

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 095**

51 Int. Cl.:

A23K 20/168 (2006.01)

A23K 50/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2023** **PCT/EP2023/074820**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2024** **WO24056559**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2023** **E 23768543 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2024** **EP 4358735**

54 Título: **Isofucosterol y combinaciones de isofucosterol, y una multiplicidad de esteroides como un nutriente para animales**

30 Prioridad:

13.09.2022 BE 202205727

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

20.12.2024

73 Titular/es:

APIX BIOSCIENCES (50.0%)

Blauwhuisstraat 11

8750 Wingene, BE y

PHYTANT (50.0%)

72 Inventor/es:

BOGAERT, THIERRY;

SHAFIR, SHARONI;

WRIGHT, GERALDINE y

BOGAERT, JAN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 993 095 T3

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

DESCRIPCIÓN

Isofucoesterol y combinaciones de isofucoesterol, y una multiplicidad de esteroides como un nutriente para animales

5 **Antecedentes**

Los insectos se utilizan cada vez más como animales económicamente importantes, como polinizadores y como animales capaces de producir proteína animal para alimentación humana y animal de forma rentable y con menos impacto sobre el medio ambiente que los cultivos tradicionales de proteína animal (aves, peces, mamíferos). Las abejas son muy importantes en la agricultura moderna para la polinización de los cultivos. Los polinizadores se han visto amenazados recientemente debido a la exposición a pesticidas, una mayor prevalencia de patógenos y parásitos y cambios en la gestión del paisaje que reducen la abundancia de polen floral natural.

Históricamente, los apicultores han alimentado a las colonias de abejas con una fuente de alimento que contiene polen o polen recolectado por las abejas en ecosistemas naturales o agrícolas. La recolección de polen es limitada en disponibilidad y escala. En primer lugar, la recolección de polen es costosa. En segundo lugar, es difícil mantener fresco el polen. Finalmente, el polen recolectado en ecosistemas naturales o agrícolas puede ser portador de plagas, enfermedades y pesticidas. Por lo tanto, los alimentos para abejas disponibles comercialmente habitualmente no contienen polen.

Sin embargo, la falta de polen en calidad y cantidad suficiente es una razón fundamental para la disminución observada en la salud y supervivencia de las colonias de abejas. Las abejas que recolectan recursos naturales de polen imponen presión sobre los recursos de las especies de abejas silvestres y es probable que contribuyan a la disminución de su población. El transporte de colmenas a las zonas de polen es un factor estresante fundamental para las colonias de abejas y un coste importante para la industria apícola. Un reemplazo de polen diseñado para especies de abejas domesticadas abordaría estos problemas.

Las abejas obtienen nutrientes esenciales tales como esteroides del polen. Es probable que estos esteroides incluyan colesterol, campesterol, beta-sitosterol o estigmasterol. Un trabajo original realizado en el laboratorio del USDA en Beltsville en la década de 1970 describe la utilización de esteroides derivados del polen por las abejas alimentadas con una dieta sintética (Journal of Insect Physiology, vol. 26, págs. 287-289). Chakrabarti y col. describen el papel del 24-metilencolesterol en la nutrición de las abejas (Chakrabarti, Evaluating effects of a critical micronutrient (24-Methylenecholesterol) on honeybee physiology, Annals of the entomological society of America, Vol 113, 176-182, 2019). Sin embargo, todos estos experimentos se han realizado con adiciones de esteroides simples a una dieta que de otro modo estaría libre de esteroides. Hasta la fecha no se ha descrito cuál de los muchos esteroides ni qué combinaciones y concentraciones de esteroides son importantes o esenciales para las abejas.

El documento US2019/0090507 de Apix Biosciences destaca la importancia de los esteroides vegetales y, en particular, de 24-metilencolesterol, campesterol, β -sitosterol y colesterol. Sin embargo, el documento US2019/0090507 no describe isofucoesterol ni fucoesterol o una mezcla de los mismos con esteroides como nutrientes importantes necesarios para crear un pienso “completo” para abejas domesticadas como suplemento alimenticio.

El documento WO9417674 (RAMM PETER ROLAND [AU]) describe una composición adecuada para su uso como estimulante del apetito o suplemento alimenticio para abejas y caracterizada por que comprende levadura de panadería inactiva. Sin embargo, este documento no describe isofucoesterol ni fucoesterol o una mezcla de los mismos con esteroides como nutrientes importantes necesarios para crear un pienso “completo” para abejas domesticadas como suplemento alimenticio.

El documento WO2007056823 (COMMW SCIENT IND RES ORG [AU], y col.) describe un método para criar un pez o crustáceo, comprendiendo el método alimentar al pez o crustáceo con un pienso que comprende lípidos, comprendiendo el ácido graso de dicho lípido al menos el 5,5 % (p/p) de ácido estearidónico (SDA). Sin embargo, este documento no describe isofucoesterol ni fucoesterol o una mezcla de los mismos con esteroides como nutrientes importantes necesarios para crear un pienso “completo” para abejas domesticadas como suplemento alimenticio.

El documento WO2017085477 (UNIV OF NEWCASTLE-UPON-TYNE [GB], y col.) describe esteroides vegetales y, en particular, 24-metilencolesterol, campesterol, β -sitosterol y colesterol. Sin embargo, el documento WO2017085477 no describe isofucoesterol ni fucoesterol o una mezcla de los mismos con esteroides como nutrientes importantes necesarios para crear un pienso “completo” para abejas domesticadas como suplemento alimenticio.

Mishyna y col., Journal of Functional Foods 76 (2021) 104316, doi.org/10.1016/j.jff.2020.104316, analiza estudios sobre el consumo de insectos y camarones con respecto a hidrolizados, sus actividades antioxidantes e inhibitoras de la enzima convertidora de angiotensina, ácidos grasos, colesterol, minerales, vitaminas, carotenoides, compuestos fenólicos y fibra alimentaria. Sin embargo, este documento no menciona el isofucoesterol ni la combinación de colesterol e isofucoesterol.

La proteína de soja u otras fuentes de proteínas utilizadas, tales como la patata, contienen campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol y trazas de desmosterol e isofucosterol (60 mg de isofucosterol/kg de peso húmedo de patata, o el 0,006 %). (Sirpa O. Kärenlampi, Philip J. White, en *Advances in Potato Chemistry and Technology*, 2009) La concentración de esteroides en estas fuentes está por debajo de las necesidades nutricionales de las abejas.

En las abejas, el isofucosterol constituye entre el 10 y el 50 % del total de esteroides corporales. Esto equivale al 0,02-0,06 % del peso seco de una abeja. (Svoboda y col. Utilization and metabolism of dietary sterols in the honeybee and the yellow fever mosquito, *Lipids Volumen* 17 número 3, 1982; nuestros datos). En abejorros tales como *Bombus terrestris*, el isofucosterol representa entre el 40 y el 55 % de sus esteroides corporales. Esta cantidad equivale al 0,10-0,25 % del peso seco total de un abejorro.

Las dietas artificiales actuales para las abejas son incompletas, lo que da como resultado un aumento inicial de la producción de crías seguido de una rápida disminución terminal de la producción de crías en un plazo de 22-40 días. Esto indica que las dietas actuales carecen de uno o más nutrientes esenciales. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ningún pienso artificial (sin polen) para abejas que pueda sustentar el desarrollo de crías selladas de una colonia durante más de 3 a 4 ciclos de 21 días. La capacidad de un pienso para sustentar el desarrollo continuo de la cría a largo plazo es un indicador clave de su equivalencia con el polen y su capacidad para actuar como “pienso completo”. Los mejores datos publicados ya muestran una fuerte reducción en la producción de crías que comienza después del ciclo 2 (Herbert y col. (1980), *J. Insect Physiol.*, Vol. 26, págs. 287 a 289; doi.org/10.1186/s12917-022-03151-5; Bee Culture Education: Honeybee Nutrition - Randy Oliver - Parte 1 a 4, Youtube). Por lo tanto, dado que hay escasez de calidad y cantidad de polen en muchas áreas donde se mantienen las abejas para la polinización o la producción de miel, existe la necesidad de proporcionar composiciones y métodos para alimentar a las abejas con vistas a mantener una colonia a largo plazo con una dieta artificial mediante la cual las abejas continúan produciendo crías indefinidamente.

Las dietas artificiales libres de polen actuales para las abejas son incompletas, por lo que las abejas alimentadas con estas dietas se ven privadas o mermadas de sus reservas de nutrientes esenciales después de 3-4 ciclos de 21 días de producción de crías en la colonia (Herbert y col. (1980), *J. Insect Physiol.*, vol. 26, págs. 287 a 289). En la presente memoria se muestra que mediante la adición de isofucosterol/fucosterol y una multiplicidad de esteroides se obtiene una dieta que mantiene la producción de crías y el desarrollo de la colonia en una colonia durante más de 4 ciclos, lo que sugiere que nuestra dieta supera la falta de uno o más nutrientes esenciales observada en las dietas artificiales actuales. Esto muestra que esta invención da como resultado una nueva dieta que suministra a las abejas el/los ingrediente/s limitante/s necesario/s que necesitan. Por lo tanto, dicha dieta libre de polen sostiene a una colonia durante períodos prolongados del ciclo de vida de la colonia sin polen natural, lo cual es un avance significativo que puede mejorar radicalmente las prácticas de apicultura.

Las abejas son fundamentales para la seguridad alimentaria humana. A pesar de haber sido domesticadas durante miles de años hasta la fecha, no se desarrolló ninguna dieta artificial libre de polen que elimine por completo la necesidad de una colmena de buscar néctar y polen de flores para su nutrición. Una dieta de este tipo será una herramienta fundamental para mantener la capacidad de la humanidad de polinizar de manera sostenible el 35 % de los cultivos del mundo y proteger la biodiversidad de plantas y polinizadores silvestres.

Las colmenas de abejas requieren una fuente continua y diversa de polen nutricionalmente adecuado para satisfacer sus necesidades nutricionales. El polen es la fuente esencial de la colmena de proteínas, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, lípidos, esteroides y otros micronutrientes. La mayoría de las especies vegetales producen polen cuya composición no cumple con todas las necesidades nutricionales de una colmena. Por lo tanto, las abejas desarrollaron mecanismos fisiológicos para equilibrar sus necesidades nutricionales mediante la recolección de polen de diferentes fuentes florales.

Aún se desconoce la relevancia nutricional o los requisitos para las abejas de muchas de las moléculas complejas identificadas en el polen. El polen y las abejas contienen, además de macronutrientes, múltiples miembros de familias químicas específicas (por ejemplo, flavonoides, esteroides, lípidos...).

En muchos artículos, la relevancia nutricional de una molécula específica se infirió correlacionando la composición de nutrientes en diferentes fuentes de polen floral con las propiedades nutricionales de estos diferentes pólenes. Dado que los diferentes pólenes florales varían mucho en composición en docenas de moléculas, este enfoque correlativo no permite realmente sacar conclusiones sobre la relevancia de ingredientes individuales.

En otro enfoque experimental para estudiar la nutrición de las abejas, un solo ingrediente de dicha familia de ingredientes (un solo esteroide; un solo antioxidante) se añade a una dieta básica simple (Herbert, Chakrabarti, véase la Tabla 7) y se ha demostrado que tiene un efecto generalmente en un ensayo a corto plazo, tal como la alimentación y la longevidad de abejas enjauladas. Esto da para cada sustancia química una indicación de que las abejas pueden beneficiarse nutricionalmente de la presencia de este miembro de la familia química en ausencia de otros miembros de la familia química, pero no indica si esta es la molécula óptima de la sustancia química requerida por las abejas o si las abejas requieren o se benefician de más de un miembro de la familia para sustentar nutricionalmente a la colmena durante todo el ciclo de vida y las estaciones.

Los insectos no pueden sintetizar esteroides ni obtener esteroides de su fuente de alimento, que la mayoría de los insectos convierten en colesterol. A diferencia de la mayoría de los insectos, las abejas (abejas, abejorros...) contienen sólo trazas de colesterol y son incapaces de desalquilar los fitosteroides en colesterol. Por lo tanto, las abejas usan fitosteroides en lugar de colesterol como elementos estructurales en sus membranas, como precursores de hormonas del desarrollo y como componentes estructurales de complejos proteicos (por ejemplo, el 24-metilen-colesterol es un componente importante de los complejos de proteína mrjp1-apimisinina de la jalea real; Tabla 7). El polen de diferentes especies de flores tiene composiciones y proporciones de fitosteroides muy diferentes. Las abejas, los abejorros y otras especies de abejas recolectan polen de una diversidad de especies para equilibrar su dieta. La composición de esteroides de las abejas consta de 6 esteroides principales (enumerados a continuación) que representan >90 % de los esteroides presentes en una abeja. Estos fitosteroides están presentes en proporciones variables que reflejan parcialmente la composición de fitosteroides de la dieta floral de las abejas. Típicamente, las larvas de abeja contienen el 0,1-0,3 % de esteroide en las siguientes proporciones: 40-60 % de 24-metilen-colesterol; 15-40 % de Beta-sitosterol; 15-50 % de isofucoesterol; 3-10 % campesterol; 1-5 % de estigmasterol y 0,1-2 % de colesterol, dependiendo de la fuente de alimento.

Sólo se han publicado dos experimentos con una dieta holística de composición de esteroides definida que abordan la importancia de esteroides específicos en la nutrición de las abejas. En un experimento, Herbert y col. (1980, Tabla 7) añadieron los esteroides, colesterol, 24-metilen-colesterol, beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol (no isofucoesterol) individualmente a una dieta definida que carecía de esteroides y alimentaron con estas dietas, cada una de las cuales contenía un esteroide, a colmenas encerradas en una tienda de campaña durante hasta 12 semanas. Demostraron que las dietas con algunos esteroides tales 24-metilen-colesterol daban como resultado más crías que las dietas con otros esteroides. De este experimento no se puede sacar ninguna conclusión sobre si un esteroide puede ser intercambiado fisiológicamente por otro, es decir, si las abejas necesitan muchos esteroides o sólo unos pocos y si la ausencia de un fitosteroide específico puede compensarse con la presencia de (una combinación de) otros fitosteroides.

Chakrabarti y col (Tabla 7) realizaron un experimento de alimentación a corto plazo con 24-metilen-colesterol como esteroide único presente en una dieta artificial que muestra que el 24-metilen-colesterol, cuando está presente, tiene efectos fisiológicos y metabólicos significativos (no se midió la producción de crías). Sin embargo, estos experimentos no incluyeron una dieta de control con un esteroide diferente al 24-metilen-colesterol para evaluar si los efectos observados son específicos de un esteroide específico o no específicamente de la clase de moléculas de esteroides. Estos experimentos no diferenciaron si un esteroide diferente del 24-metilen-colesterol tendría un efecto similar o efectos fisiológicos superpuestos.

Hasta la fecha no se ha demostrado qué esteroides del polen son esteroides facultativos y cuáles (si los hay) son nutricionalmente esenciales en la dieta. Hasta la fecha no se ha informado de ningún experimento nutricional que evalúe las necesidades nutricionales de isofucoesterol para las abejas. No se informaron de experimentos que aborden si la omisión de una dieta completa, que contiene una multiplicidad definida de esteroides en concentración y proporciones similares al polen, de 24-metilen-colesterol o de isofucoesterol o de ambos esteroides afecta a la aptitud de una colmena y sus abejas. Para mayores referencias al estado de la técnica véase la Tabla 7.

Descripción corta de la invención

Mientras que en los animales sólo existen unos pocos esteroides, siendo el colesterol el principal, en las plantas se encuentra una amplia gama de esteroides. Las variaciones estructurales entre estos surgen de diferentes sustituciones en la cadena lateral y del número y la posición de los dobles enlaces en el esqueleto tetracíclico. Los esteroides vegetales se pueden agrupar según la presencia o ausencia de una o más funcionalidades. Por ejemplo, se pueden dividir en tres grupos según los niveles de etilación en C4 de la siguiente manera: 4-desmetilesteroides o esteroides de producto final, 4 alfa-monometilesteroides y 4,4-dietilesteroides. Los 4-desmetilesteroides naturales incluyen sitosterol, estigmasterol, brasicasterol, campesterol, avenasterol e isofucoesterol. En la mayoría de las plantas superiores, los esteroides con un grupo 3-hidroxilo libre (esteroides libres) son los principales productos finales. Sin embargo, los esteroides también se presentan como conjugados, por ejemplo, donde el grupo 3-hidroxilo está esterificado por una cadena de ácido graso o ácido fenólico para dar un éster esterílico. A los efectos de esta descripción, el término esteroide se refiere tanto a esteroides libres como a esteroides conjugados. Sin embargo, en esta memoria descriptiva las referencias a niveles, cantidades o porcentajes de esteroide se refieren al peso total de grupos esteroide, por lo que se excluye el peso de los grupos conjugantes tales como ácido graso o ácido fenólico. En este documento, fucoesterol se define como fucoesterol o su isómero isofucoesterol o una mezcla de los dos isómeros. En este documento isofucoesterol se define como isofucoesterol o su isómero fucoesterol o una mezcla de los dos isómeros.

Cuando en este documento se describe una dosis o cantidad administrada como x gramos (u otra cantidad) en un período de dos semanas (u otro período de tiempo), esto pretende ser una descripción general de "dosis administrada en una unidad de tiempo" y no una limitación específica el requisito específico de alimentarse dos veces por semana. Un experto puede recalcular un régimen de dosis semanal a dosis diaria o quincenal o cualquier período de tiempo similar.

Los presentes inventores han establecido sorprendentemente que el isofucosterol es un nutriente esencial para las abejas. El isofucosterol administrado a través de una dieta libre de polen aumenta la producción de crías de abejas y la supervivencia de las abejas obreras en comparación con una dieta de abejas sustituta del polen libre de isofucosterol. Los presentes inventores han descubierto además que la combinación de isofucosterol y al menos un esteroide adicional, en particular colesterol, 24-metilencolesterol y otros fitosteroles, en particular campesterol, beta-sitosterol o estigmasterol, proporciona un mayor crecimiento y/o rendimiento de salud en invertebrados. en particular abejas y otros insectos que se alimentan de polen que el isofucosterol solo.

Esta utilidad del presente es importante en la formulación de alimentos no polínicos para suplementar las colonias de abejas en períodos de escasez de polen en el medio ambiente (que hoy es una fuente importante de mal desempeño de las colonias de abejas), en la producción de reinas de abejas superiores y en la cría comercial de insectos que se alimentan de polen, tales como la mosca soldado negra como fuente alternativa de proteínas para la alimentación humana y animal, los abejorros (para la polinización) y los coccinélidos (para el control de los pulgones); sírfidos (para la polinización) y otros insectos comercialmente relevantes.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención es un método para alimentar a invertebrados u organismos de acuicultura, que comprende

- proporcionar una composición sustituta del polen que comprende una cantidad nutricionalmente eficaz de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos; y

- administrar la composición sustituta del polen a invertebrados u organismos de acuicultura;

en donde la composición sustituta del polen comprende una cantidad nutricionalmente eficaz al menos un esteroide adicional, preferiblemente al menos dos esteroides adicionales seleccionados del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol o un conjugado fisiológicamente disponible de los mismos.

En otro aspecto, los invertebrados son insectos que se alimentan de polen, preferiblemente insectos de los órdenes *Hymenoptera* y *Coleoptera*, más preferiblemente abejas, abejorros, moscas soldado negras, sírfidos o coccinélidos.

En otro aspecto, los organismos de acuicultura son organismos de acuicultura que se alimentan de plancton y algas, preferiblemente peces, larvas de peces, ostras, almejas, moluscos, gasterópodos o crustáceos.

En otro aspecto, la cantidad nutricionalmente eficaz de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos es una dosis diaria del 0,0006 % en peso al 0,052 % en peso del peso corporal de los invertebrados u organismos de acuicultura con vida.

En otro aspecto, la cantidad nutricionalmente eficaz de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos es del 10 % en peso al 60 % en peso de la cantidad total de esteroides del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de los invertebrados u organismos de acuicultura o en la composición sustituta del polen.

En otro aspecto, el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos se administra en una proporción de 0,14 g a 12 g de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos por 30000 abejas por período de dos semanas.

En otro aspecto, el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos se administra en una cantidad del 10 % en peso al 60 % en peso de la cantidad total de esteroides del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de los invertebrados u organismos de acuicultura o de la composición sustituta del polen.

En otro aspecto, la cantidad nutricionalmente eficaz de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y el al menos un esteroide adicional es una proporción de administración de 0,2 a 48 gramos por 30000 abejas por un período de tiempo de dos semanas, y el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos se administra en una cantidad del 10 % en peso al 60 % en peso de la cantidad total de esteroides del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de abejas o de la composición sustituta del polen.

En otro aspecto, el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y el al menos un esteroide adicional se administra en una proporción de 0,4 g a 36 g por 30000 abejas por un período de tiempo de dos semanas, y el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos se administra en una cantidad del 10 % en peso al 60 % en peso de la cantidad total de esteroides del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de abejas o de la composición sustituta del polen.

En otro aspecto, el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y el al menos un esteroide adicional se administra en una proporción de 0,6 g a 20 g por 30000 abejas por un período de tiempo de dos semanas, y el isofucosterol,

fucosterol o un mezcla de los mismos se administra en una cantidad del 10 % en peso al 60 % en peso de la cantidad total de esteroides del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de abejas o de la composición sustituta del polen.

- 5 En otro aspecto, el isofucosterol, fucosterol colesterol, 24-metilencolesterol, beta-estigmasterol, estigmasterol y/o campesterol se administran en una cantidad total del 0,001 % en peso al 0,087 % en peso del peso de los invertebrados u organismos de acuicultura con vida por día.

En otro aspecto, la cantidad nutricionalmente eficaz es:

- 10
- isofucosterol en una cantidad del 10 % en peso al 60 % en peso,
 - colesterol en una cantidad del 0 % en peso al 50 % en peso,
 - 15 ▪ 24-metilencolesterol en una cantidad del 0 % en peso al 50 % en peso,
 - beta-sitosterol, estigmasterol y/o campesterol en una cantidad del 0 % en peso al 50 % en peso

20 en comparación con la cantidad total de isofucosterol, fucosterol colesterol, 24-metilencolesterol, beta-sitosterol, estigmasterol y/o campesterol.

En otro aspecto, la concentración total de esteroides es del 0,01 % en peso al 4 % en peso, preferiblemente del 0,05 % en peso al 3 % en peso y aún más preferiblemente del 0,05 % en peso al 2 % en peso, y aún más preferiblemente del 0,05 % en peso al 1,5 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen.

25 En otro aspecto, las concentraciones de esteroides se seleccionan del grupo de:

- colesterol en una cantidad del 0,001 % en peso al 2 % en peso, preferiblemente del 0,001 % en peso al 1,5 % en peso, más preferiblemente del 0,06 % en peso al 1,2 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen,
- 30 ▪ 24-metilencolesterol en una cantidad del 0,001 % en peso al 2 % en peso, preferiblemente del 0,001 % en peso al 1,5 % en peso, más preferiblemente del 0,06 % en peso al 1,2 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen,
- 35 ▪ sitosterol, preferiblemente beta-sitosterol en una cantidad del 0,001 % en peso al 2 % en peso, preferiblemente del 0,001 % en peso al 1 % en peso, más preferiblemente del 0,03 % en peso al 0,6 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen,
- 40 ▪ isofucosterol en una cantidad del 0,01 % en peso al 5 % en peso, preferiblemente del 0,01 % en peso al 2 % en peso, más preferiblemente del 0,01 % en peso al 1,0 % en peso, más preferiblemente del 0,03 % en peso al 0,6 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen,
- 45 ▪ campesterol en una cantidad del 0,001 % en peso al 2 % en peso, preferiblemente del 0,001 % en peso al 1 % en peso, más preferiblemente del 0,02 % en peso al 0,35 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen,
- 50 ▪ estigmasterol en una cantidad del 0,001 % en peso al 2 % en peso, preferiblemente del 0,001 al 1 % en peso, más preferiblemente del 0,01-0,2 %, en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen, o
- cualquier combinación de los mismos.

55 En otro aspecto, la composición es una dieta de invertebrados completa, parte de una dieta de invertebrados o un suplemento dietético y en donde la proporción de 24-metilencolesterol con respecto al esteroide adicional o a la combinación de esteroides adicionales es de 10:1 a 1:1.

En otro aspecto, la composición se administra a invertebrados de las familias *Apidae*, en particular abejas (*Apini*), abejorros (*Bombini*) o abejas sin aguijón (*Meliponini*).

60 En otro aspecto, la composición se administra

- en forma sólida, tal como en forma de una tortita o un polvo, o en forma líquida, tal como en forma de una solución, aceite o aerosol;
- 65 ▪ dentro o fuera de la colmena.

En una realización, la composición es sustancialmente pura, es decir, consiste en el 50 % en peso o más, preferiblemente el 70 % en peso o más, aún más preferiblemente el 90 % en peso del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de abejas o en la composición sustituta del polen.

En una realización, la composición es sustancialmente pura, es decir, libre de cualquier compuesto adicional.

En otro aspecto, la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos es un tejido no polínico de una o más especies vegetales seleccionado del grupo que consiste en hojas, tallos, raíces, tubérculos, flores, semillas, cortezas y frutos y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la fuente del esteroles adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol, y estigmasterol es un tejido sustituto del polen de una o más especies vegetales seleccionado del grupo que consiste en hojas, tallos, raíces, tubérculos, flores, semillas, cortezas y frutos y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos o la fuente del al menos un esteroles adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol es un extracto, un aceite o un refinamiento de un tejido sustituto del polen de una o más especies vegetales o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos o la fuente del al menos un esteroles adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol es un tejido sustituto del polen de una o más especies vegetales seleccionadas del grupo que consiste en *Solanaceae*, *Poaceae*, *Ranunculaceae*, *Fabaceae*, *Corylaceae*.

En otro aspecto, la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos o la fuente del al menos un esteroles adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol es una fuente sustituta del polen seleccionada del grupo que consiste en:

- una especie de alga marina o de agua dulce, en particular un extracto, un aceite o un refinamiento de *Ulva lactuca*;
- una especie de diatomea marina, en particular un extracto, un aceite o un refinamiento de *Thalassiosira pseudonana*, *Thalassiosira rotula* o *Chaetoceros muelleri*; y
- un hongo, en particular un extracto, un aceite o un refinamiento de una levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *Yarrowia lipolytica*.

En otro aspecto, el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y/o el al menos un esteroles adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol se sintetiza química o enzimáticamente mediante o se obtiene mediante organismos hospedadores modificados genéticamente, tales como hongos, bacterias o algas.

En otro aspecto, la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos o el al menos un esteroles adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol se selecciona del grupo que consiste en algas, plantas, hongos, algas, diatomeas y combinaciones de los mismos y en donde la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos es un tejido sustituto del polen.

En otro aspecto, el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y el al menos un esteroles adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol se proporciona a una colonia de abejas eusociales a partir de una fuente sintética.

En otro aspecto, el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y el uno o más esteroides adicionales del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol y estigmasterol se proporcionan como parte de una composición sustituta del polen, en donde la composición sustituta del polen comprende:

- proteínas en una cantidad del 10 % en peso al 50 % en peso, preferiblemente del 15 % en peso al 40 % en peso,
- ácidos grasos en una cantidad del 1 % en peso al 20 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso al 12 % en peso,
- carbohidratos en una cantidad del 20 % en peso al 90 % en peso, preferiblemente del 30 % en peso al 70 % en peso,

- opcionalmente vitaminas, y
- opcionalmente minerales,

en donde la cantidad total de componentes suma el 100 % en peso y en donde los % en peso se refieren al peso seco total de la composición.

En otro aspecto, la composición sustituta del polen está libre de polen.

En otro aspecto, la composición sustituta del polen se usa para alimentar a un organismo seleccionado del grupo que consiste en:

- invertebrados, preferiblemente insectos que se alimentan de polen, más preferiblemente insectos de los órdenes *Hymenoptera* y *Coleoptera*, aún más preferiblemente abejas, abejorros, moscas soldado negras, sírfidos o coccinélidos,
- organismos de acuicultura, preferiblemente organismos de acuicultura que se alimentan de plancton y algas, más preferiblemente peces, larvas de peces, ostras, almejas, moluscos, gasterópodos o crustáceos.

Otro aspecto es el uso de la composición sustituta del polen de la invención como una tortita concentrada, en donde la concentración de isofucoesterol, fucoesterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol es del 10 % en peso al 33 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen.

En otro aspecto, la composición sustituta del polen comprende el constituyente que induce el apetito/consumo de las abejas seleccionado del grupo que consiste en polen, azúcar, aceite o grasa, miel o proteína o una mezcla de los mismos. En el caso de otros invertebrados, se puede usar un componente inductor del apetito/consumo diferente.

En otro aspecto, la concentración del componente que induce el apetito/consumo de las abejas es del 1 % en peso al 20 % en peso, preferiblemente del 2,5 % en peso al 15 % en peso, aún más preferiblemente del 5 % en peso al 10 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen.

En otro aspecto, la composición sustituta del polen se usa en forma líquida o en polvo.

En otro aspecto del uso como forma líquida o en polvo, la concentración de isofucoesterol, fucoesterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol es del 0,01 % en peso al 99 % en peso en comparación con el peso seco total de la composición sustituta del polen.

Otro aspecto de la presente invención es una composición de pienso libre de polen o una composición sustituta del polen en particular para abejas que comprende del 0,01 % en peso al 1 % en peso de isofucoesterol, preferiblemente del 0,01 % en peso al 0,3 % en peso de isofucoesterol, en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen, en donde la composición opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento.

Otro aspecto de la presente invención es una composición de pienso libre de polen o una composición sustituta del polen en particular para abejas que comprende del 0,01 % en peso al 1 % en peso de fucoesterol, preferiblemente del 0,01 % en peso al 0,3 % en peso, en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen, en donde la composición opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento.

Otro aspecto de la presente invención es una composición de pienso libre de polen o una composición sustituta del polen en particular para abejas que comprende del 0,01 % en peso al 1 % en peso de isofucoesterol y fucoesterol, preferiblemente del 0,01 % en peso al 0,3 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen, en donde la proporción en peso de isofucoesterol con respecto a fucoesterol es de 0,01: a 100 a 100:0,01 y en donde la composición opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento.

Otro aspecto de la presente invención es una composición de pienso libre de polen o una composición sustituta del polen en particular para abejas que comprende del 0,01 % en peso al 1 % en peso de isofucoesterol/fucoesterol, preferiblemente del 0,01 % en peso al 0,3 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen;

- en donde la proporción en peso de isofucoesterol con respecto a fucoesterol es de 0,01:100 a 100:0,01;

- En donde la composición sustituta del polen comprende además del 0,01 % en peso al 0,5 % en peso de 24-metilen-colesterol en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen;

- en donde la proporción de isofucoesterol y fucoesterol con respecto a 24-metilen-colesterol es de 2:100 a 100:2; y

- 5 ▪ en donde la composición sustituta del polen opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento.

10 Otro aspecto de la presente invención es una composición de pienso libre de polen o una composición sustituta del polen, en particular para abejas, que comprende del 0,01 % en peso al 1 % en peso de 24-metilen-colesterol, preferiblemente del 0,01 % en peso al 0,3 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen;

- 15 ▪ en donde la composición sustituta del polen comprende además isofucoesterol y fucoesterol con una proporción en peso de isofucoesterol con respecto a fucoesterol de 0,01:100 a 100:0,01;

- en donde la proporción en peso de isofucoesterol y fucoesterol con respecto a 24-metilen-colesterol es de 2:100 a 100:2; y

- 20 ▪ en donde la composición sustituta del polen opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento.

25 Otro aspecto de la presente invención es una composición de pienso libre de polen o una composición sustituta del polen en particular para abejas que comprende del 0,02 % en peso al 3 % en peso de esteroides, en donde los esteroides se seleccionan de un grupo que consiste en 24-metilen-colesterol, isofucoesterol, fucoesterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, ergosterol y colesterol en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen;

- 30 ▪ en donde la proporción en peso de isofucoesterol y fucoesterol con respecto a 24-metilen-colesterol es de 0,5:100 a 100:0,5; y/o

- en donde la proporción en peso de isofucoesterol con respecto a fucoesterol es de 0:10 a 10:0; y/o

- 35 ▪ de isofucoesterol con respecto a la suma de uno o más otros esteroides seleccionados del grupo de 24-metilen-colesterol, fucoesterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, colesterol, ergosterol de 2:100 a 100:2; y/o

- 40 ▪ en donde la proporción en peso de fucoesterol con respecto a la suma de otros esteroides seleccionados del grupo de 24-metilen-colesterol, isofucoesterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, colesterol, ergosterol de 2:100 a 100:2; y/o

- 45 ▪ en donde la proporción en peso de 24-metilen-colesterol con respecto a la suma de uno o más otros esteroides seleccionados del grupo de isofucoesterol, fucoesterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, colesterol, ergosterol de 2:100 a 100:2; y/o

- 50 ▪ en donde la proporción en peso de colesterol con respecto a la suma de uno o más esteroides seleccionados del grupo de 24-metilen-colesterol, isofucoesterol, fucoesterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, ergosterol de 15:1 a 1:100; y/o

- 55 ▪ en donde la composición sustituta del polen opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento.

Descripción corta de los dibujos

55 La Figura 1 muestra la elección de cohortes de abejas de dieta con o sin isofucoesterol.

La Figura 2 muestra la supervivencia de cohortes de abejas confinadas a alimentarse con dietas que contienen concentraciones específicas de isofucoesterol.

60 La Figura 3 muestra el umbral para la influencia del isofucoesterol en la dieta de las abejas.

La Figura 4 muestra los resultados del Ejemplo 4A: un experimento de alimentación a largo plazo en colonias de Apidea con abejas alimentadas con una multiplicidad de esteroides que incluyen isofucoesterol y 24-metilencolesterol.

65

La Figura 5 muestra los resultados del Ejemplo 4B: Resultados de un experimento de alimentación a largo plazo en colonias de Apidea con abejas alimentadas con una multiplicidad de esteroides sin isofucoesterol pero que incluían 24-metilencolesterol.

5 La Figura 6 muestra los resultados del Ejemplo 4C: Resultados de un experimento de alimentación a largo plazo en colonias de Apidea con abejas alimentadas con una multiplicidad de esteroides con lo que la concentración total de esteroides en la dieta se mantiene constante y la presencia (concentración) de esteroides específicos varía entre dietas.

10 La Figura 7 muestra los resultados del Ejemplo 5A: Alimentar a moscas soldado negras adultas con una dieta que contenga una multiplicidad de esteroides: efecto sobre la tasa de eclosión de los huevos puestos y el peso de la masa de huevos puestos. La supervivencia de adultos y el número de masas de huevos puestos de una población alimentada con una dieta sustituta del polen (como se especifica en el documento US2019/0090507 a Apex Biosciences) se midió diariamente usando los métodos de cría descritos en Thinn y Kainoh 2022. JARQ 56 (2), 211-217 (2022).

15 La Figura 8 muestra los resultados del Ejemplo 5B: Alimentar a moscas soldado negras adultas con una dieta que contenga una multiplicidad de esteroides: efecto sobre la longevidad de los adultos y la supervivencia de las larvas hasta la fase de prepupa. Las larvas de mosca soldado negra (BSF) se alimentaron con una dieta que contenía el 22 % de proteína y el 4 % de grasa como se describe en Hogsette 1992. J. Econ. Entomol. 85(6): 2291-2294 hasta la eclosión. Los esteroides se obtuvieron como compuestos puros añadidos directamente a la dieta hasta una cantidad total del 0,1 %. La supervivencia de larvas y adultos durante un período de 50 días se midió como en Georgescu y col, Eur. J. Entomol. 118: 297-306, 2021.

20 La Figura 9 muestra los resultados del Ejemplo 5C: Alimentar a las moscas soldado negras adultas con diferentes dietas que contienen una multiplicidad de esteroides: esteroides que se encuentran en los tejidos de las moscas soldado negras alimentadas con una multiplicidad de esteroides. Se añadieron esteroides a la dieta. La medición de esteroides en tejidos se realizó después de la saponificación de tejidos de BSF usando GC-MS como se describe en Boukid y col. 2022. Insects 12, 672.

25 La Figura 10 muestra los resultados del Ejemplo 6: Alimentar colonias de abejas en un experimento de Apidea con una dieta que contenía un extracto de moscas soldado negras que fueron alimentadas con una multiplicidad de esteroides.

30 La Figura 11 muestra la configuración experimental del Ejemplo 7. La Figura 11A es una fotografía de los recintos carpados. La Figura 11B es una fotografía de las colmenas y comederos en las carpas que se muestran en la Figura 11A. La Figura 11C muestra una tortita encima del marco para abejas en una colmena miniplus. La Figura 11D muestra la configuración y el dispositivo para fotografiar los marcos individuales.

35 La Figura 12 muestra el recuento acumulado de crías operculadas de colmenas en recintos carpados que se muestran en la Figura 11 y alimentadas con la Dieta A frente a la Dieta B según el ejemplo 7 (datos sin procesar de las Tablas 2B y 4). El eje vertical muestra el número acumulado de crías operculadas producidas desde el día 12 hasta el día 96. El eje horizontal muestra el día 12 al día 96 después del inicio de la colocación de las colmenas en los recintos carpados y el inicio de la alimentación con la Dieta A o la Dieta B. La línea continua superior muestra el promedio de todas las colmenas alimentadas con la Dieta A. La línea continua inferior muestra el promedio de todas las colmenas alimentadas con la Dieta B. La colmena individual alimentada con la Dieta A está representada por la línea discontinua de guiones cortos seguida por el número de colmena. La colmena individual alimentada con la Dieta B está representada por una línea discontinua de guiones largos seguida por el número de colmena.

40 La Figura 13 muestra el peso acumulado de la dieta consumida por colmenas en recintos carpados alimentadas con la Dieta A frente a la Dieta B según el ejemplo 7. El eje vertical muestra los gramos de pienso acumulados consumidos desde el día 12 hasta el día 96. El eje horizontal muestra el día 12 al día 96 después del inicio de la colocación de las colmenas en recintos carpados y el inicio de la alimentación con la Dieta A o la Dieta B. La línea continua superior muestra el promedio de todas las colmenas alimentadas con la Dieta A. La línea continua inferior muestra el promedio de todas las colmenas alimentadas con la Dieta B. La colmena individual alimentada con la Dieta A está representada por la línea discontinua de guiones cortos seguida por el número de colmena. La colmena individual alimentada con la Dieta B está representada por una línea discontinua de guiones largos seguida por el número de colmena.

45 La Figura 14 muestra el recuento de crías operculadas en colmenas alimentadas con la Dieta A o la Dieta B desde el momento del día 24 al 96 después del inicio de la colocación en una carpa cerrada y el inicio de la alimentación con las dietas según el ejemplo 7 (datos sin procesar en las tablas-2A y 3). El eje vertical muestra el número de crías operculadas producidas desde el día 24 hasta el día 96. El eje horizontal muestra el día 24 al día 96 después del inicio de la colocación de las colmenas en recintos carpados y el inicio de la alimentación con la Dieta A o la Dieta B.

50 La Figura 15 muestra fotografías de todos los marcos con crías en la colmena 29, alimentada con la dieta A desde el día 36 al 84 según el Ejemplo 7.

55

La Figura 16 muestra fotografías de todos los marcos con crías en la colmena 29, alimentada con la dieta B desde el día 36 al 84 según el Ejemplo 7.

La Figura 17 muestra fotografías de los marcos con crías en la colmena 29 (2 filas superiores) alimentada con la Dieta A y la colmena 26 (2 filas inferiores) alimentada con la Dieta B los días 60, 72 y 84 después del inicio de los experimentos según el Ejemplo 7. Tanto la representación gráfica de la colmena 29 como de la 26 cierran los promedios para las colmenas alimentadas con la Dieta A y la Dieta B.

La Figura 18 muestra el recuento acumulado de crías operculadas de colmenas en recintos carpados alimentadas con la Dieta A frente a la Dieta C según el Ejemplo 7 (datos sin procesar de las Tablas 2B y 4). El eje vertical muestra el número acumulado de crías operculadas producidas desde el día 12 hasta el día 96. El eje horizontal muestra el día 12 al día 96 después del inicio de la colocación de las colmenas en recintos carpados y el inicio de la alimentación con la Dieta A o la Dieta B. La línea continua superior muestra el promedio de todas las colmenas alimentadas con la DIETA A. La línea continua inferior es el promedio de todas las colmenas alimentadas con la Dieta C. La colmena individual alimentada con la Dieta A está representada por una línea discontinua de guiones cortos seguida por el número de colmena. La colmena individual alimentada con la Dieta C está representada por una línea discontinua de guiones largos seguida por el número de colmena.

La Figura 19 muestra fotografías de los marcos con crías en la colmena 29 (2 filas superiores) alimentada con Dieta A y la colmena 14 (2 filas inferiores) alimentada con Dieta C los días 48, 60, 72, 84 y 96 después del inicio de los experimentos del Ejemplo 7. Tanto la representación gráfica de la colmena 29 como de la 14 cierran los promedios para las colmenas alimentadas con la Dieta A y la Dieta C.

La Figura 20 muestra el recuento de crías operculadas en colmenas alimentadas con la Dieta A, B, C y E según el Ejemplo 8 desde el momento del día 24 al 96 después del inicio de la colocación en una carpa cerrada y el inicio de la alimentación con las dietas (datos sin procesar en la tabla 6). El eje vertical muestra el número de crías operculadas producidas desde el día 24 hasta el día 96. El eje horizontal muestra el día 24 al día 96 después del inicio de la colocación de las colmenas en recintos carpados y el inicio de la alimentación con las Dietas A, B, C y E (dieta comercial).

Descripción detallada de la invención

A continuación, se describen realizaciones de la presente invención.

Las abejas viven en colonias. En la práctica industrial estándar existen diferentes tamaños de colonias: una colonia de 8 marcos, que es el estándar de la industria, contiene ~20000 abejas; una colonia de 10 marcos ~ 24000; una colonia grande 12,5 marcos en dos pisos = 30000; una colonia con 2 alzas 50000 abejas). En general, las colonias de abejas tienen un tamaño variable (+/- 50 % de aumento/disminución de tamaño en promedio durante todo el año dependiendo de la estación y la disponibilidad nutricional).

Rortais y col. 2005 (Apidologie, 36(1), 71-83), revisaron exhaustivamente la literatura sobre el consumo de polen de abejas y observaron que se recolectaban entre 10 y 55 kg anualmente por colonia. Crailsheim y col. 1993 (J Insect Phys. 38(6):409-419) calcularon el consumo anual de polen en dos colonias en 13,4 y 17,8 kg respectivamente en colonias de aproximadamente 25000 abejas en junio-agosto. Wille y col. 1982 (Revue Suisse de Zoologie 4: 897-914) registraron de 10 a 26 kg de polen por año. Obviamente, esto depende del tamaño de la colonia, del desarrollo de la colonia, del medio ambiente y del tipo de polen.

Keller y col. 2005 (Bee world, 86(1): 3-10) estiman que cada abeja obrera necesita entre 140-180 mg de polen durante toda su vida. Si una colonia entera cría entre 100-200k abejas al año, esto daría como resultado una demanda de 17-34 kg de polen por colonia. Crailsheim y col. 1993 (J Insect Phys. 38(6):409-419) resumieron la cantidad de polen consumido por colonia a partir de 5 artículos publicados. También midieron el consumo de polen de dos colonias que midieron. Estiman que la cantidad media de polen necesaria para una colonia que produzca ~150000 crías al año es de 19 kg.

Cuando las colonias de abejas reciben alimentación suplementaria en períodos de escasez de polen, típicamente reciben alimento suplementario en forma de tortita de proteína o tortita de polen (la mayoría de los regímenes de alimentación son “ad libitum”), lo que da como resultado un consumo de ~1,5 a 2 a-3 libras (0,680-1,35 kg) por 12,5 marcos por 2 semanas. En la industria, un marco para abejas se define como ~2400 abejas (30000 abejas en la colonia) y las colmenas usadas en la industria pueden contener 5 u 8, 10 o 12 marcos o incluso más. Al comienzo de la temporada de primavera, una colmena está sólo parcialmente poblada (por ejemplo, 5 marcos para abejas en una colmena de 10 marcos) y a medida que avanza la temporada, la población de abejas en esa colmena se expande para llenar la colmena de 10 marcos con 10 marcos para abejas. Durante el invierno, la colonia reduce su población a 5-6 marcos para abejas.

Al calcular la dosis de “mg de pienso equivalente a polen” requerida por las abejas, es necesario considerar que el polen de diferentes especies vegetales contiene una amplia gama de ~50 % de azúcar, proteínas y otros componentes

y que, por lo tanto, el valor nutricional del polen varía según la especie vegetal (intervalo +/-50 %). A través de la alimentación suplementaria de polen, suplementos de polen o suplementos proteicos, las colonias reciben una dosis de ~1,5--3 lb o (680 g a 1360 g) de suplemento de polen por dos semanas. Anualmente, esto equivale a un intervalo de 17,7 kg a 35,4 kg de suplemento alimenticio de polen, lo que está en el intervalo de las cifras publicadas para una colonia de 10 marcos que se alimenta de polen, considerando las cualidades nutricionales variables del polen. Para colonias de diferente tamaño, los cálculos de dosis se ajustan proporcionalmente. (1 marco para abejas = ~2400 abejas).

Calculado basándose en la tabla de Roessink y col 2021 (J Apic Res 60: 659-654) una colonia de 30000 abejas consume 62 gramos de polen por día u 868 gramos por 2 semanas (en la temporada activa de floración y multiplicación de abejas).

Una descripción más extensa viene dada por el texto y la tabla entre comillas a continuación de: <https://www.insignia-bee.eu/how-much-pollen-does-a-colony-need/>

“Rortais y col. (2005), revisaron exhaustivamente la literatura sobre el consumo de polen de abejas y observaron que se recolectaban entre 10 y 55 kg anualmente por colonia. Crailsheim y col. calcularon el consumo anual de polen en dos colonias en 13,4 y 17,8 kg respectivamente en colonias de aproximadamente 25000 abejas en junio-agosto. Wille y col. registraron de 10 a 26 kg de polen por año. Obviamente, esto depende del tamaño de la colonia, del desarrollo de la colonia, del medio ambiente y del tipo de polen. Por ejemplo, el polen de maíz se consume aproximadamente el doble que el polen mixto, debido a su porcentaje relativamente bajo de nutrientes del grano de polen integral. El porcentaje de proteína del peso seco es comparable al polen mixto (Höcherl y col, 12012). Obviamente, no existe una cantidad fija que una colonia pueda o deba recolectar para crecer, mantenerse y funcionar. Sin embargo, existen buenos estudios disponibles para evaluar la necesidad anual de polen para una colonia. Basándose en los mencionado anteriormente, Rortais y col. (2005) artículo, una abeja nodriza consume en promedio 65 mg de polen y una larva obrera 5,40 mg. En consecuencia, una abeja consume en su vida como mínimo 70,4 mg. Esta es la estimación promedio; también se han notificado cantidades dobles. En el estudio de Crailsheim y col mencionado anteriormente, el consumo de polen por día fue de 3,4 a 4,3 mg. En una vida útil de 30 días de la abeja en verano, esto equivale aproximadamente a 115 mg en su vida útil. Otro enfoque para evaluar el consumo de polen se presenta en el artículo de revisión de Keller y col., (2005a). Es la evaluación del consumo de polen basándose en nitrógeno (N) en crías y abejas. El polen es la única fuente de N en la dieta de las abejas. Para convertir N en polen, se supone que la proteína del polen contiene el 16 % de nitrógeno, que el polen contiene el 20 % de proteína y que la eficiencia digestiva es del 80 %. Entonces, para 10 mg de N, se necesitan 62,5 mg de proteína; para 62,5 mg de proteína se necesitan 312,5 mg de polen y por la eficacia del proceso alimentario se necesitan 390,6 mg de polen consumido por la abeja. Teniendo todo esto en cuenta, se necesitan 125 mg de polen para criar una abeja. El N en las abejas después de la emergencia aumenta en 0,86 mg. Los 0,86 mg de N corresponden a 39 mg de polen. Por lo tanto, en total cada abeja requirió mínimamente $125 + 39 = 164$ mg de polen ya que no se tiene en cuenta la pérdida de N por defecación. Contando el período activo y de reproducción de la abeja en 200 días y el promedio de vida de una abeja de 35 días (Steen y col, 2012), se necesitan $200/35 = 6$ generaciones. Para mantener una colonia de 15000 abejas de promedio, se crían $15000 \times 6 = 90000$ abejas. El número de abejas criadas anualmente y la cantidad calculada de polen necesaria se resumen en la tabla 1 [de este artículo].

Los 35 kg mencionados al principio son la cantidad necesaria para una colonia grande y es una estimación óptima. Cantidades que varían entre 15 y 25 parecen más realistas. Nuevamente, todo depende del tipo de polen, el medio ambiente, el desarrollo de la colonia y la presencia o no de trampa de polen. Privar a las colonias del polen estimuló la recolección de polen. Corresponde al apicultor mantener un flujo de polen adecuado. Para comprobar si las reservas de polen son suficientes, basta con hacer una estimación aproximada de la superficie/número de células de pan de abeja en una colonia. Una colonia sana de tamaño normal necesita/consume por día entre 0,5 y 2 dm² (200 - 800 celdas de pan de abeja medio llenas). Otra estimación sencilla es pesar la cosecha de la trampa de polen. Hay que tener en cuenta que la eficacia de la trampa de polen varía entre el 10 y el 50 % (Keller y col., 2005b).

La Tabla 1 de Roessink y col 2021, Beebread consumption by honeybees is fast: results of six-week field study, Journal of Apicultural Research, 60:659-664, muestra un cálculo de ejemplo de las necesidades de polen de una colmena de abejas en función del consumo de polen por día para un tamaño dado de colonia. Las larvas y las abejas nodrizas son las consumidoras de polen. Las abejas obreras mayores consumen miel/néctar.

El polen representa la fuente natural de alimento para las abejas y los insectos que se alimentan de polen. La planta no optimiza el polen para alimentar a los insectos (está optimizado para el uso de la planta = fertilización). El polen de diferentes especies contiene una amplia gama de diferentes moléculas de proteínas, lípidos, esteroides y antioxidantes a concentraciones muy diferentes. Por lo tanto, aún no se sabe cuáles de estos componentes son beneficiosos y cuáles son moléculas de defensa de las plantas para impedir que los insectos se alimenten de polen y cuáles no son ingredientes importantes para la nutrición de los insectos y, por lo tanto, cuáles es importante incluir y cuáles excluir de una dieta artificial.

Los inventores demostraron que la adición a una dosis calculada para una colonia de 30000 abejas de entre 0,14 y 12 gramos de isofucosterol durante un período de 2 semanas es beneficiosa para el rendimiento de la colonia y de las

abejas (como se observa en la producción de crías de abeja y otros parámetros de aptitud tales como la longevidad). Esta dosis representa una concentración del 0,01 % al 1,76 % de isofucosterol en una tortita de 680 gramos que alimenta durante un período de dos semanas a una colonia de 30000 abejas.

Calculado por cada abeja que consume suplemento no polínico en la colmena (= las abejas nodrizas = 50 % de las abejas en la colmena); esto representa una dosis de 140 mg/15000 abejas = 0,009 mg a 12000 mg/15000 abejas = 0,8 mg de isofucosterol o fucosterol por abeja nodriza por 14 días en la colmena (una abeja nodriza pesa 110 mg). Esto representa en % del peso corporal por día una dosis de isofucosterol o fucosterol de $0,009/110 \times 100/14 = 0,0006$ % a $0,8/110 \times 100/14 = 0,052$ %.

Además, los inventores muestran que la dosis de isofucosterol o fucosterol del 0,0006 % al 0,052 % del peso corporal por día es beneficiosa para la producción de larvas y adultos de otros insectos que se alimentan de polen tales como abejorros, adultos y larvas de mosca soldado negra; adultos de escarabajos coccinélidos, sirfidos y otros insectos que se alimentan de polen. En particular, es importante para la fecundidad y fertilidad de los adultos y para un mayor porcentaje de eclosión y supervivencia de larvas jóvenes.

La forma de administración afecta la eficiencia de la absorción y la biodisponibilidad.

Métodos de administración

La administración a una colonia de abejas u organismo puede ser sólo durante el período donde se necesita un efecto deseado: tan breve como una sola administración para mejorar, inducir o apoyar el desarrollo normal de las crías cuando las abejas salen del invierno, para inducir o apoyar la cría de reinas o cuando un insecto necesita producir gametos o huevos, puede ser durante periodos más largos cuando las abejas se alimentan de un cultivo que produce polen nutricionalmente pobre (tal como arándanos, zanahorias,...) o durante periodos de escasez de polen en primavera, verano u otoño. Para colonias de diferente tamaño, la dosis se puede ajustar proporcionalmente a la cantidad de abejas o abejas nodrizas presentes.

Esta dosis quincenal de isofucosterol se puede administrar de diferentes formas a una colmena o a los insectos alimentados: Esta dosis de isofucosterol se puede administrar a la colonia en diferentes formulaciones (incorporada en forma suspendida, disuelta o emulsionada de manera que las abejas o el animal objetivo la ingieran fácilmente):

- incorporada en las tortitas estándar de suplemento de proteína o polen de 1,5 a 3 libras administradas por 2 semanas a una colmena de 30000 abejas en donde en una realización la composición comprende isofucosterol o fucosterol o mezclas de los mismos en una cantidad del 0,01-5 % de la dieta, preferiblemente del 0,01-2 %, aún más preferiblemente del 0,01-1 %, y aún más preferiblemente del 0,03-0,9 % para abejas y del 0,03-0,8 % para abejorros como un porcentaje del peso total de la composición sustituta del polen.

- más concentrada en tortitas pequeñas en donde la concentración es mucho mayor, por ejemplo, hasta un 33 % de esteroles incorporado o mezclado con componentes que inducen a las abejas a comer la formulación, tales como polen, azúcar, aceite/grasa, miel o proteínas o una mezcla de los mismos, o

- esparcida en la colonia o alimentada fuera de la colonia en una estación de alimentación como polvo o pasta con el isofucosterol incorporado o mezclado con componentes que inducen a las abejas a comer la formulación, tales como polen, azúcar, aceite/grasa, miel o proteína o una mezcla de los mismos,

- esparcida en la colonia o alimentada fuera de la colonia en una estación de alimentación un jarabe o líquido en donde el isofucosterol se incorpora o se mezcla con componentes que inducen a las abejas a comer la formulación, tales como polen, azúcar, aceite/grasa, miel o proteína o una mezcla de los mismos,

- En otra realización, la dosis de moléculas de esteroles se puede administrar a través de un dispositivo que inyecta la composición de esteroles en la colonia, por ejemplo, de forma preprogramada.

- O cualquier método que pueda usarse para administrar la dosis indicada de modo que las abejas ingieran una sustancia química o un nutriente conocido por los expertos en la técnica.

En otro aspecto, la mezcla de esteroides no se administra a través de una tortita o una dieta similar, sino que la multiplicidad y proporción de esteroides anteriores se disuelven en un medio acuoso u oleoso o lodo de nutrientes u otra forma comestible y se administran a la colonia como un líquido para beber, pasta líquida o aerosol en la colmena o en polvo. En esta realización, la concentración en peso seco de los esteroides puede ser del 0,01 al 100 % del peso seco (ya que el portador de agua se evapora del medio administrado).

Efecto de la alimentación con isofucosterol combinado con otros esteroides:

Los inventores demuestran además que una combinación de isofucosterol y/o colesterol, y/o 24-metilencolesterol, y/o beta-sitosterol, y/o estigmasterol y/o campesterol representa

- (1) una mejora con respecto a la alimentación con isofucoesterol solo,
- (2) una mejora con respecto a la alimentación con combinaciones de los esteroides anteriores sin isofucoesterol,
- (3) una mejora con respecto a la alimentación con combinaciones de los esteroides anteriores que carecen de colesterol o 24-metilcolesterol, o campesterol, o estigmasterol o beta-sitosterol.

Sorprendentemente, una colonia de abejas alimentada con una dieta que contiene isofucoesterol y una multiplicidad de esteroides que incluyen 24-metilcolesterol, colesterol, isofucoesterol y campesterol, beta-sitosterol o estigmasterol puede favorecer el desarrollo de las crías durante más de 4 ciclos. La misma dieta sin isofucoesterol no puede hacerlo. Es importante destacar que en nuestros experimentos la tasa de producción de crías se estabiliza a un nivel estable. Esta trayectoria demuestra que nuestra dieta proporciona un nivel adecuado de nutrientes esenciales que permite una producción indefinida de crías. Esto significa que dicha dieta puede actuar como un reemplazo del polen para la colonia de abejas durante este período. Por lo tanto, el isofucoesterol en esta dieta hace que la apicultura sea independiente de los recursos de polen en un entorno natural o agrícola. En los abejorros, esta dieta con una multiplicidad de esteroides hace posible que las abejas reinas fundadoras críen larvas hasta la edad adulta, sin necesidad de polen.

La creación de dicha receta no es obvia en la literatura. Por ejemplo, Rasmont y col. (2005 J Econ Ent 98(3): 656-663) interpretaron los datos de Herbert y col. (1980) donde las abejas fueron alimentadas con dietas artificiales que contenían sólo un esteroide para indicar que el sitosterol y el estigmasterol eran un antialimentario para las abejas y no eran esenciales.

Los inventores ampliaron la utilidad de la dieta inventada de las abejas a otros insectos que se alimentan de polen con relevancia comercial en el control biológico (por ejemplo, escarabajos coccinélidos), producción de biomasa de insectos (por ejemplo, mosca soldado negra) y polinización (sírfidos).

Existe una necesidad urgente de cambios en la cría de animales y la alimentación del ganado que aprovechan materiales de desecho creados durante la producción de alimentos. Además, los métodos para proteger los cultivos de plagas agrícolas que no dependen de agroquímicos, tales como la producción y liberación de insectos depredadores naturales tales como coccinélidos y sírfidos, son un medio importante para crear estrategias integradas de gestión de plagas que reduzcan los impactos ambientales y protejan la biodiversidad.

Un importante medio emergente para aprovechar los desechos agrícolas industriales es el cultivo de larvas de mosca en material de desecho, tal como la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*). Las larvas de mosca soldado negra son omnívoras generalistas y pueden alimentarse con desechos vegetales o animales, incluidas heces, lo que las convierte en un medio ventajoso para convertir la biomasa residual en pienso para el ganado. En la producción agrícola, estas larvas y pupas se usan como alimento para aves de corral y peces. Estos insectos adquieren nutrientes de la dieta que consumen cuando son larvas, los cuales son valiosos aditivos a la cadena alimentaria, tales como ácidos grasos y esteroides (Boukid y col. 2021 Insects 12, 672. <https://doi.org/10.3390/insects12080672>). Sin embargo, las dietas como las de los desechos humanos industriales no se han optimizado para las moscas soldado negras y, a menudo, carecen de nutrientes esenciales clave. Por ejemplo, el tiempo de desarrollo, el tamaño y la mortalidad de las larvas alimentadas con BSF están fuertemente influenciados por la naturaleza del alimento en donde se cultivan (Lalander y col. 2019. J Cleaner Production, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.017>). Los tiempos de desarrollo retardados debido a dietas subóptimas reducen la eficiencia en los sistemas de cría.

Otro problema con los métodos de cría existentes son las dietas subóptimas para las fases del ciclo vital. Los insectos holometábolos a menudo consumen diferentes alimentos cuando son larvas y adultos. Cada fase del ciclo vital tiene necesidades nutricionales sustancialmente diferentes. Lo que se alimenta a las larvas en laboratorios o entornos de producción industrial puede no ser adecuado para la fecundidad y supervivencia de los adultos.

En la naturaleza, las larvas de BSF comen material orgánico en descomposición y los adultos de BSF comen polen floral. Al igual que las larvas, las BSF adultas también requieren proteínas; producen más huevos cuando se alimentan con proteínas (Bertinetti y col. 2019. Journal of Insect Science 19(1): 19; 1-7). Aunque la proteína mejora el rendimiento, el tamaño de la masa de los huevos y la eclosión de los huevos en moscas criadas en laboratorio alimentadas con proteínas es menos de la mitad que la de las moscas alimentadas en estado silvestre (Bertinetti y col. 2019). Es probable que en las dietas de laboratorio falten ciertos nutrientes que aún no han sido identificados (Bertinetti y col. 2019). El rendimiento de los adultos es importante porque los adultos producen huevos que son una etapa limitante en la producción industrial (Cickova y col. 2015 Waste Management Volumen 35, enero de 2015, 68-80).

Bertinetti y col. (2019) especulan que el polen tiene nutrientes clave que la BSF necesita. Recientemente, se ha demostrado que las moscas soldado negras tienen un rendimiento de oviposición mucho mejor cuando se alimentan con una dieta que contiene polen floral. Thin y Kanoi. 2022. JARQ 56 (2): 211-217. Por ejemplo, la oviposición y la eclosión de huevos se duplican y la esperanza de vida aumenta en un 30 % cuando las hembras de mosca soldado

negra se alimentan con polen (Thin y Kanoi 2022). Sin embargo, se desconocen los componentes del polen que provocan este cambio.

La alimentación con polen de otros insectos beneficiosos usados en la agricultura también afecta la fecundidad de los insectos adultos. Esto es particularmente importante en insectos cultivados para control biológico, tales como los escarabajos coccinélidos (*Coccinellidae*) y los sírfidos (*Syrphidae*). Por ejemplo, las larvas del escarabajo coccinélido se alimentan de polen cuando los pulgones, su presa preferida, no están disponibles (Berkvens y col. 2010 Eur. J. Entomol. 107: 189-195, 2010, Shuldiner-Harpez y col. 2017 J Insect Behav 30: 432-438). Es importante destacar que se ha demostrado que la alimentación con polen de los escarabajos adultos es necesaria para la fertilidad; los escarabajos machos que no se alimentan de polen no pueden producir espermatozoides viables (Ugine y col. 2019 Ecology Letters 22: 275-283). La alimentación con polen también es un componente esencial de la fecundidad de los sírfidos (*Syrphidae*), que son importantes polinizadores y depredadores de pulgones (Hickman y col. 1995 New Zealand Journal of Zoology 22: 387-392). Las hembras de los sírfidos son muy selectivas en cuanto a los tipos de polen de que se alimentan; el tipo de polen influye en su fecundidad y en la supervivencia de su descendencia (Amorous-Jiménez y col. 2014 BioControl 59:427-435).

El polen contiene muchos fitosteroles diferentes que no se encuentran en otras fuentes animales o vegetales terrestres (Zu y col. 2020. New Phyt 230: 1169-1184). Estos esteroides tienen una amplia gama de funciones dentro y fuera de la planta. Las plantas producen muchos fitosteroides para inhibir la alimentación de los insectos en la planta.

Los presentes inventores han establecido sorprendentemente que el isofucosterol, un esteroide común que se encuentra en el polen, es un nutriente esencial para los insectos que se alimentan de polen. El isofucosterol administrado a través de una dieta libre de polen aumenta el rendimiento de la BSF adulta y larvaria. Los presentes inventores también han identificado que el principal componente esteroide de los pólenes seleccionados por las hembras adultas de sírfidos es el isofucosterol. Los presentes inventores han descubierto además que la combinación de isofucosterol y al menos un esteroide adicional, en particular colesterol, 24-metilcolesterol y otros fitosteroides, en particular campesterol, beta-sitosterol o estigmasterol, proporciona un mayor crecimiento y/o rendimiento de salud en muchos invertebrados, en particular insectos holometábolos que incluyen abejas y moscas, polillas/mariposas y escarabajos que se alimentan de polen.

Los inventores establecieron además que alimentar con una combinación de isofucosterol, colesterol, 24-metilcolesterol, beta-sitosterol, estigmasterol y campesterol representa

(1) una mejora con respecto a isofucosterol solo,

(2) una mejora con respecto combinaciones de los esteroides anteriores sin isofucosterol,

(3) una mejora con respecto a combinaciones de los esteroides anteriores que carecen de colesterol o 24-metilcolesterol, campesterol, estigmasterol o beta-sitosterol.

Sorprendentemente, alimentar a adultos de escarabajo o mosca soldado negra cultivados con una dieta que contiene isofucosterol y una mezcla de esteroides mejora el rendimiento de la puesta y la eclosión de huevos y la longevidad de los adultos. Se puede obtener el mismo efecto alimentando a las larvas que producirán los reproductores con una dieta que contenga isofucosterol y una mezcla de esteroides (los adultos heredan reservas nutricionales sustanciales de su fase larval/pupal). Esto significa que dicha dieta puede actuar como reemplazo del polen y como forma de nutrición complementaria para las colonias de insectos criados en laboratorio. Por lo tanto, esta dieta permite optimizar los tiempos de desarrollo larvario y la fecundidad de adultos en cultivos industriales de insectos benéficos.

Esto no es obvio en la literatura. Svoboda, un líder mundial e investigación de esteroides de insectos, enseña que en todas las especies excepto dos, el colesterol satisface las necesidades nutricionales de esteroides cuando está presente en la dieta (Svoboda. 1999. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 34(1):49-57). Su resumen no reconocía la necesidad de los esteroides del polen como nutrientes esenciales para muchos insectos que se alimentan de polen. No reconoció el isofucosterol como un esteroide necesario para el crecimiento de las larvas holometábolos o la fecundidad de los insectos adultos.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención es un método para alimentar abejas tales como abejas y abejorros y animales que consumen polen o algas tales como escarabajos coccinélidos, mosca soldado negra, sírfido, ostras, camarones y larvas de peces que comprende:

- proporcionar una formulación sustituta del polen que comprende una cantidad nutricionalmente eficaz de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos;

- administrar la formulación sustituta del polen a animales tales como abejas y abejorros y animales que consumen polen o algas tales como escarabajos coccinélidos, mosca soldado negra, sírfido, ostras, camarones y larvas de peces.

Cantidad nutricionalmente eficaz

En un aspecto preferido, la dosificación de administración de la formulación sustituta del polen que contiene isofucosterol o fucosterol o una mezcla de los mismos y los esteroides adicionales del grupo que consiste en colesterol, 24-metilcolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol, da como resultado una dosificación quincenal total del grupo anterior de esteroides a una colonia de 30000 abejas de 0,2 a 48 gramos, preferiblemente de 0,4 gramos a 36 gramos y aún más preferiblemente de 0,6 a 20 gramos, con lo que el 100 % de los esteroides en las dosis indicadas anteriormente se dividen de la siguiente manera: isofucosterol - fucosterol es el 10-60 % de la dosis de esteroles; representando el resto de los esteroides o la multiplicidad de esteroides el resto de la dosis total de esteroides.

En una realización preferida, las dosis del 100 % del grupo de esteroides que consiste en isofucosterol/fucosterol y/o colesterol, y/o 24-metilcolesterol, y/o los fitosteroides que consisten en campesterol y/o estigmasterol y/o beta-sitosterol en la dieta para una colonia de 30000 abejas durante un período de 14 días es de 0,3 gramos a 20 gramos de una composición de la cual el 10-60 % es isofucosterol y/o el 0-50 % es colesterol y/o el 0-50 % 24-metilcolesterol y/o el 0-50 % de una mezcla de beta-sitosterol y/o estigmasterol y/o campesterol.

Esto representa un intervalo de dosis por día de la "composición de esteroides" del 0,001 % (Fórmula = $0,3 / 14 / 1650 \times 100$) del peso corporal del insecto que consume el alimento al 0,087 % (Fórmula = $20 / 14 / 1650 \times 100$) del peso corporal del insecto que consume el alimento, con lo que de la composición de esteroides el 10-60 % es isofucosterol y/o el 0-50 % es colesterol y/o el 0-50 % 24-metilcolesterol y/o el 0-50 % de una mezcla de beta-sitosterol y/o estigmasterol y/o campesterol.

Este cálculo se basa en que el 50 % de las abejas son abejas nodrizas y cada una pesa 110 mg.

La dosis global se puede adaptar proporcionalmente para insectos, invertebrados, colonias de insectos más grandes o más pequeños e intervalos de alimentación más cortos o más largos, por lo que la dosis unitaria indicada aquí es para un período de 14 días de una colonia de 30000 abejas. (véase la tabla anterior de Keller y col., 2005b).

Las mismas composiciones e intervalos de dosis se aplican a otros insectos que se alimentan de polen.

En otra realización, algunos o todos estos restos de esteroles pueden administrarse como un profármaco tal como un glucósido de esteroles soluble en agua o un esteroles sulfato o sal similar, o una forma soluble en lípidos tal como un éster de esteroles u otras formas de profármaco similares en donde la dosis se ajusta para representar la fracción del peso molecular del núcleo de esteroles respectivo en el peso molecular total de la molécula de esteroles conjugado.

Los diferentes métodos de administración descritos anteriormente para isofucosterol se pueden aplicar al isofucosterol y a los otros esteroides descritos en la presente memoria.

Para calcular la dosis de isofucosterol y grupos de esteroides que se administrarán a otros insectos que se alimentan de polen (véase anteriormente) como % de peso corporal por día, se usa la siguiente fórmula:

- $[30000 / 2] \times 0,110 \text{ g}$ = "Peso de los insectos consumidores del suplemento no polínico (abejas nodrizas y/o larvas) en una colmena de 30000 abejas" (a 0,11 gramos por abeja nodriza y/o larvas; a 30000 abejas en la colmena, el 50 % de las cuales son abejas nodrizas y/o larvas = 1650 gramos)

- $["\text{Dosis de un esteroles determinado o grupo de esteroides administrados en un período de 14 días a una colonia de 30000 abejas}"] / 14$ = "dosis diaria de esteroides administrados"

- $["\text{Dosis diaria administrada en gramos}"] / ["\text{Peso de los insectos que consumen el suplemento no polínico (abejas nodrizas y larvas) en una colmena de 30000 abejas en gramos}"] \times 100$ = "% del peso corporal de esteroles(es) administrado(s) por día por gramo de peso corporal del insecto"

- Cantidad a dosificar de esteroides a una colonia de abejas:

$["\% \text{ del peso corporal de esteroides administrados por día por gramo de peso corporal del insecto}"] \times ["\text{peso de los insectos (abejas nodrizas y larvas) que se alimentarán}"]$

En promedio, véase la tabla anterior, 2/3 del polen consumido en una colonia lo consumen las abejas nodrizas y 1/3, las larvas presentes (véase la tabla anterior).

En una realización preferida en donde el grupo de esteroides que consiste en isofucosterol/fucosterol y/o colesterol y/o 24-metilcolesterol, y/o los fitosteroides que consisten en campesterol y/o estigmasterol y/o beta-sitosterol se dosifica por medio de una tortita de 1,5 a 3 libras por 14 días para una colonia de 30000 abejas, la tortita contiene

- isofucosterol (el 0,01-2 %, preferiblemente el 0,01-1 %, más preferiblemente el 0,03-0,6 % del peso seco del pienso) o fucosterol (el 0,01-2 %, preferiblemente el 0,01-1 %, más preferiblemente el 0,03-0,6 % del peso seco del pienso) o una mezcla de los mismos (total del 0,01-2 %, preferiblemente el 0,001-1 %, más preferiblemente el 0,03-

0,6 % del peso seco del pienso) y al menos uno de los esteroides adicionales que se seleccionan del grupo siguiente (concentraciones en % del peso seco del pienso); dando como resultado una multiplicidad de isofucosterol o fucosterol o una mezcla de los mismos con al menos uno de los esteroides adicionales:

- Colesterol el 0,001-2 %, preferiblemente el 0,001 %-1,5 %, más preferiblemente el 0,06-1,2 %, y/o
- 24-Metilencolesterol el 0,001-2 %, preferiblemente el 0,001 %-1,5 %, más preferiblemente el 0,06-1,2 % y/o
- Beta-sitosterol el 0,001-2 %, preferiblemente el 0,001-1 %, más preferiblemente el 0,03-0,6 % y/o
- Campesterol el 0,001-2 %, preferiblemente el 0,001-1 %, más preferiblemente el 0,02-0,35 % y/o
- Estigmasterol el 0,001-2 %, preferiblemente el 0,001-1 %, más preferiblemente el 0,01-0,2 % y/o

o cualquier combinación de los mismos, con lo que la concentración total de esteroides está en un intervalo del 0,01 al 4 % (peso seco).

En otro aspecto, la composición se administra a invertebrados de los géneros *Apis* o *Bombus*, en particular abejas o abejorros.

En otro aspecto, la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos o del al menos un esteroide adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, estigmasterol, campesterol y beta-sitosterol es un tejido sustituto del polen de una o más especies vegetales seleccionado del grupo que consiste en hojas, tallos, raíces, tubérculos, flores, semillas, cortezas y frutos y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos o del al menos un esteroide adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol es una fuente animal, síntesis química o síntesis enzimática in vitro, o un microorganismo natural o metabólicamente modificado tal como levadura, algas o diatomeas o una combinación de dichas fuentes.

En otro aspecto, la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos o del al menos un esteroide adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, estigmasterol, campesterol y beta-sitosterol es un extracto, un aceite, o un refinamiento de un tejido sustituto del polen de una o más especies vegetales o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos o del al menos un esteroide adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, estigmasterol, campesterol y beta-sitosterol es un tejido sustituto del polen de una o más especies vegetales seleccionadas del grupo que consiste en *Solanaceae*, *Poaceae*, *Ranunculaceae*, *Fabaceae*, *Corylaceae*.

En otro aspecto, la fuente de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos es una fuente sustituta del polen seleccionada del grupo que consiste en:

- una especie de alga marina o de agua dulce, en particular un extracto, un aceite o un refinamiento de *Ulva lactuca*;
- una especie de diatomea marina, en particular un extracto, un aceite o un refinamiento de *Thalassiosira pseudonana*, *Thalassiosira rotula* o *Chaetoceros muelleri*; y
- un hongo, en particular un extracto, un aceite o un refinamiento de *Saccharomyces cerevisiae* o *Yarrowia lipolytica*.

En otro aspecto, el isofucosterol o fucosterol se sintetiza química o enzimáticamente o se obtiene mediante organismos hospedadores genéticamente modificados tales como hongos, bacterias o algas.

En otro aspecto, la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y/o el al menos un esteroide adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, estigmasterol, campesterol y beta-sitosterol se selecciona del grupo que consiste de algas, plantas, hongos, algas, diatomeas y combinaciones de los mismos y en donde la fuente del isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y del al menos un esteroide adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, estigmasterol, campesterol y beta-sitosterol es un tejido sustituto del polen.

En otro aspecto, el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y/o el al menos un esteroide adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol se proporciona a una colonia de abejas eusociales, o primitivamente eusociales, a partir de una fuente sintética.

En otro aspecto, el isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos y/o el al menos un esteroles adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol se proporciona como parte de una composición sustituta del polen. en donde la composición sustituta del polen comprende:

- proteínas en una cantidad del 10 % en peso al 50 % en peso, preferiblemente del 15 % en peso al 40 % en peso,
- ácidos grasos en una cantidad del 1 % en peso al 20 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso al 12 % en peso,
- carbohidratos en una cantidad del 20 % en peso al 90 % en peso, preferiblemente del 30 % en peso al 70 % en peso,
- opcionalmente vitaminas, y
- opcionalmente minerales,

en donde la cantidad total de componentes y opcionalmente componentes adicionales suman el 100 % en peso y en donde los % en peso se refieren al peso seco total de la composición.

Administración mediante un experimento líquido o semilíquido:

En otro aspecto, el isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos y/o el al menos un esteroles adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol se proporciona como parte de un suplemento alimenticio líquido o semilíquido al que opcionalmente se añade un estimulante del apetito tal como azúcar, o cualquier otro estimulante del apetito, en donde la composición de suplemento alimenticio líquido o semilíquido comprende:

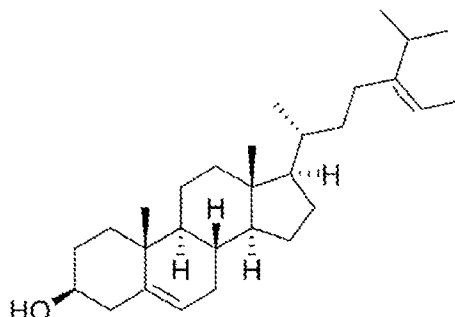
- opcionalmente proteínas en una cantidad del 10 % en peso al 50 % en peso, preferiblemente del 15 % en peso al 40 % en peso,
- opcionalmente ácidos grasos en una cantidad del 1 % en peso al 20 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso al 12 % en peso,
- opcionalmente carbohidratos en una cantidad del 20 % en peso al 90 % en peso, preferiblemente del 30 % en peso al 70 % en peso,
- opcionalmente vitaminas, y
- opcionalmente minerales,
- opcionalmente agua u otro disolvente

en donde la cantidad total de componentes y opcionalmente componentes adicionales suman el 100 % en peso y en donde los % en peso se refieren al peso seco total de la composición.

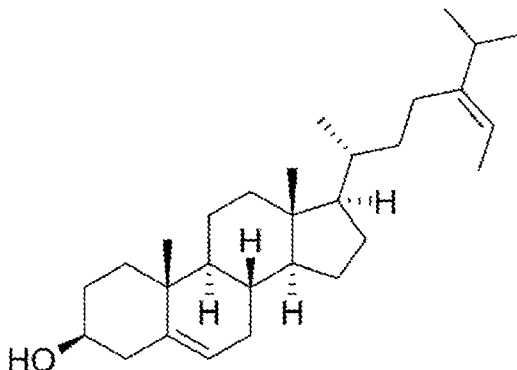
En otro aspecto, la composición está esencialmente libre de polen.

Isofucoesterol y fucoesterol

El isofucoesterol es un delta-5 esteroles de fórmula estructural (Figura I):



El fucosterol es un delta-5 esteroide de fórmula estructural (Figura 2):



5 La estructura del isofucosterol/fucosterol se describe en <https://en.wikipedia.org/wiki/Isofucosterol> y <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281326>

24-Metilencolesterol

10 La estructura del 24-metilencolesterol se describe aquí: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24-Methylenecholesterol>

15 El isofucosterol y el 24-metilencolesterol fueron sintetizados por químicos expertos en la técnica de la síntesis orgánica y el producto final se purificó hasta una pureza del 99 % y se caracterizó mediante LCMS, NMR y cromatografía líquida (Figura 3, 4, 5). El isofucosterol y el 24-metilencolesterol también se pueden purificar a partir de fuentes naturales, tales como el polen recolectado por las abejas. El colesterol era de una fuente comercial. El B-sitosterol y otros esteroides se purificaron a partir de fitosteroides de soja disponibles comercialmente usando métodos estándar.

Conjugados de esteroide fisiológicamente activos

20 Los conjugados de esteroide fisiológicamente activos significan conjugados de esteroide que pueden ser metabolizados por invertebrados o por organismos de acuicultura o vegetales.

25 Las moléculas de esteroide 24-metilencolesterol, beta-sitosterol, colesterol, campesterol, isofucosterol/fucosterol y estigmasterol se pueden suministrar a los alimentos en diferentes conjugados y como una mezcla de conjugados.

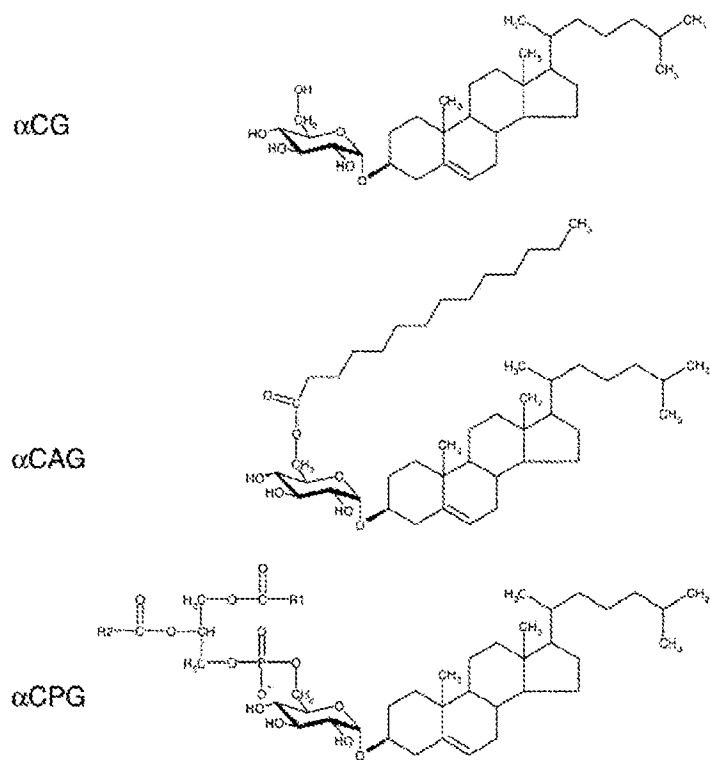
La concentración de esteroide administrada en la mezcla de conjugados se calcula de la siguiente manera:

30 $\text{'Dosis de conjugado de esteroide Peso molecular del conjugado de esteroide' / 'Peso molecular de esteroide' X 'Dosis de esteroide deseada' = 'dosis de conjugados de esteroide deseada'}$.

Son ejemplos de los diferentes conjugados de esteroides:

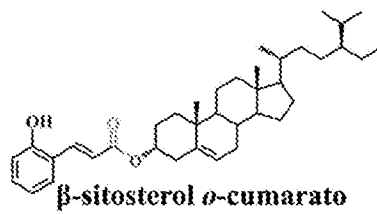
- 35
 - como un alcohol libre
 - esterificado con un ácido graso (tal como, pero sin limitarse a, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, oleico, esteárico, linolénico).
- 40
 - unido por medio del grupo alcohol a un alcohol graso (éteres alquílicos de esteroide),
 - esterificado por un ácido tal como el ácido sulfúrico (esteroide sulfato)
- 45
 - unido a un glúcido (lo que da como resultado un esteroide glucósido). El grupo esteroide en la posición 3-OH puede ser cualquier esteroide del grupo de esteroides 24-metilencolesterol, beta-sitosterol, colesterol, campesterol, isofucosterol/fucosterol, estigmasterol. El azúcar glucosa puede ser glucosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa. Una realización preferida es el éster de glucosa del grupo de los esteroides.
- 50
 - esterificado a ésteres de g trans-hidroxycinnamato, ferulato (4-hidroxí-3-metoxycinnamato) y p-cumarato (consulte la figura a continuación de campesteril ferulato como ejemplo de conjugados de esteroide fenolato). Una realización preferida es el éster de ácido cumárico del grupo de los esteroides.

Son ejemplos preferidos de conjugados de esteroide:

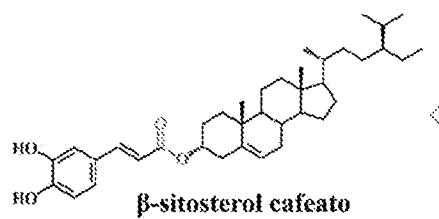
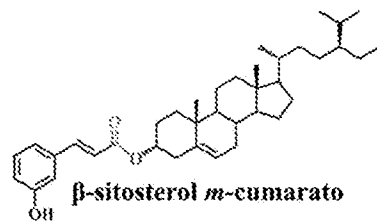
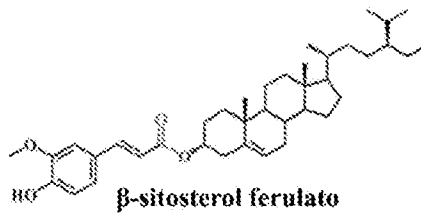


5

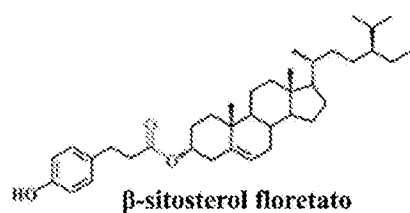
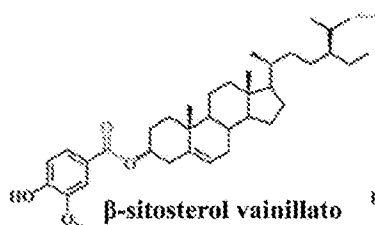
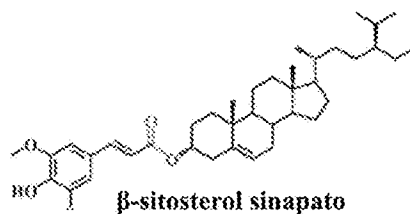
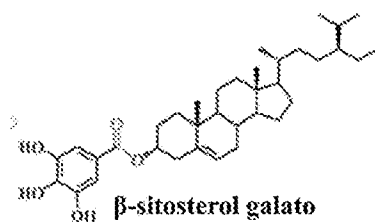
Ejemplos de conjugados de beta-sitosterol incluyen:



10

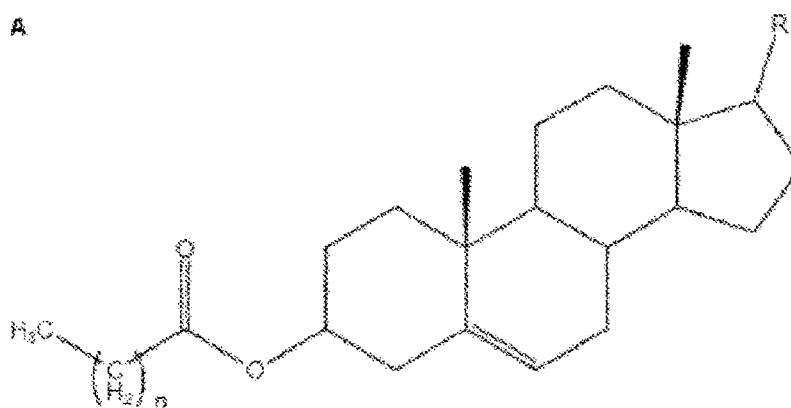


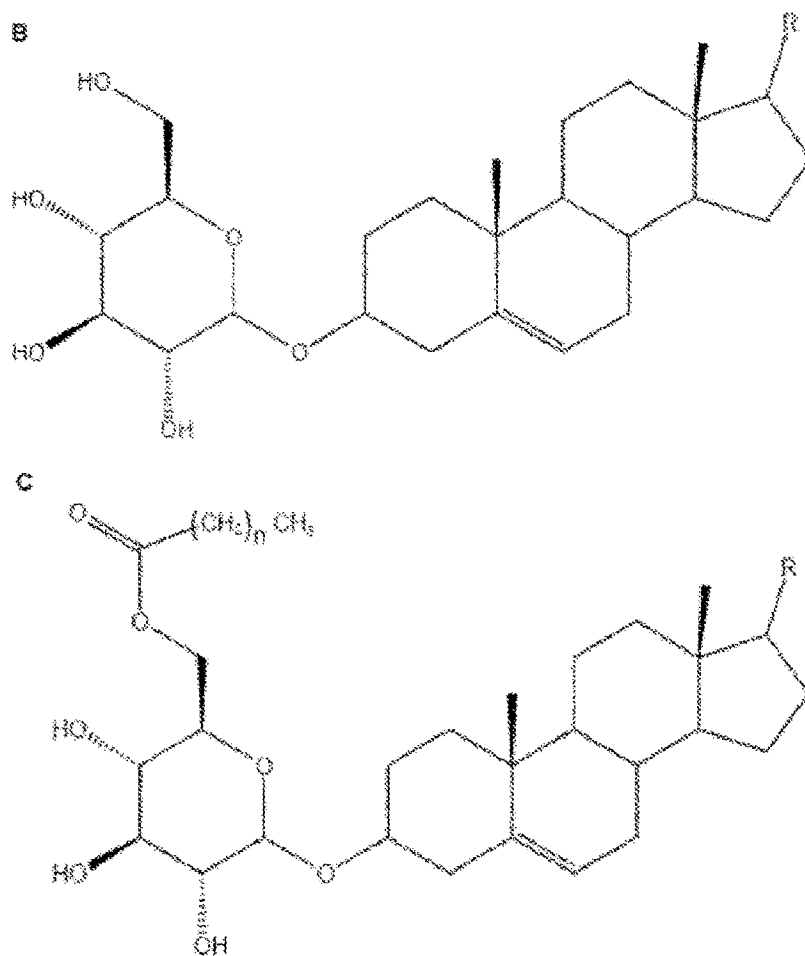
15



De manera similar a los ejemplos de beta-sitosterol anteriores, se pueden usar conjugados con 24-metilcolesterol, isofucoesterol, campesterol o colesterol o estigmasterol.

Otros conjugados de esteroles preferidos se encuentran naturalmente en las plantas, tales como **(A)** éster esteroide (SE), **(B)** esteroide glucósido (SG), **(C)** acil esteroide glucósido (ASG) con la fórmula estructural:

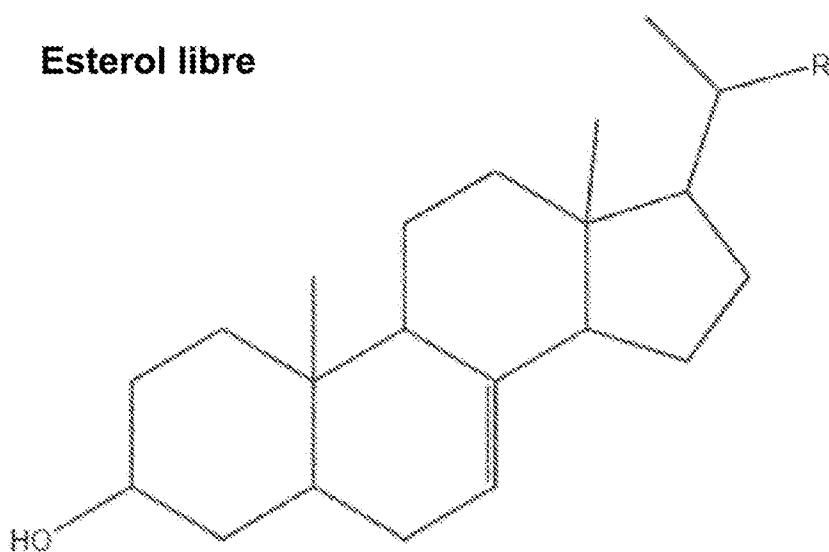




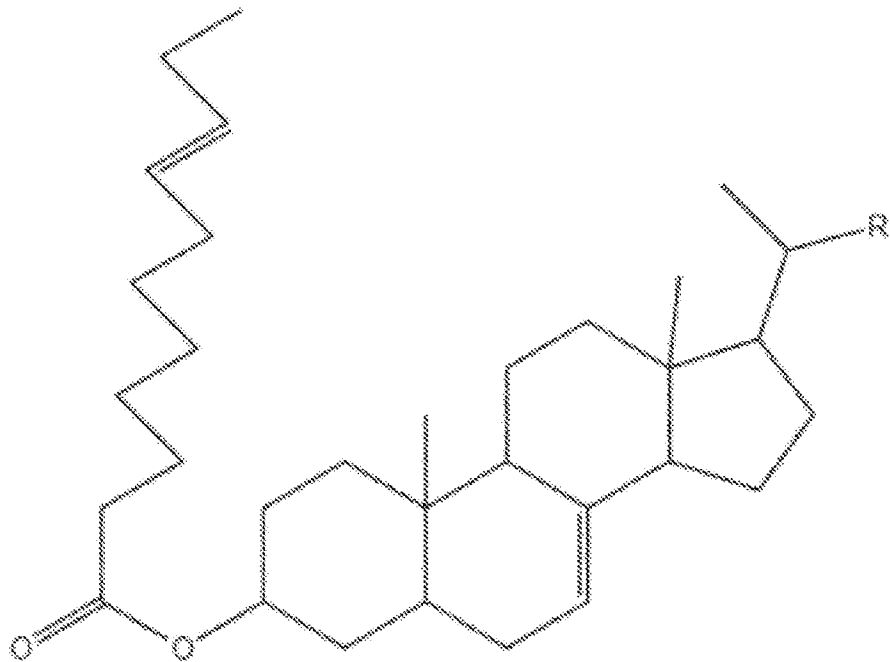
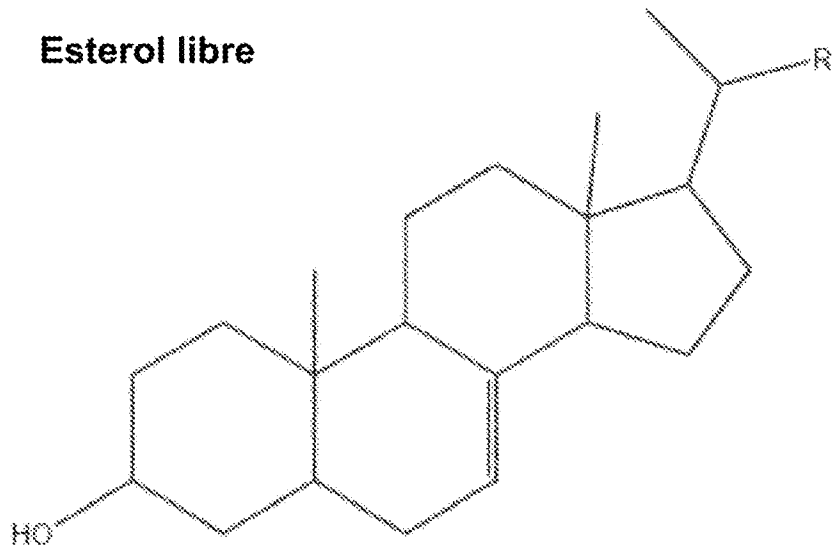
- 5 Cadena lateral R, que en el caso de esta patente puede ser del grupo de colesterol, isofucoesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol.

Otros ejemplos incluyen esteril glucósido, éster esterílico y esteril glucósido acetilado.

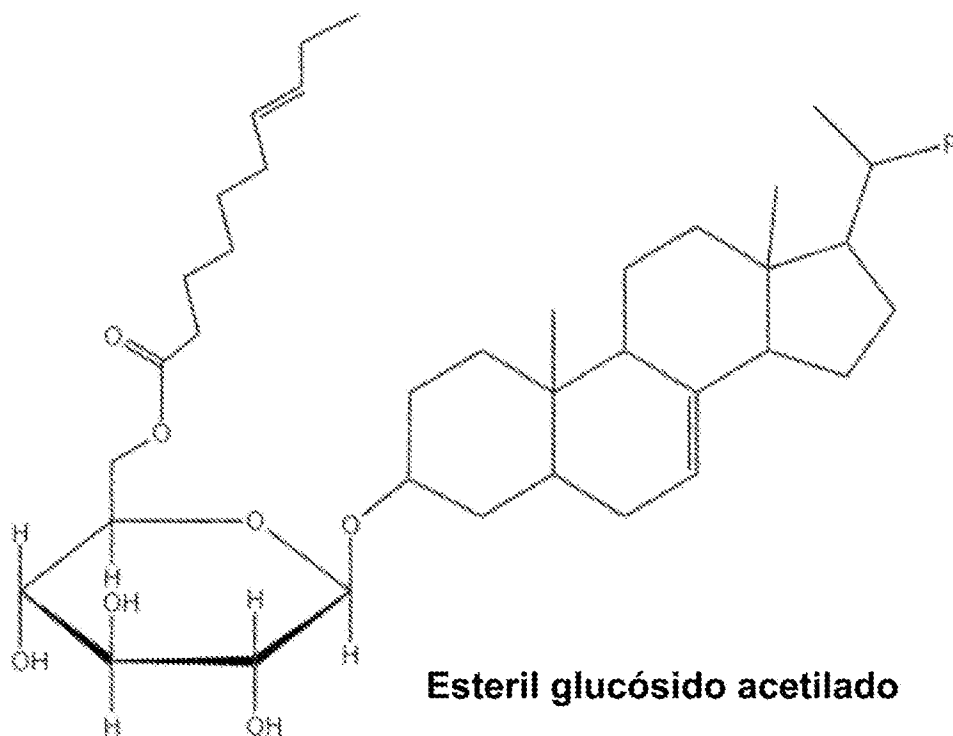
Esterol libre



Esterol libre

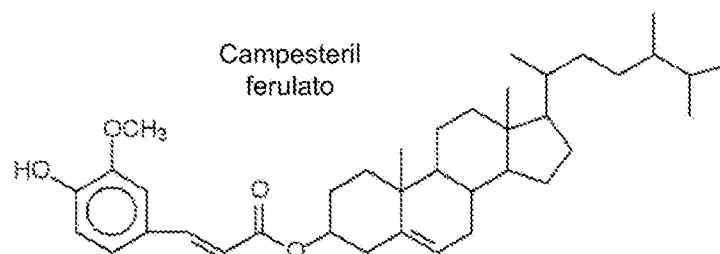
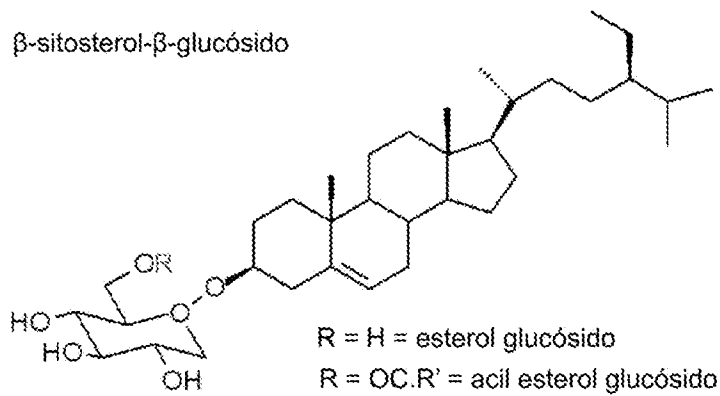


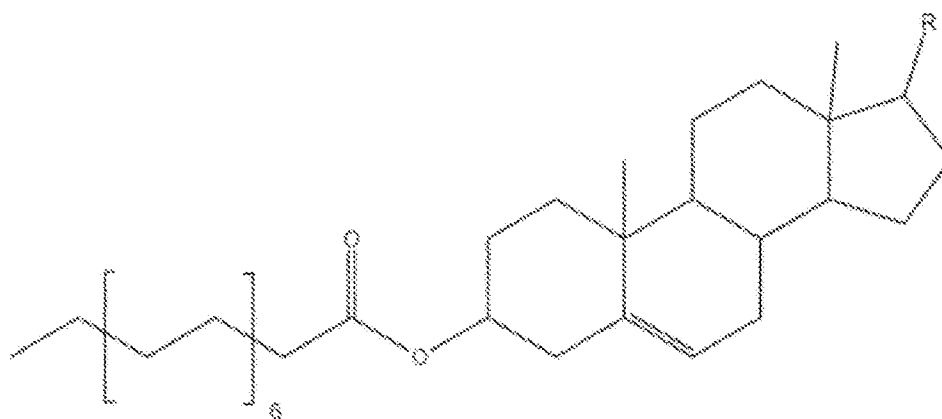
Éster esterílico



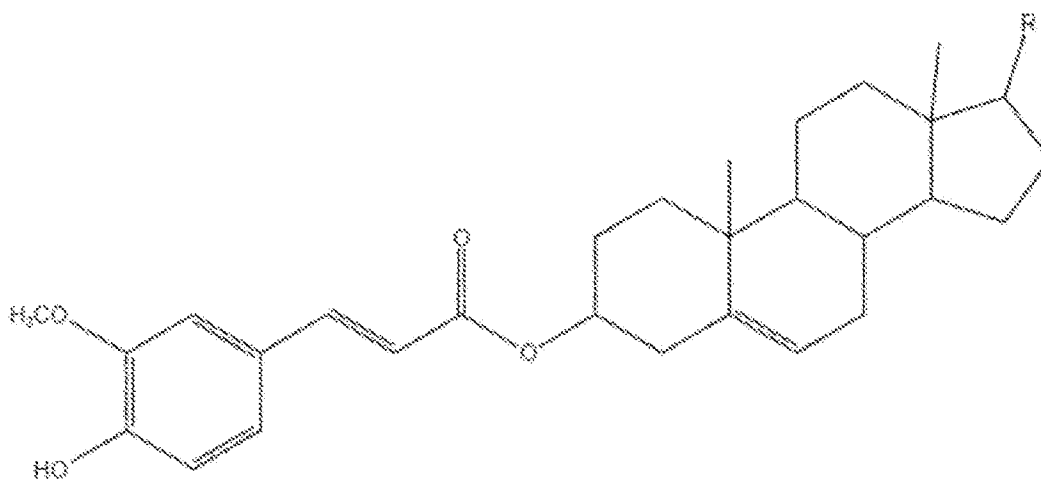
R son los grupos laterales del estero. El estero puede ser un delta-5 o delta-7 estero.

- 5 Ejemplos adicionales de conjugados de estero incluyen:

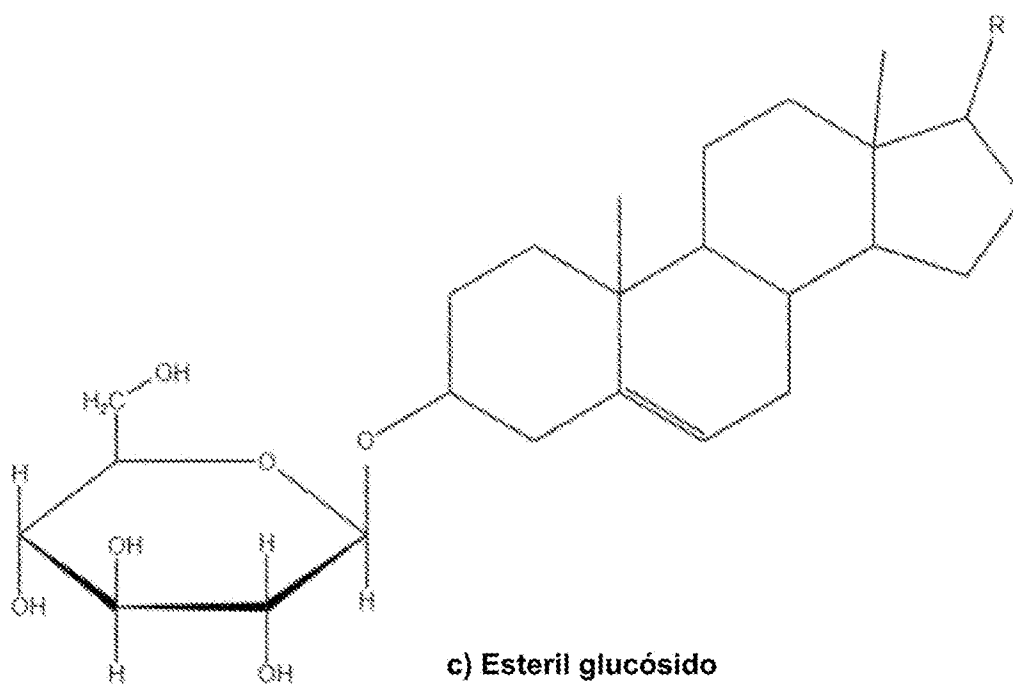




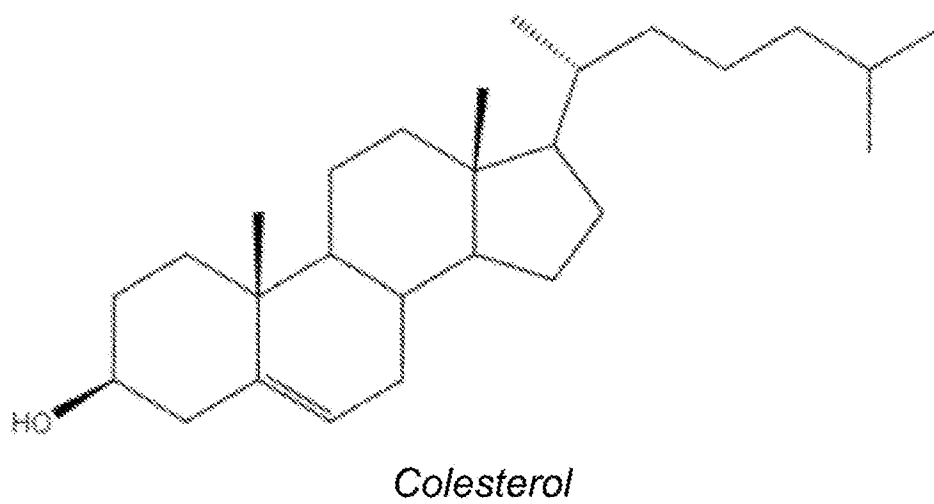
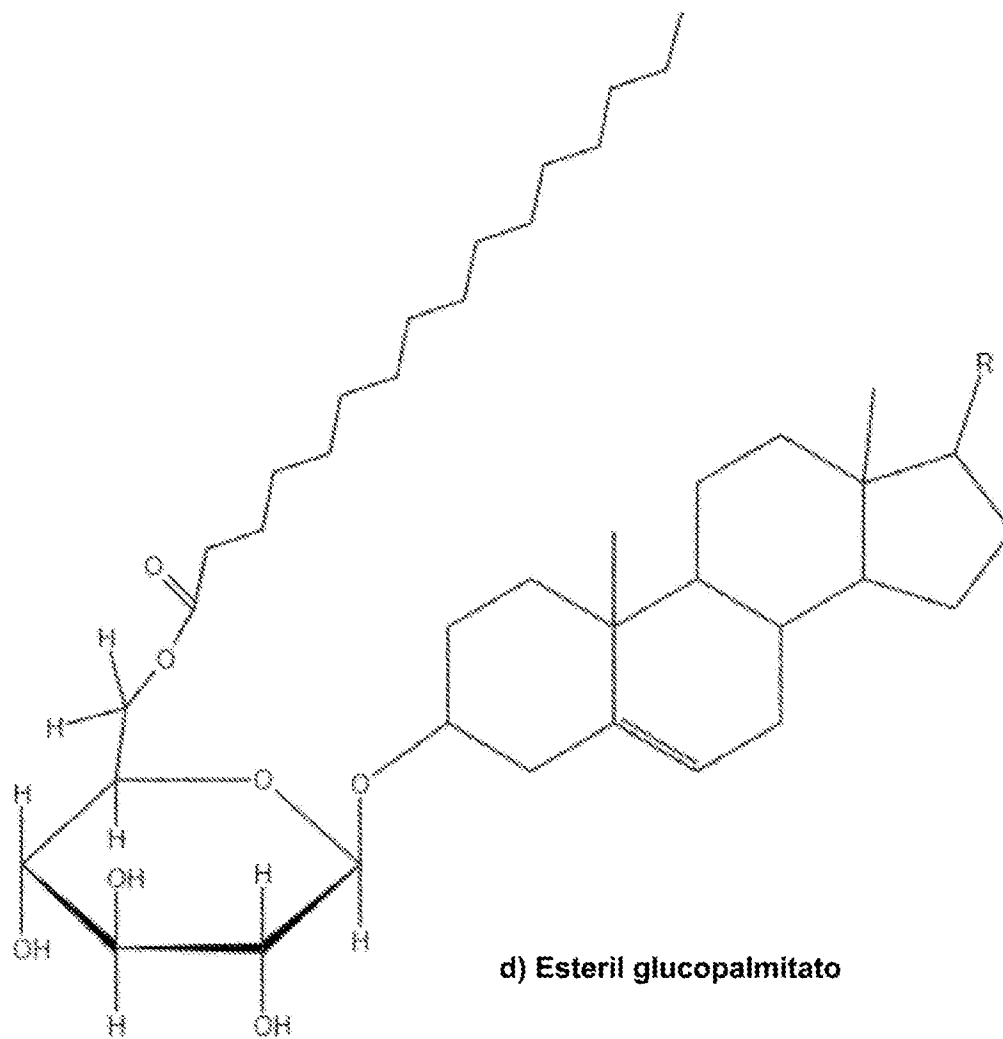
a) Esteril palmitato

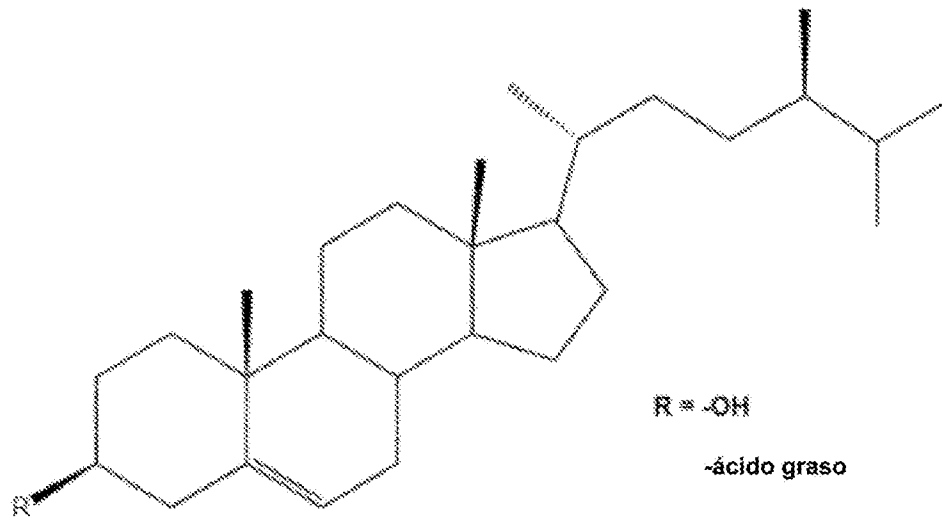
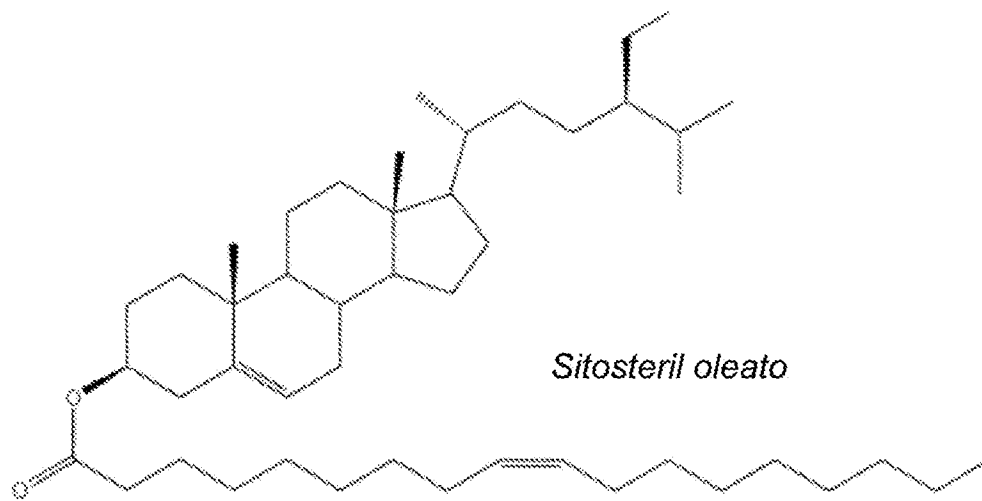


b) Esteril ferulato

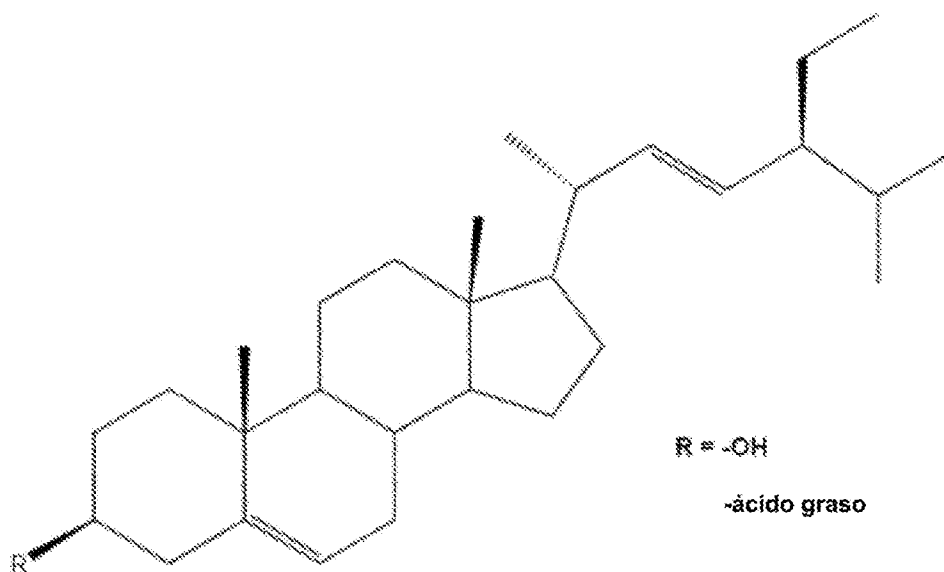
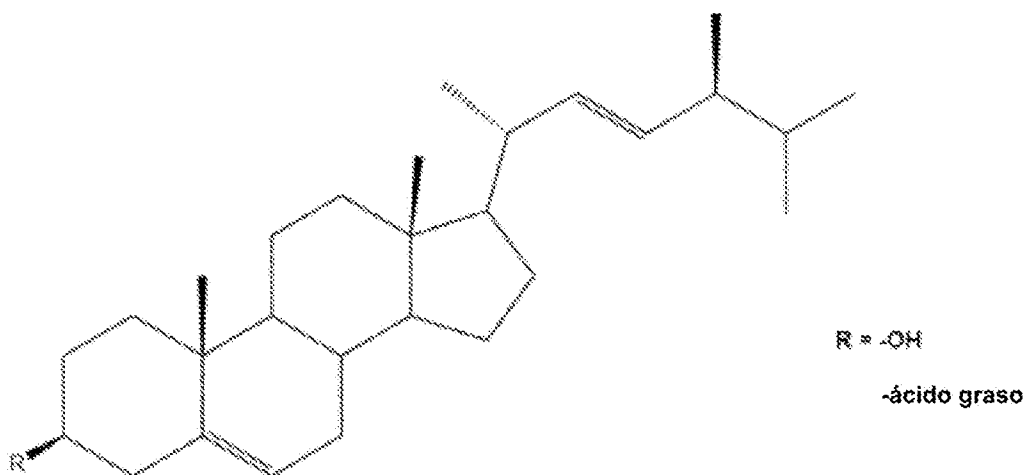


c) Esteril glucósido





Campesterol

*Estigmasterol**Brasicasterol*

5 Isofucosterol como nutriente para insectos

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el isofucosterol es un nutriente esencial para las abejas y otros insectos que se alimentan de polen. Las abejas y los abejorros, por ejemplo, presentan los siguientes niveles de isofucosterol en su composición corporal:

10

Tabla 1. Composición de isofucosterol de abejas y posibles sustratos alimenticios para abejas como porcentaje total de fitosteroles relevantes para las abejas		
	Isofucosterol (% total)	Fitosterol total (µg/g)
Abeja obrera	28,73	1673,75
Abejorro obrero	50,15	2101,26

Composición sustituta del polen

15

La característica “sustituto del polen” significa esencialmente libre de polen. Sin embargo, pueden estar presentes cantidades menores de polen en las composiciones de la presente invención. En una realización, la cantidad de polen es el 15 % en peso o menos, preferiblemente el 10 % en peso o menos, aún más preferiblemente el 5 % en peso o

menos y aún más preferiblemente el 1 % en peso o menos y aún más preferiblemente el 0,1 % en peso o menos en comparación con el peso seco de la composición. Los términos sustitutos del polen y no polínico se usan indistintamente.

5 Fuentes sustitutas del polen de isofucosterol

El isofucosterol puede obtenerse de fuentes sustitutas del polen, por ejemplo, mediante

- síntesis química sintética; o
- cualquier fuente vegetal sustituta del polen.

Ejemplos de fuentes vegetales de isofucosterol sustitutas del polen incluyen algas, hongos, bacterias o partes de animales que contienen isofucosterol.

En una realización, las fuentes sustitutas del polen contienen naturalmente isofucosterol.

En otra realización, las fuentes sustitutas del polen de isofucosterol son organismos metabólicamente modificados para producir isofucosterol.

20 Invertebrados

Los invertebrados incluyen

- artrópodos, tales como insectos, arácnidos, crustáceos y miriápodos,
- moluscos, tales como quitones, caracoles, bivalvos, calamares y pulpos,
- anélidos, tales como lombrices de tierra y sanguijuelas; y
- cnidarios, como hidras, medusas, anémonas de mar y corales.

Los invertebrados preferidos son invertebrados que se cultivan o crían con fines de nutrición humana o animal tales como abejas, abejorros, lombrices de tierra, gusanos de la harina, camarones, langostinos o cangrejos de río, grillos, larvas de mosca, escarabajos coccinélidos, moscas soldado negras, sírfidos y ostras u otros bivalvos. Los invertebrados particularmente preferidos son aquellos de la familia *Apidae* o *Bombidae* que se usan como polinizadores para plantas agrícolas u hortícolas, tales como

- abejas del género *Apis* y en particular *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis dorsata* o
- abejorros del género *bomba* y en particular *Bombus terrestris*, *B. impatiens*, *B. ignites*
- abejas sin aguijón de la tribu *Meliponini*

45 Dosificación y concentración

Las dosis y concentraciones en los ejemplos que se describen a continuación son para alimentar a una colonia de 30000 abejas con entre 1,5 y 3 libras de tortita para abejas durante un período de 14 días. La dosis de la tortita se puede adaptar al tamaño de la colonia y la dosis por 14 días se puede repetir según lo desee el apicultor. Se pueden administrar las mismas dosis en realizaciones en donde la administración no se realiza a través de tortitas sino a través de otras formas como se ha descrito anteriormente. Las fórmulas para calcular la dosis para diferentes formulaciones, métodos de administración o tamaño de colonias de abejas o como dosis/día como % de biomasa de insectos se han descrito anteriormente.

En una realización, el isofucosterol o el fucosterol se administra en una cantidad que sea nutricionalmente eficaz para los invertebrados, en particular para las abejas o los abejorros.

En una realización, nutricionalmente eficaz implica alimentar a una colonia de 30000 abejas con de 1 libra a 1,5 a 3 libras de una formulación de tortita para abejas durante un período de 14 días que tiene una concentración de isofucosterol o fucosterol o mezclas de los mismos en una cantidad del 0,01-5 %, preferiblemente del 0,01 al 2 %, aún más preferiblemente del 0,01-1 % como porcentaje del peso total de la composición sustituta del polen. En otra realización, la concentración de isofucosterol o fucosterol o mezclas de los mismos es del 0,03-0,5 % para las abejas o del 0,03-1 % para los abejorros como porcentaje del peso total de la composición sustituta del polen. La dosis de la tortita se puede adaptar al tamaño de la colonia y la dosis por 14 días se puede repetir según lo desee el apicultor.

En una realización, el colesterol se administra en una cantidad que sea nutricionalmente eficaz para los invertebrados, en particular para las abejas o los abejorros. Preferiblemente, el colesterol se administra en una concentración del 0,001-2 %, preferiblemente el 0,001 %-1,5 %, más preferiblemente el 0,06-1,2 % en peso seco de la composición sustituta del polen total.

En una realización, el 24-metilencolesterol se administra en una cantidad que sea nutricionalmente eficaz para los invertebrados, en particular para las abejas o los abejorros. Preferiblemente, el 24-metilencolesterol se administra en una concentración del 0,001-2 %, preferiblemente el 0,001 %-1,5 %, más preferiblemente el 0,06-1,2 % en peso seco de la composición sustituta del polen total.

En una realización, el sitosterol se administra en una cantidad que sea nutricionalmente eficaz para los invertebrados, en particular para las abejas o los abejorros. Preferiblemente, el sitosterol se administra en una concentración del 0,001-2 %, preferiblemente el 0,001-1 %, más preferiblemente el 0,03-0,6 % en peso seco de la composición sustituta del polen total.

En una realización, el campesterol se administra en una cantidad que sea nutricionalmente eficaz para los invertebrados, en particular para las abejas o los abejorros. Preferiblemente, el campesterol se administra en una concentración del 0,001-2 %, preferiblemente el 0,001-1 %, más preferiblemente el 0,02-0,35 % en peso seco de la composición sustituta del polen total.

En una realización, el estigmasterol se administra en una cantidad que sea nutricionalmente eficaz para los invertebrados, en particular para las abejas o los abejorros. Preferiblemente, el estigmasterol se administra en una concentración del 0,001-2 %, preferiblemente el 0,001-1 %, más preferiblemente el 0,01-0,2 % en peso seco de la composición sustituta del polen.

En una realización, la concentración total de esteroles en la composición sustituta del polen está en el intervalo del 0,01 % al 4 % en peso seco de la composición sustituta del polen.

Composición sustituta del polen

Un aspecto adicional de la invención es una composición sustituta del polen que comprende

a. proteínas en una cantidad del 10 % en peso al 50 % en peso, preferiblemente del 15 % en peso al 40 % en peso,

b. ácidos grasos en una cantidad del 1 % en peso al 20 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso al 12 % en peso,

c. carbohidratos en una cantidad del 30 % en peso al 90 % en peso, preferiblemente del 30 % en peso al 70 % en peso,

d. opcionalmente vitaminas, y

e. opcionalmente minerales,

en donde la cantidad total de componentes a) a e) y opcionalmente componentes adicionales suman el 100 % en peso y en donde los % en peso se refieren al peso seco total de la composición,

en donde la composición sustituta del polen comprende además una cantidad nutricionalmente eficaz de isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos, y

en donde la composición sustituta del polen comprende además al menos otro esteroles del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol,

en donde, en una realización preferida, la concentración total de esteroides es del 0,01 % en peso al 4 % en peso, preferiblemente del 0,05 % en peso al 3 % en peso y aún más preferiblemente del 0,05 % en peso al 2 % en peso, y aún más preferiblemente del 0,05 % en peso al 1,5 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen.

Uso para alimentación

Un aspecto adicional de la invención es el uso de la composición sustituta del polen de la invención que comprende una cantidad nutricionalmente eficaz de isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos para alimentar invertebrados u organismos de acuicultura, en donde la composición sustituta del polen comprende una cantidad nutricionalmente eficaz de al menos un esteroles adicional, preferiblemente al menos dos esteroides más seleccionados

del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol o un conjugado fisiológicamente disponible de los mismos

Un aspecto adicional de la invención es el uso de la composición sustituta del polen de la invención para alimentar invertebrados u organismos de acuicultura, en donde la composición sustituta del polen comprende:

a. proteínas en una cantidad del 10 % en peso al 50 % en peso, preferiblemente del 15 % en peso al 40 % en peso,

b. ácidos grasos en una cantidad del 1 % en peso al 20 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso al 12 % en peso,

c. carbohidratos en una cantidad del 30 % en peso al 90 % en peso, preferiblemente del 30 % en peso al 70 % en peso,

d. opcionalmente vitaminas, y

e. opcionalmente minerales,

en donde la cantidad total de componentes a) a e) y opcionalmente componentes adicionales suman el 100 % en peso y en donde los % en peso se refieren al peso seco total de la composición,

en donde la composición sustituta del polen comprende además una cantidad nutricionalmente eficaz de isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos, y

en donde la composición sustituta del polen comprende además al menos otro esterol del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol, y

en donde, en una realización preferida, la concentración total de esteroides es del 0,01 % en peso al 4 % en peso, preferiblemente del 0,05 % en peso al 3 % en peso y aún más preferiblemente del 0,05 % en peso al 2 % en peso, y aún más preferiblemente del 0,05 % en peso al 1,5 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen.

Componentes de la composición adicionales

Un aspecto adicional es un método para alimentar invertebrados, en particular abejas, en donde se administra una composición sustituta del polen, en donde la composición sustituta del polen comprende:

a. proteínas en una cantidad del 10 % en peso al 50 % en peso, preferiblemente del 15 % en peso al 40 % en peso,

b. ácidos grasos en una cantidad del 1 % en peso al 20 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso al 12 % en peso,

c. carbohidratos en una cantidad del 30 % en peso al 90 % en peso, preferiblemente del 30 % en peso al 70 % en peso,

d. opcionalmente vitaminas, y

e. opcionalmente minerales,

en donde la cantidad total de componentes a) a e) y opcionalmente componentes adicionales suman el 100 % en peso y en donde los % en peso se refieren al peso seco total de la composición,

en donde la composición sustituta del polen comprende además una cantidad nutricionalmente eficaz de isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos, y

en donde la composición sustituta del polen comprende además al menos otro esterol del grupo que consiste en colesterol, 24-metilen-colesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol,

en donde, en una realización preferida, la concentración total de esteroides es del 0,01 % en peso al 4 % en peso, preferiblemente del 0,05 % en peso al 3 % en peso y aún más preferiblemente del 0,05 % en peso al 2 % en peso, y aún más preferiblemente del 0,05 % en peso al 1,5 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen.

La misma composición e intervalos se aplican a abejorros, moscas soldado negras, coccinélidos y otros insectos que se alimentan de polen.

Ejemplos

Ejemplo comparativo 1: Niveles de isofucosterol en alimentos comerciales para abejas

Las composiciones alimenticias sustitutas del polen para abejas disponibles comercialmente no comprenden isofucosterol como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1:

Alimentos para abejas disponibles comercialmente		
	Isofucosterol	Fitosteroles totales (microg/g)
UltraBee	Por debajo del límite de detección	2147,29
MegaBee	Por debajo del límite de detección	1489,84
AP23	Por debajo del límite de detección	1340,88
BeePro	Por debajo del límite de detección	509,18
Broodbuilder	Por debajo del límite de detección	280,38
FeedBee	Por debajo del límite de detección	844,56
el 0,001 % en peso es el límite de detección de isofucosterol		
Métodos de análisis de Zu y col. 2021 New Phyt 230: 1169-1184		
Total calculado como la suma de las cantidades de fitosteroles relevantes para las abejas: 24MCHO = 24-metilcolesterol, CAMPE = campesterol, STIGM = estigmasterol, b-SITO = b-sitosterol, ISOFUOCO = isofucosterol		

Existe una buena literatura que describe cómo elaborar dietas holísticas para experimentar con ensayos dietéticos usando abejas. Se hace referencia al documento US2019/0090507, artículos de Svoboda y col, Chakrabarti y col mencionados anteriormente para ejemplos de diferentes dietas holísticas basales.

Ejemplo 1 - Ensayo de preferencia: las abejas prefieren concentraciones específicas de isofucosterol en los alimentos.

Abejas obreras adultas recién emergidas (*Apis mellifera*) o abejorros obreros adultos (*Bombus terrestris*) se pusieron a prueba en un ensayo de preferencia de dos opciones en donde las abejas tenían acceso a dos dietas y acceso *ad libitum* al agua.

Una dieta de tratamiento contenía isofucosterol y la otra no contenía ningún esterol. Las abejas recién emergidas se retiraron del marco de cría y se alojaron cohortes de 30 abejas por réplica en jaulas de plástico para cría. En todos los experimentos, se usaron 10 cohortes de ~30 abejas cada una para cada grupo de tratamiento. En todas las dietas los carbohidratos se mantuvieron al 60 % usando sacarosa y la grasa se mantuvo al 8 %. El consumo de cada dieta se midió cada 24 h durante 5 días. El índice de preferencia se calculó como (cantidad de tratamiento consumida - cantidad de control consumida)/(cantidad total de alimento consumido).

En el Ejemplo 1, a cohortes de abejas se les dio a elegir una dieta con o sin isofucosterol. Las abejas prefirieron consumir alimentos que contuvieran al menos un 0,05 % de isofucosterol en la dieta, como se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 2 - Supervivencia: las abejas viven más tiempo con alimentos que contienen isofucosterol

Abejas obreras adultas recién emergidas alimentadas con un tratamiento dietético y acceso *ad libitum* al agua. La dieta de tratamiento contenía isofucosterol. Las abejas recién emergidas se retiraron del marco de cría y se alojaron cohortes de 30 abejas por réplica en jaulas de plástico para cría. En todos los experimentos, se usaron 10 cohortes de ~30 abejas cada una para cada grupo de tratamiento. En todas las dietas los carbohidratos se mantuvieron al 60 % usando sacarosa y la grasa se mantuvo al 8 %. El consumo de cada dieta se midió todos los días durante el transcurso del experimento. Se contó el número de abejas vivas en la caja cada día durante 14 días.

El ejemplo 2 representa la supervivencia de cohortes de abejas confinadas a alimentarse con dietas que contienen concentraciones específicas de isofucosterol (0 %, 0,5 % y 1 % del peso de la dieta), como se muestra en la Figura 8.

Ejemplo 3 - Producción de crías: las abejas producen más crías con isofucosterol y producen crías durante períodos de tiempo más largos.

Abejas: Los núcleos de Apidea de espuma de poliestireno aislados completamente funcionales comprendían 5 mini marcos poblados con obreras adultas y 1 abeja reina ponedora apareada se poblaba con 300-400 ml de obreras adultas jóvenes (~ N <1.000 abejas de edades mixtas).

La colonia estaba ubicada en un invernadero cerrado con ventilación que no permitía a las abejas buscar néctar o polen. Cada tratamiento se puso a prueba con 3-6 colonias; cada colonia fue alimentada con una tortita de 60-100 g (dieta sólida) en el comedero superior equipado con un suelo de malla. Se administró dieta el primer día y nuevamente el día 6; la cantidad consumida se midió el día 6 y el día 15. Si no se observan larvas ni huevos/reina antes del día 6, se finaliza el experimento. El número de celdas de crías operculadas se contó el día 15. Durante cada inspección se estimó el número de líneas de separación para abejas. Se proporcionó jarabe de azúcar (34 %) y agua en comederos dentro de la carpa para evitar la falta de carbohidratos y estimular la actividad de búsqueda de alimento.

En el Ejemplo 3, las abejas fueron alimentadas con una dieta que contenía el 10-18 % de proteína, el 6 % de grasa, el 1 % de vitaminas/minerales y > 75 % de carbohidratos.

La Figura 9 presenta el umbral del ejemplo 3 para la influencia del isofucosterol en la dieta de las abejas. A medida que aumentó la concentración de isofucosterol, aumentó la cantidad de cría producida en cada colonia (N > 3 colonias/tratamiento). Se contaron las pupas y el número de nuevos adultos durante todo el período de 10 semanas.

Ejemplo 4A: Experimento de Apidea a largo plazo con abejas alimentadas con una multiplicidad de esteroides, incluidos isofucosterol y 24-metilencolesterol.

Abejas: Los núcleos de Apidea de espuma de poliestireno aislados completamente funcionales comprendían 3-5 mini marcos poblados con obreras adultas y 1 abeja reina ponedora apareada se poblaba con 300-400 ml de obreras adultas jóvenes (~ N <1.000 abejas de edades mixtas).

Las colonias están ubicadas en un invernadero cerrado con ventilación que no permitía a las abejas buscar néctar o polen. Cada tratamiento se puso a prueba con 3-6 colonias; cada colonia fue alimentada ad libitum con la dieta sólida en el comedero superior provisto de un suelo de malla, y se evaluó la cantidad consumida en cada alimentación. El número de celdas de crías operculadas se evaluó cada 12 días. Durante cada inspección se registró el número de líneas de separación para abejas. Si la colonia alcanza el tamaño máximo para la caja de Apidea, se añade un alza. Se proporcionó jarabe de azúcar (34 %) y agua en comederos dentro de la carpa para evitar la falta de carbohidratos y estimular la actividad de búsqueda de alimento.

En el Ejemplo 4A, las abejas fueron alimentadas con una dieta que contenía el 15-30 % de proteína, el 4-12 % de grasa, el 1 % de vitaminas/minerales y > 40 % de carbohidratos (Dieta 1).

Los experimentos incluyeron los siguientes tratamientos:

- Dieta 1: la dieta 1 anterior a la que no se le añaden esteroides
- Dieta 2 = Dieta 1 a la que se añade isofucosterol, 24-metilencolesterol, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol y colesterol en proporciones y concentraciones según la realización preferida anterior
- Dieta 3 = Dieta 2 pero sin inclusión de 24-metilencolesterol
- Dieta 4 = Dieta 2 pero sin inclusión de isofucosterol
- Dieta 5 = una tortita a base de polen (tortita de polen) que consiste en el 60,5 % de polen (polen fresco congelado recolectado por abejas de BioBest, Antalya, Turquía), el 25,2 % de azúcar en polvo y el 14,3 % de miel
- Dieta 6 = Dieta 2 pero sin inclusión de colesterol
- Dieta 7 = Dieta 2 pero sin inclusión de beta-sitosterol, estigmasterol y campesterol
- DIETA 8 = una dieta comercialmente usada comúnmente

Figura 4- resultados del experimento 4A: Área media de crías selladas (cm²) evaluada cada 12 días durante un período de 15 semanas. Cada colonia fue alimentada con un tratamiento dietético: Dieta 1 (cruces, línea punteada fina), Dieta 2 (círculos llenos, línea punteada gruesa), Dieta 3 (rombos llenos, línea discontinua fina), Dieta 4 (rombos vacíos, línea punteada gruesa), Dieta 5 (círculos abiertos, línea discontinua gruesa), Dieta 6 (cuadrados llenos, línea continua fina), Dieta 7 (cuadrados vacíos, línea discontinua y punteada gruesas) y Dieta 8 (asteriscos, línea discontinua y punteada finas).

Ejemplo 4B: Experimento de Apidea a largo plazo con abejas alimentadas con una multiplicidad de esteroides sin isofucoesterol, pero que incluyen 24-metilencolesterol

Abejas: Los núcleos de Apidea de espuma de poliestireno aislados completamente funcionales comprendían 3-5 mini marcos poblados con obreras adultas y 1 abeja reina ponedora apareada se poblaba con 300-400 ml de obreras adultas jóvenes (~ N <1.000 abejas de edades mixtas).

Las colonias están ubicadas en un invernadero cerrado con ventilación que no permitía a las abejas buscar néctar o polen. Cada tratamiento se puso a prueba con 3-6 colonias; cada colonia fue alimentada ad libitum con la dieta sólida en el comedero superior provisto de un suelo de malla, y se evaluó la cantidad consumida en cada alimentación. El número de celdas de crías operculadas se evaluó cada 12 días. Durante cada inspección se registró el número de líneas de separación para abejas. Si la colonia alcanza el tamaño máximo para la caja de Apidea, se añade un alza. Se proporcionó jarabe de azúcar (34 %) y agua en comederos dentro de la carpa para evitar la falta de carbohidratos y estimular la actividad de búsqueda de alimento.

En el Ejemplo 4B, las abejas fueron alimentadas con una dieta que contenía el 15-30 % de proteína, el 4-12 % de grasa, el 1 % de vitaminas/minerales y > 40 % de carbohidratos (Dieta 1).

Los experimentos incluyeron los siguientes tratamientos:

Dieta 1 = una dieta que contiene el 15-30 % de proteínas, el 5-10 % de grasas, el 1 % de vitaminas/minerales y > 40 % de carbohidratos, a la que no se le añaden esteroides.

Dieta 2 = tortita de polen (el 60,5 % de bolitas de polen mixto recolectadas por abejas, el 25,2 % de azúcar en polvo y el 14,3 % de miel).

Dieta 3 = Dieta 4 pero sin inclusión de 24-metilencolesterol.

Dieta 4 = Dieta 1 a la que se añaden 24-metilencolesterol, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol y colesterol en proporciones y concentraciones según la realización preferida anterior.

Dieta 5 = una dieta comercialmente usada comúnmente.

La Figura 5 muestra el resultado del experimento 4B: Área media de crías selladas (cm²) evaluada cada 12 días durante un período de 15 semanas. Cada colonia fue alimentada con un tratamiento dietético: Dieta 1 (cruces, línea punteada fina), Dieta 2 (círculos llenos, línea continua gruesa), Dieta 3 (rombos vacíos, línea fina), Dieta 4 (círculos vacíos, línea discontinua gruesa), Dieta 5 (asteriscos, línea discontinua y punteada finas).

Ejemplo 4C: Experimento de Apidea a largo plazo con abejas alimentadas con una multiplicidad de esteroides con lo que la concentración total de esteroides en la dieta se mantiene constante y la presencia (concentración) de esteroides específicos varía entre dietas.

Abejas: Los núcleos de Apidea de espuma de poliestireno aislados completamente funcionales comprendían 3-5 mini marcos poblados con obreras adultas y 1 abeja reina ponedora apareada se poblaba con 300-400 ml de obreras adultas jóvenes (~ N <1.000 abejas de edades mixtas).

Las colonias están ubicadas en un invernadero cerrado con ventilación que no permitía a las abejas buscar néctar o polen. Cada tratamiento se puso a prueba con 3-6 colonias; cada colonia fue alimentada ad libitum con la dieta sólida en el comedero superior provisto de un suelo de malla, y se evaluó la cantidad consumida en cada alimentación. El número de celdas de crías operculadas se evaluó cada 12 días. Durante cada inspección se registró el número de líneas de separación para abejas. