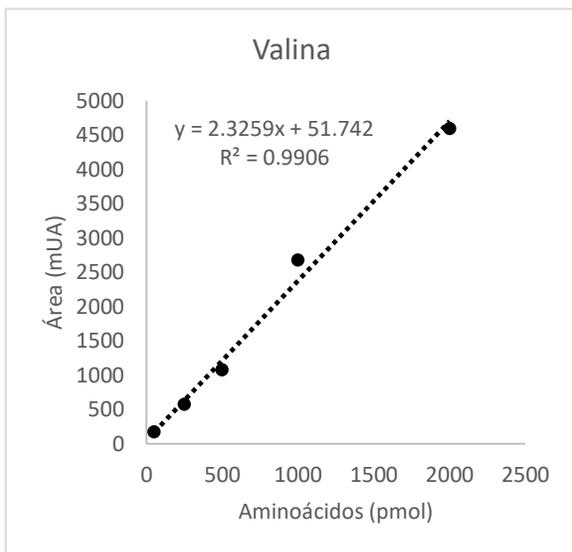
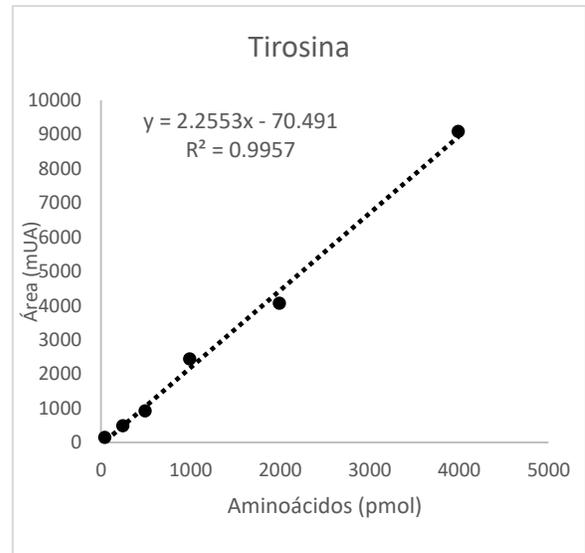
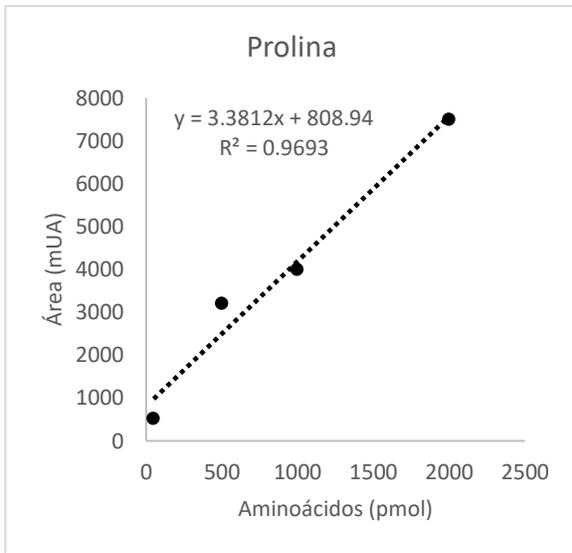


