







## Digestibilidad en *Apis mellifera* L.: utilización del dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) como sustancia marcadora

Ledesma González, M.F.<sup>1,2,3\*</sup> ; Tourn, E.<sup>1,3</sup> ; Fernández, L.A.<sup>1,2</sup> ; Reynaldi J.F.<sup>2,4</sup> 

<sup>1</sup>Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA-CIC), Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur (UNS). Bahía Blanca, Prov. Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). <sup>3</sup>Cooperativa de Trabajo Apícola Pampero Ltda. (CAP). <sup>4</sup>Centro de Microbiología Básica y Aplicada (CEMIBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). La Plata, Prov. Buenos Aires, Argentina. ✉ matias.ledesma@uns.edu.ar

### Resumen

Una forma de evaluar la capacidad de aprovechamiento de los recursos nutricionales en varias especies animales es mediante la digestibilidad aparente. Para esta determinación, suele utilizarse una sustancia marcadora como el dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>). Sin embargo, este compuesto nunca ha sido probado en *Apis mellifera* en estudios de digestibilidad. En este trabajo, se emplearon diferentes concentraciones de TiO<sub>2</sub> como sustancia marcadora en los alimentos consumidos (jarabe de sacarosa y polen apícola) por esta especie. Se evaluaron variables relacionadas con el consumo, la digestibilidad aparente, la mortandad y pesos de las partes corporales. Los resultados de este trabajo demostraron que el TiO<sub>2</sub> no tuvo efectos sobre las variables estudiadas, excepto en el consumo de agua y de la digestibilidad aparente. Ambas mostraron una relación inversa con la concentración de TiO<sub>2</sub> agregada en los alimentos, posiblemente debido a un efecto tóxico de esta sustancia o al procedimiento analítico utilizado. Se concluye que la concentración más adecuada para posteriores estudios de digestibilidad es 0,1% p/p base materia seca. Asimismo, podemos decir que el uso de TiO<sub>2</sub> en sustancias azucaradas y polen apícola podría ser una herramienta útil para investigar la digestibilidad aparente en *A. mellifera* cuando se estudian este tipo de alimentos.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, digestibilidad aparente, dióxido de titanio, jarabe de sacarosa, polen.

## Digestibility in *Apis mellifera* L.: use of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) as marker substance

**Abstract.** Apparent digestibility is a useful technique for measuring nutritional resources in different animal species, requiring an inert marker such as titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>). However, TiO<sub>2</sub> has never been tested for digestibility studies in *Apis mellifera*. This work aimed to investigate different TiO<sub>2</sub> concentrations as inert marker in the feeds (sucrose syrup and bee pollen) commonly consumed by honeybees. We assessed consumption variables, apparent digestibility, mortality rate, and body part weights. TiO<sub>2</sub> did not significantly affect the mentioned variables, except for water consumption and apparent digestibility. Both variables exhibited an inverse relationship with the concentration of TiO<sub>2</sub> added to the feeds. This observation could be attributed to a potential toxic effect of TiO<sub>2</sub> or the analytical procedure. Based on our findings, we conclude that the optimal concentration of TiO<sub>2</sub> for future digestibility studies is 0.1% w/w on a dried mass basis. The addition of TiO<sub>2</sub> to sugary preparations and bee pollen holds promise as a valuable method for investigating apparent digestibility in *Apis mellifera* when studying these types of feeds.

**Key words:** *Apis mellifera*, apparent digestibility, pollen, sucrose syrup, titanium dioxide.

### INTRODUCCIÓN

La digestibilidad mide la capacidad de una especie para digerir y absorber los nutrientes. Una forma de estudiar esa capacidad de aprovechamiento de alimentos y nutrientes en varias especies animales es mediante la

determinación de la digestibilidad aparente (DA). Esta variable es un factor que relaciona la cantidad ingerida de un alimento o nutriente y la cantidad encontrada en heces incluyendo excreciones endógenas (Osorio-Carmona et al. 2012). Para calcular la DA muchas veces se recurre a la utilización de una sustancia marcadora (SM), que es un compuesto químico que no debe, entre otras cosas, sufrir

procesos de digestión y absorción en su paso por el tubo digestivo del animal y, además, no debe producir efectos tóxicos sobre los mismos.

A pesar de la importancia de la abeja doméstica (*Apis mellifera* L.) para la humanidad, existen pocos estudios sobre digestibilidad de los alimentos consumidos por esta especie (Schmidt y Buchmann 1985, Schmidt et al. 1989, Oliveira 2002, Nicolson et al. 2018, El-Sofany et al. 2020). La abeja doméstica consume naturalmente néctar y polen. El néctar aporta fundamentalmente azúcares, sales minerales y vitaminas. En cambio, el polen es la principal fuente de proteínas, lípidos y fibra, entre otros (Huang 2010). Los trabajos mencionados determinaron la DA de dietas compuestas por polen apícola utilizando distintos métodos. Uno de ellos consiste en utilizar una SM, donde una cantidad conocida de este compuesto se adiciona en el alimento y se compara su concentración en las heces (Schmidt y Buchmann 1985).

El dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) es una SM que presenta numerosas ventajas frente al trióxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) utilizado previamente en *A. mellifera* (Schmidt y Buchmann 1985). El  $\text{TiO}_2$  ha sido empleado en monogástricos y rumiantes (Morgan et al. 2014, Guzmán-Cedillo et al. 2016, Papadomichelakis y Fegeros 2020), así como en otros artrópodos como el camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) (Niu et al. 2011). Sin embargo, no existen investigaciones con  $\text{TiO}_2$  como SM en la abeja doméstica.

En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el comportamiento del  $\text{TiO}_2$  como una novedosa alternativa de SM para investigaciones de DA en *A. mellifera* en condiciones *in vitro*. Para ello se evaluaron distintas concentraciones de la mencionada molécula sobre el efecto en el consumo, la mortandad, peso corporal de abejas obreras adultas y sobre la DA de dos tipos de alimentos: jarabe de sacarosa y polen apícola.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección de abejas.** Cuadros con pupas de abejas próximas a emerger obtenidos del apiario del Departamento de Agronomía de la Universidad del Sur (Bahía Blanca, Argentina) fueron llevados al laboratorio y colocados en una estufa de cultivo a  $34^\circ\text{C}$  y a una humedad relativa (HR) aproximada del 60% (Williams et al. 2013). Luego de un día de incubación, se seleccionaron grupos de 50 abejas recién emergidas para ser colocadas en cada una de las microcolonias (Figura 1) que formaron parte del ensayo *in vitro*.



**Figura 1.** Microcolonias. Izq: partes del dispositivo para la cría *in vitro* de abejas. Der: abejas nodrizas y jarabe de sacarosa con  $\text{TiO}_2$  en el trozo de panal.

**Condiciones experimentales.** Las microcolonias fueron diseñadas según Williams et al. (2013) con algunas modificaciones, brevemente se usaron cajas de plástico de  $10 \times 6,2 \times 3,6$  cm, con un trozo de panal natural sin reservas de  $5 \times 5$  cm que se colocó en la parte superior; además se agregó un dispositivo para la provisión de polen, otro graduado de 2,5 ml para el agua destilada y tres tubos más del mismo volumen para el jarabe de sacarosa al 66%. Las microcolonias se mantuvieron a  $34^\circ\text{C}$  y una HR del 50 - 60% durante 14 días en una cámara de cría. Al transcurrir este período, fueron colocadas en un freezer a  $-20^\circ\text{C}$  para sacrificar las abejas.

**Diseño experimental.** Se realizaron dos experimentos,  $\text{TiO}_2$  en jarabe y  $\text{TiO}_2$  en polen con cinco tratamientos cada uno: 0 (control) - 0,1 - 0,25 - 0,5 - 0,75% de  $\text{TiO}_2$  peso en peso en base a materia seca (% p/p MS). Por tratamiento se utilizaron ocho réplicas (cada réplica fue una microcolonia). Se utilizó un diseño en bloques distribuyendo la mitad de las réplicas de ambos experimentos en dos fechas (noviembre 2021 y diciembre 2021).

**Experimento 1.** Se evaluaron cinco concentraciones de  $\text{TiO}_2$  en jarabe de sacarosa, J0 (0; control) - J0.10 (0,1% p/p MS) - J0.25 (0,25% p/p MS) - J0.50 (0,5% p/p MS) - J0.75 (0,75% p/p MS). La concentración de jarabe de sacarosa utilizada fue del 66%. Para su preparación se disolvió dos partes de sacarosa (azúcar de mesa comercial) en una parte de agua destilada hirviendo. En este experimento las abejas no recibieron otro tipo de alimentos.

**Experimento 2.** Al igual que en el Experimento 1, se evaluaron cinco concentraciones de  $\text{TiO}_2$  en polen apícola, P0 (0; control) - P0.10 (0,1% p/p MS) - P0.25 (0,25 % p/p MS) - P0.50 (0,5% p/p MS) - P0.75 (0,75 % p/p MS). Asimismo, se suministró jarabe de sacarosa preparado de la misma manera descrita para el Experimento 1 sin la adición de la SM. El polen utilizado fue colectado en marzo del año 2021 a partir de trampas en colmenas ubicadas en el apiario de la Cooperativa de Trabajo Apícola Pampero Ltda. en la localidad de Calderón (prov. de Buenos Aires). Se añadió a las microcolonias fresco y molido, el resto se conservó en freezer a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización. También se lo analizó palinológicamente (Estevinho et al. 2012).

**Cuantificación de variables.** Se midieron las siguientes variables en cada una de las microcolonias: consumo de agua (CA;  $\mu\text{l}/\text{abeja día}^{-1}$ ), movilización de sacarosa (MSac;  $\text{mg}/\text{abeja día}^{-1}$ ), consumo de polen (CP;  $\text{mg}/\text{abeja día}^{-1}$ ) y consumo de sacarosa (CS; g).

El CA y la MSac se cuantificaron midiendo la cantidad de líquido faltante en los dispositivos graduados. Además, para determinar el CA se introdujo en la estufa de cultivo la junto a las microcolonias, dispositivos idénticos para diferenciar el efecto por evaporación. El CP se determinó por diferencia de peso entre una medición y otra. Se realizaron mediciones de estas tres variables a los tres, seis, 10, 12 y 14 días de inicio del ensayo.

El CS se determinó al final (día 14) como la diferencia entre la sacarosa total movilizada (g sacarosa MS) y la

sacarosa acumulada en los panales en forma de reserva (g sacarosa MS).

Junto al consumo de agua y polen, y movilización de sacarosa, se registraron los individuos muertos (mortandad, MT) y se los retiró de las microcolonias.

Al finalizar el ensayo se tomaron diez abejas de cada tratamiento al azar, se las separó en sus tres partes corporales (cabeza, tórax y abdomen) y se las colocó en una estufa de secado a 60°C por 48 h. Posteriormente, se cuantificó el peso seco (g MS) de cabeza, tórax y abdomen. El peso seco de los abdómenes se obtuvo con abdómenes a los cuales se les retiró el contenido rectal junto a los últimos dos segmentos abdominales visibles. Según observaciones preliminares, el contenido rectal aportaría variabilidad a los valores de esta variable.

**Digestibilidad aparente.** Se determinó comparando la concentración de  $TiO_2$  en el alimento suministrado con respecto a su concentración en las heces, según la siguiente fórmula:

$$DA (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{[TiO_2 \text{ dieta}]}{[TiO_2 \text{ heces}]}\right)$$

Donde:

DA: digestibilidad aparente;  $TiO_2 \text{ dieta}$ : concentración de  $TiO_2$  suministrada en las dietas, y  $TiO_2 \text{ heces}$ : concentración de  $TiO_2$  determinada en heces

Para cuantificar la concentración de  $TiO_2$  en heces se trabajó según Short et al. (1996) con algunas modificaciones. Para ello se tomaron 10 a 15 abejas y se les extrajo el contenido rectal sujetando los dos últimos segmentos abdominales visibles con una pinza entomológica y tirando suavemente para extraer el recto. Este órgano se colocó sobre una caja de Petri y se liberó su contenido, que fue llevado a estufa por 24 horas a 60°C para su secado. Las muestras secas fueron pesadas y posteriormente incineradas a 550°C durante seis horas. Las cenizas fueron disueltas en 10 ml de una solución caliente de ácido sulfúrico (7,4

M) por una hora. Una vez enfriado, se agregaron 20 ml de agua destilada, luego 10 ml de peróxido de hidrógeno (20 volúmenes) y finalmente, se llevó a volumen final de 50 ml con agua destilada. Esta solución tomó una coloración amarillo-anaranjada y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro a 410 nm. La concentración de SM en la solución se obtuvo comparando con una curva de calibrado. Este procedimiento se realizó con tres unidades experimentales por tratamiento en cada bloque.

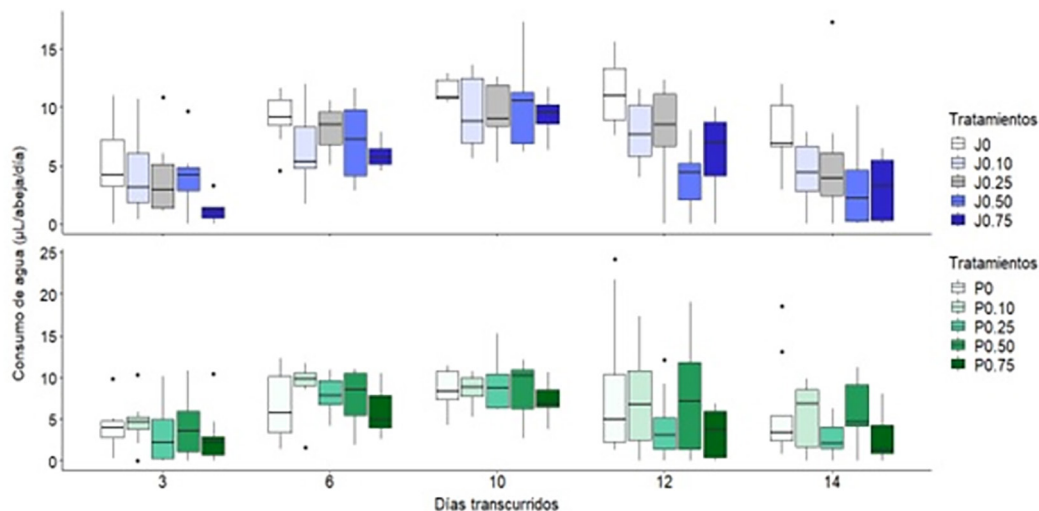
**Análisis estadístico.** Para analizar los datos de las variables de consumo, de digestibilidad aparente y de peso de partes corporales se recurrió a modelos lineales generalizados (MLG). En cambio, para analizar la mortandad se utilizó el estimador de supervivencia de Kaplan-Meier y las curvas se compararon con un test de regresión de Mantel-Cox.

## RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la evaluación de las distintas concentraciones de  $TiO_2$  como SM sobre las variables de consumo y la DA en los dos experimentos realizados.

### Experimento 1: $TiO_2$ en jarabe de sacarosa

Según los modelos generados, el consumo de agua (Figura 2) fue afectado estadísticamente por los tratamientos y los bloques. En ambos bloques, el tratamiento J0 (predicador  $5,25 \pm 0,7 \mu\text{l}/\text{abeja} \text{ día}^{-1}$ ) tuvo mayor CA que J0.75 (predicador  $1,45 \pm 0,7 \mu\text{l}/\text{abeja} \text{ día}^{-1}$ ). El resto de los tratamientos tuvieron un comportamiento intermedio entre ellos. Con respecto a la movilización y consumo de sacarosa no se detectaron efectos debido a los tratamientos, en cambio los modelos demostraron que la segunda fecha tuvo menores valores en ambas variables. Asimismo, no se encontraron efectos de la concentración del  $TiO_2$  sobre el peso de las partes corporales ni sobre la mortandad.



**Figura 2.** Consumo de agua en función de la concentración de la sustancia marcadora (SM) en jarabe de sacarosa (arriba) y polen apícola (abajo). J0 y P0, tratamientos control; J0.10 y P0.10, 0,1% p/p de SM en base materia seca; J0.25 y P0.25, 0,25%; J0.50 y P0.50, 0,5%; J0.75 y P0.75, 0,75%.

La DA en promedio fue de 94,22% ( $\pm 2,2$ ). Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, los predictores de los tratamientos J0.50 y J0.75 según los modelos generados fueron estadísticamente menores que el resto. Ambos tratamientos demostraron gran variabilidad en los datos (Figura 3). Se encontró una fuerte correlación negativa (coeficiente de correlación de Spearman,  $p = -0,8$ ) entre los tratamientos y los valores de digestibilidad.

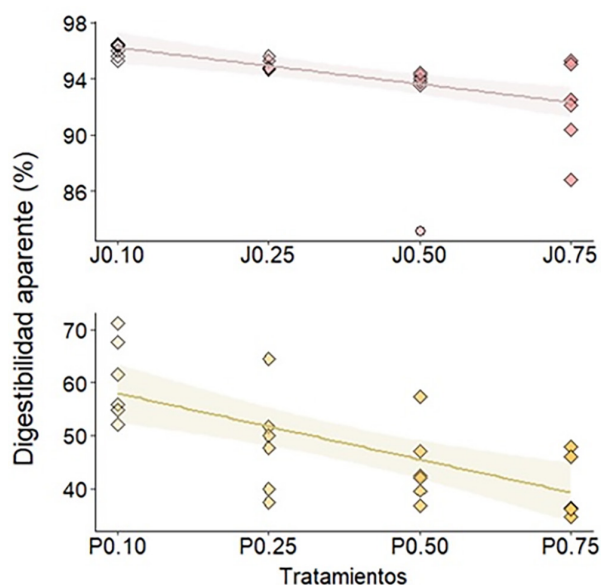
### Experimento 2: $TiO_2$ en polen apícola

Las cargas corbiculares mayoritarias en el polen utilizado pertenecían al tipo *Brassicaceae* (56%) y al tipo *Centaurea* sp. (38%).

El tratamiento P0.75 tuvo un menor consumo de agua (predictor  $3,45 \pm 0,8$   $\mu\text{l}/\text{abeja día}^{-1}$ ) respecto al resto de las variables en ambas fechas (Figura 2). Las abejas de la segunda fecha tuvieron menores consumos de agua. Con respecto a la movilización y consumo de sacarosa, consumo de polen, mortandad y pesos de partes corporales asociadas a los tratamientos, no se encontraron diferencias significativas.

La DA promedio del polen fue de 48,61% ( $\pm 10,4$ ). Los tratamientos fueron estadísticamente distintos entre sí, siendo la correlación de estas dos variables negativa (Pearson  $p = -0,65$ ; Figura 3).

**Tabla 1.** Ensayos *in vitro* de digestibilidad aparente con dióxido de titanio como sustancia marcadora, consumo de agua y alimentos en *Apis mellifera*.



**Figura 3.** Digestibilidad aparente en *Apis mellifera* en función de la concentración de  $TiO_2$  suministrado en el jarabe de sacarosa (arriba) y en el polen apícola (abajo). J0.10 y P0.10, 0,1% p/p de SM en base materia seca; J0.25 y P0.25, 0,25%; J0.50 y P0.50, 0,5%; J0.75 y P0.75, 0,75%.

#### Experimento 1: Jarabe de sacarosa

|              | Consumo   |                   |  |                  |                         |                |                    |         | Digestibilidad aparente (%) |         |
|--------------|---|-------------------|--|------------------|-------------------------|----------------|--------------------|---------|-----------------------------|---------|
|              | Consumo de agua ( $\mu\text{l}/\text{abeja día}^{-1}$ ) |                   | Movilización de sacarosa ( $\text{mg}/\text{abeja día}^{-1}$ ) |                  | Consumo de sacarosa (g) |                |                    |         |                             |         |
|              | Fecha 1   | Fecha 2           | Fecha 1  | Fecha 2          | Fecha 1                 | Fecha 2        | Fecha 1            | Fecha 2 | Fecha 1                     | Fecha 2 |
| <b>J0</b>    | 8,04 $\pm 3,7$ a**                                      | 9,33 $\pm 3,3$ a  | 30,06 $\pm 6,8$  | 25,91 $\pm 7,3$  | 8,91 $\pm 2,3$          | 5,10 $\pm 1,2$ |                    |         |                             |         |
| <b>J0.10</b> | 4,65 $\pm 3,1$ b  | 7,99 $\pm 3,5$ ab | 30,11 $\pm 9,9$  | 27,15 $\pm 10,2$ | 9,26 $\pm 0,9$          | 6,34 $\pm 0,3$ | 96,07 $\pm 0,7$ a  |         | 95,98 $\pm 0,3$ a           |         |
| <b>J0.25</b> | 6,36 $\pm 4,2$ c  | 7,12 $\pm 3,9$ bc | 28,50 $\pm 9,4$  | 22,74 $\pm 10,0$ | 10,33 $\pm 2,0$         | 6,57 $\pm 1,0$ | 95,20 $\pm 0,4$ ab |         | 94,90 $\pm 0,3$ ab          |         |
| <b>J0.50</b> | 6,36 $\pm 3,3$ c  | 5,83 $\pm 4,7$ cd | 27,58 $\pm 10,9$   | 25,02 $\pm 10,2$ | 8,94 $\pm 1,5$          | 6,88 $\pm 2,6$ | 94,09 $\pm 2,3$ ab |         | 94,15 $\pm 0,3$ ab          |         |
| <b>J0.75</b> | 4,47 $\pm 3,7$ bc                                       | 5,16 $\pm 3,8$ d  | 29,1 $\pm 12,3$  | 22,43 $\pm 11,7$ | 9,09 $\pm 2,3$          | 4,64 $\pm 1,6$ | 93,33 $\pm 1,7$ b  |         | 91,19 $\pm 3,5$ b           |         |

#### Experimento 2: Polen apícola molido

|              | Consumo           |                  |                          |                 |                     |                |  |                | Digestibilidad aparente |                    |
|--------------|-------------------|------------------|--------------------------|-----------------|---------------------|----------------|--|----------------|-------------------------|--------------------|
|              | Consumo de agua   |                  | Movilización de sacarosa |                 | Consumo de sacarosa |                | Consumo de polen ( $\text{mg}/\text{abeja día}^{-1}$ ) |                |                         |                    |
|              | Fecha 1           | Fecha 2          | Fecha 1                  | Fecha 2         | Fecha 1             | Fecha 2        | Fecha 1  | Fecha 2        | Fecha 1                 | Fecha 2            |
| <b>P0</b>    | 7,89 $\pm 5,4$ a  | 5,73 $\pm 5,2$ a | 9,00 $\pm 3,6$ a         | 19,59 $\pm 7,0$ | 5,14 $\pm 1,1$      | 8,45 $\pm 3,0$ | 1,92 $\pm 0,7$   | 1,49 $\pm 0,8$ |                         |                    |
| <b>P0.10</b> | 8,39 $\pm 4,0$ a  | 5,53 $\pm 3,9$ a | 8,20 $\pm 2,9$ b         | 20,47 $\pm 9,0$ | 6,52 $\pm 1,9$      | 6,11 $\pm 5,0$ | 1,88 $\pm 0,6$   | 1,32 $\pm 0,8$ | 63,70 $\pm 10,1$ a      | 57,39 $\pm 3,6$ a  |
| <b>P0.25</b> | 6,27 $\pm 3,6$ ab | 4,68 $\pm 4,0$ a | 8,40 $\pm 3,5$ ab        | 22,15 $\pm 8,6$ | 6,08 $\pm 0,7$      | 5,19 $\pm 2,6$ | 1,69 $\pm 1,0$   | 1,40 $\pm 1,1$ | 55,44 $\pm 7,9$ ab      | 41,68 $\pm 5,4$ b  |
| <b>P0.50</b> | 8,96 $\pm 3,7$ ac | 4,91 $\pm 4,9$ a | 8,76 $\pm 4,1$ ab        | 23,11 $\pm 6,2$ | 5,93 $\pm 0,9$      | 6,81 $\pm 1,7$ | 1,82 $\pm 1,0$   | 1,62 $\pm 0,9$ | 48,89 $\pm 7,7$ b       | 39,44 $\pm 2,7$ bc |
| <b>P0.75</b> | 5,39 $\pm 3,3$ b  | 3,45 $\pm 2,9$ b | 8,35 $\pm 3,0$ ab        | 22,46 $\pm 6,4$ | 6,30 $\pm 1,0$      | 6,99 $\pm 1,4$ | 1,66 $\pm 1,2$   | 1,39 $\pm 0,8$ | 46,68 $\pm 1,0$ b       | 35,73 $\pm 0,9$ c  |

\*Valores promedio y desvío estándar. \*\*Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el efecto del  $TiO_2$  como sustancia marcadora en cinco concentraciones en jarabe de sacarosa y en polen, con el fin de trabajar con esta sustancia en futuros estudios de digestibilidad en *Apis mellifera*. Para ello se tomaron en consideración variables de consumo, digestibilidad aparente, mortandad y peso de las partes corporales.

Los resultados de ambos experimentos demostraron que las abejas consumieron el jarabe y el polen con la SM en todas las concentraciones ensayadas. Jemec et al. (2016) en un ensayo *in vitro* con *A. mellifera* durante 10 días, observaron mayor consumo de jarabe de sacarosa en aquellas abejas que recibieron  $TiO_2$ . En nuestro trabajo, si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas, se advirtió mayores valores de MSac (Tabla 1) en aquellos grupos de abejas a los cuales se les suministró SM en el jarabe.

En este estudio no se encontraron efectos del  $TiO_2$  sobre la supervivencia. Resultados similares obtuvieron Özkan et al. (2014) y Jemec et al. (2016) que evaluaron la toxicidad aguda de nanopartículas de  $TiO_2$  en jarabe de sacarosa en diferentes concentraciones, desde 0,1 incluso hasta 10 mg ml<sup>-1</sup> y tampoco observaron efectos de esta sustancia sobre la supervivencia. Por otro lado, Ferrara et al. (2020) encontraron evidencias de toxicidad del  $TiO_2$  adicionado a soluciones de sacarosa en concentraciones inferiores (0,1 a 1x10<sup>-4</sup> mg L<sup>-1</sup>) a las utilizadas en nuestros experimentos. Estos autores observaron aumentos en los valores de mortandad de abejas y demostraron la activación de mecanismos de detoxificación para xenobióticos metálicos.

El consumo de agua registrado en los experimentos de este trabajo fue menor a medida que la concentración de  $TiO_2$  aumentó (Figura 2), siendo más claro este fenómeno en el consumo de jarabe con sustancia marcadora. Una posible explicación de este fenómeno podría deberse a la diferencia en la cantidad total de  $TiO_2$  ingerida por las abejas que recibieron jarabe de sacarosa con esta sustancia (min. 0,117 mg/abeja; máx. 16,93 mg/abeja) con respecto a aquellas que consumieron polen con este compuesto (min. 0,015 mg/abeja; máx. 2,264 mg/abeja). Aunque no se han encontrado trabajos que relacionen el consumo de agua y la presencia de sustancias metálicas en condiciones *in vitro*, esta disminución del CA podría indicar algún cambio fisiológico o comportamental que evidencie toxicidad de estos compuestos similar a lo reportado por Özkan et al. (2014) y Jemec et al. (2016). Más aún, Jemec et al. (2016) plantearon que un mayor consumo de jarabe, como se describió anteriormente, respondería a un efecto de alteraciones comportamentales debido a un agente estresante previo a una manifestación fisiológica de la toxicidad. Hipótesis respaldada por los trabajos de Ferrara et al. (2020) que se mencionaron en párrafos anteriores.

En cuanto a la digestibilidad aparente, el jarabe de sacarosa presentó una alta digestibilidad indicando que es digerido casi en su totalidad coincidiendo con varios autores (Crailsheim 1988, Gmeinbauer y Crailsheim 1993, Black 2006). En cambio, el polen tiene valores de digestibilidad promedio del 48,61%, pero éstos varían

según la concentración de  $TiO_2$  formulada en las dietas (Figura 3). Para ambos casos, jarabe y polen, cuanto menor es la concentración de SM, mayor son los valores de DA. Una posible explicación, podría ser del tipo analítica, y estaría relacionada con la cantidad de  $TiO_2$  efectivamente disuelta en el proceso de solubilización de las cenizas de las heces en la solución caliente de ácido sulfúrico (Short et al. 1996). La fórmula para la determinación de la digestibilidad aparente es, de manera simplificada, un cociente entre la cantidad de sustancia marcadora encontrada en heces respecto a la cantidad suministrada a las dietas. Con lo cual, altas concentraciones de  $TiO_2$  suministradas en las dietas producen mayor concentración de sustancia marcadora en heces y, en consecuencia, una parte de la misma no alcanza a disolverse en su totalidad en la solución de ácido sulfúrico. Esto conduce a una menor detección de la sustancia marcadora con el espectrofotómetro, produciendo una subestimación de la digestibilidad en altas concentraciones de sustancia marcadora. Asimismo, este planteo podría explicar la gran variabilidad de los valores de digestibilidad encontrados en el tratamiento J0.75, donde proporciones desiguales de  $TiO_2$  entre muestras no fueron disueltas en la solución de ácido sulfúrico, generando gran dispersión de los valores obtenidos.

Otra hipótesis para explicar este fenómeno, podría ser debido a un efecto tóxico del  $TiO_2$  sobre la fisiología y morfología normal del sistema digestivo de *A. mellifera*. Dabour et al. (2019) reportaron que óxidos metálicos como el óxido de cadmio II (CdO) y el óxido de plomo II (PbO) produjeron alteraciones significativas en las células epiteliales del ventrículo. Por su parte, Papa et al. (2021) encontraron alteraciones en la flora intestinal en abejas que ingirieron nanopartículas de  $TiO_2$ . Esto indica que podría ocurrir algún efecto negativo en el normal funcionamiento del sistema digestivo de este insecto que compromete procesos de digestión y absorción de los alimentos y nutrientes ingeridos, manifestándose en los valores de digestibilidad.

Finalmente, cabe destacar que el  $TiO_2$  ha sido usado como SM en estudios de digestibilidad aparente en diversos animales y en variadas concentraciones. Por ejemplo, algunos autores han trabajado con 0,5% en pollos (Short et al. 1996, Morgan et al. 2014, Roza et al. 2018), otros como Guzmán-Cedillo et al. (2016) utilizaron 0,4% en ovinos, mientras que Papadomichelakis y Fegeros (2020) formularon dietas para conejos con 0,1% de  $TiO_2$ . Como se mencionó previamente, en otros artrópodos, como el *Litopanaeus vanna*, se utilizó 0,1% de SM (Niu et al. 2010). De acuerdo a nuestros resultados, esta última es la concentración establecida como la más adecuada para trabajar en DA en *A. mellifera*.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permitieron determinar que la concentración de 0,1% p/p MS de  $TiO_2$  como SM fue la que mostró mejores resultados para futuros estudios de digestibilidad de sustancias azucaradas, así como de polen en *Apis mellifera*. Esta concentración minimiza el riesgo de efectos negativos a nivel fisiológico y comportamental de este insecto en condiciones *in vitro*. Más aún, esta

concentración presenta una buena resolución analítica, y además ha sido demostrada su utilidad en trabajos de digestibilidad aparente en otros artrópodos.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue financiado por la Cooperativa de Trabajo Apícola Pampero y una parte por un subsidio FITBA 2022 del Ministerio de Producción, Ciencia e Innovación Tecnológica de la Provincia de Buenos Aires (EX-2022-11164228-GDEBA). Los autores agradecen especialmente a la Dra. Gisela Grandinetti por la importante colaboración brindada en la determinación del origen botánico del polen.

## ORCID

Ledesma Matías  <https://orcid.org/0009-0005-9276-6744>

Tourn Elian  <https://orcid.org/0000-0003-3927-7229>

Fernández Leticia  <https://orcid.org/0000-0003-3785-8003>

Reynaldi Francisco  <https://orcid.org/0000-0002-1531-4905>

## REFERENCIAS

- Black J. Honeybee Nutrition, Review of research and practices. *Australian Government. Rural Industries Research and Development Corporation* 2006; 06: 052.
- Crailsheim K. Regulation of food passage in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Ins. Physiol.* 1988; 34(2): 85-90.
- Dabour K, Al Naggat Y, Masry S, Naiem E, Giesy JP. Cellular alterations in midgut cells of honey bee workers (*Apis mellifera* L.) exposed to sublethal concentrations of CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture. *Sci. Total Environ.* 2019; 651: 1356-1367.
- El-Sofany A, Al Naggat Y, Naiem E, Giesy JP, Seif A. Authentication of the botanical and geographic origin of Egyptian honey using pollen analysis methods. *J. Apicul. Res.* 2020.
- Estevinho LM, Rodrigues S, Pereira AP, Féa X. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2012; 47: 429-435.
- Ferrara G, Salvaggio A, Pecoraro R, Scalisi EM, Presti AM, Impellizzeri G, Brundo MV. Toxicity assessment of nano-TiO<sub>2</sub> in *Apis mellifera* L. 1758: histological and immunohistochemical assays. *Micros. Res. Techniq.* 2020; 83(4): 1-5.
- Gmeinbauer R, Crailsheim K. Glucose utilization during flight in honeybee (*Apis mellifera*) workers, drones and queens. *J. Ins. Physiol.* 1993; 39(11): 959-967.
- Guzmán-Cedillo AE, Corona L, Castrejón F, Rosiles-Martínez R, González-Ronquillo M. Evaluation of chromium oxide and titanium dioxide as inert markers for calculating apparent digestibility in sheep. *J. Appl. Ani. Res.* 2016; 45(1): 275-279.
- Huang Z. Honey bee nutrition. *Am. Bee J.* 2010; 150(8): 773-776.
- Jemec A, Milivojevic T, Drobne D, Specic K, Bozic J, Glavan G. No chronic effects on biochemical biomarkers, feeding and survival of carnolian honeybees (*Apis mellifera carnica*) after exposure to nanosized carbon black and titanium dioxide. *Acta Biologica Slovenica.* 2016; 59(1): 45-55.
- Morgan NK, Scholey DV, Burton EJ. A comparison of two methods for determining titanium dioxide marker content in broiler digestibility studies. *Animal* 2014; 8(4): 529-533.
- Nicolson SW, Da Silva-Das Neves S, Human H, Pirk CWW. Digestibility and nutritional value of fresh and stored pollen for honey bees (*Apis mellifera scutellata*). *J. Ins. Physiol.* 2018; 107: 302-308.
- Niu H, Chang J, Guo S, Xie Z, Zhu A. Effects of spray-dried blood cell meal with microencapsulated methionine substituting fish meal on the growth, nutrient digestibility and amino acid retention of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Res.* 2011; 42: 480-489.
- Oliveira GV, Serrao JE, Message D. Digestibility of pollen of grains by worker honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae, Apini) in the microregion of Viçosa, MG, Brazil. *Revista Brasileira de Zootecias, Juis de Fora* 2002; 4(2): 193 – 201.
- Osorio Carmona E, Giraldo Carmona J, Narváez Solarte W. Metodologías para determinar la digestibilidad de los alimentos utilizados en la alimentación canina. *Revista Veterinaria y Zootecnia.* 2012; 6(1): 87-97.
- Özkan Y, Irendi I, Akdeniz G, Kabakci D, Sökmen M. Evaluation of the Comparative Acute Toxic Effects of TiO<sub>2</sub>, Ag-TiO<sub>2</sub> and ZnO-TiO<sub>2</sub> Composite Nanoparticles on Honey Bee (*Apis mellifera*). *J. Int. Environ. Appl. Sci.* 2014; 10(1): 26-36.
- Papa G, Di Prisco G, Spini G, Puglisi E, Negri I. Acute and chronic effects of Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) PM1 on honey bee gut microbiota under laboratory conditions. *Sci. Rep.* 2021; 11: 5946
- Papadomichelakis G, Fegeros K. Reliability of acid-insoluble ash as internal marker for the measurement of digestibility in rabbits. *World Rabbit Science* 2020; 28(1): 1-12.
- Roza LF, Tavernari C, Surek D, Sordi C, Albino LFT, Paiano D, Boiago MM, Petrolli TG, Cunha Júnior A. Metabolizable energy and amino acid digestibility of mash and pelleted diets for broilers determined under different methodologies. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2018; 235: 1-7.
- Schmidt JO, Buchmann SL, Glaum M. The nutritional value of *Typha latifolia* for bees. *J. Apicul. Res.* 1989; 28(3): 155-165.
- Schmidt JO, Buchmann SL. Pollen digestion and nitrogen utilization by *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 1985; 82A(3): 499-503.
- Short FJ, Gorton, Wiseman J, Boorman KN. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1996; 59(2): 15-221.

23. Williams GR, Alaux C, Costa C, Csáki T, Doublet D, Eisenhardt D, Fries I, Kuhn R, McMahon DP, Medrzycki P, Murray TE, Natsopoulou ME, Neumann P, Oliver R, Paxton RJ, Pernal SF, Shutler D, Tanner G, van der Steen JJM, Brodschneider R. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under *in vitro* laboratory conditions. *J. Apicul. Res.* 2013; 52(1): 1-36.

**Citación recomendada**

Ledesma González MF, Tourn E, Fernández LA, Reynaldi JF. Digestibilidad en *Apis mellifera* L.: utilización del dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) como sustancia marcadora. *Rev. Vet.* 2023; 34(2): 69-75. doi: <http://dx.doi.org/>