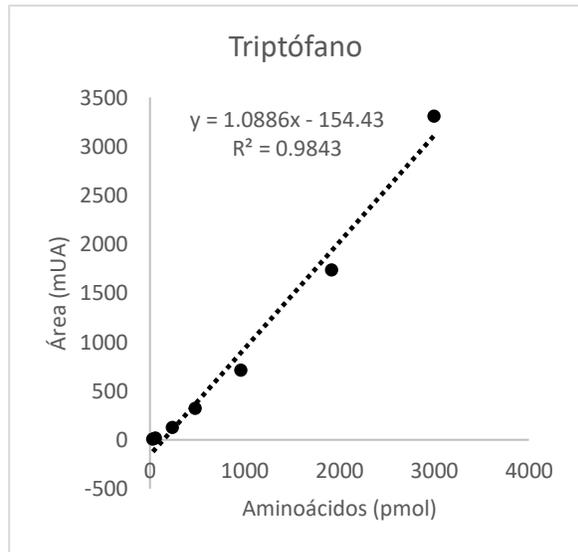
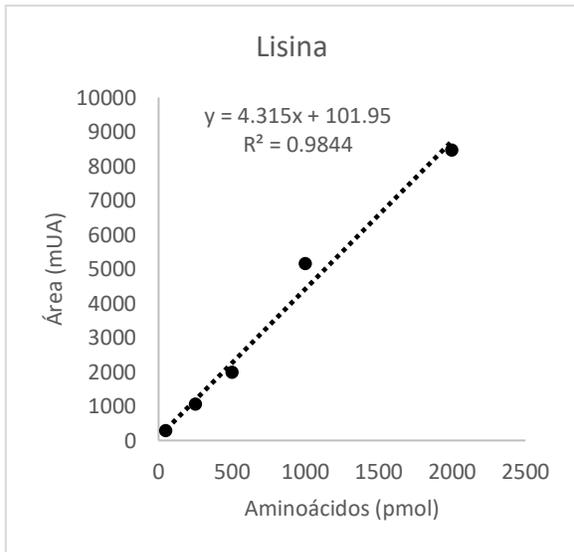
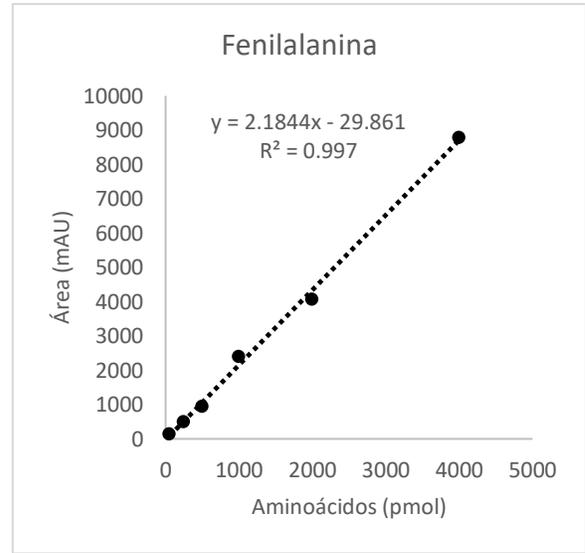
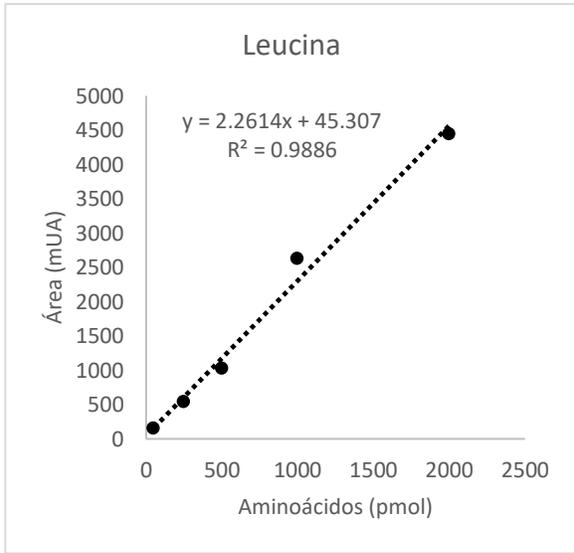
Anexo 18. Curva de calibración de los aminoácidos

Las curvas empleadas se obtuvieron en un rango de 50 – 4000 pmol para cada aminoácido.









XI. Glosario

Ápodo: Dicho de un anfibio: de cuerpo vermiforme, sin extremidades y sin cola o con cola rudimentaria.

Buche melario: Órgano en el cual las abejas almacenan el néctar mientras es transportada hacia la colmena.

Ceba: Alimentación abundante para las abejas para su buen desarrollo y ser así el sustento del hombre.

Gonadotropina: Hormona producida en la hipótesis que actúa sobre las glándulas sexuales.

Himenóptero: Dicho de un insecto: Que es masticador y lamedor a la vez, por estar provista su boca tanto de mandíbulas como de una especie de lengüeta, que tiene en el extremo del abdomen, e la hembra de algunas especies, un aguijón en el que desemboca el conducto excretor de una glándulas venenosas, y que tiene cuatro alas membranosas y metamorfosis complicada.

Jalea real: es una sustancia segregada por las glándulas hipofaríngeas de la cabeza de abejas obreras jóvenes, de entre 5 y 15 días, que mezclada con secreciones estomacales sirve de alimento a todas las larvas durante los primeros tres días de vida y la alimento para toda la vida de la reina.

Lipoproteína: Proteína conjugada cuyos componentes no proteínicos son lípidos.

Maseca: Es una harina de maíz.

Néctar: Jugo azucarado, producido por los nectarios, que chupan las abejas y otros insectos.

Nutrición: acción y efecto de aumentar la sustancia del cuerpo animal o vegetal por medio de alimento, reparando las partes que se van perdiendo en virtud de las acciones catabólicas.

Polen: Conjunto de granos diminutos contenidos en las anteras de las flores, cada uno de los cuales están constituidos por dos células rodeadas en común por dos membranas resistentes.

Probóscide: aparato bucal en forma de trompa o pico, dispuesto para la succión, que es propio de los insectos dípteros.

Proventrículo: parte del sistema digestivo el cual controla la entrada de alimento en el estómago de las abejas. Actúa de filtro eliminando los sólidos del contenido del buche melario.

Trofolaxis: es el mecanismo mediante el cual las abejas, hormigas u otros insectos sociales se alimentan unos a otros o transfieren feromonas. Esto es una alimentación de boca en boca.

Vitelo: conjunto de sustancias almacenadas dentro de un huevo para la nutrición del embrión.

Vitelogenesis: Formación o producción de vitelo.

Vuelo nupcial: apareamiento de la abeja virgen con los zánganos.

Ninfa: En los insectos con metamorfosis sencilla, estado juvenil de menor tamaño que el adulto, con incompleto desarrollo de las alas.

Ontogénesis: Ontogenia es desarrollo de un individuo, referido en especial el periodo de embrionario.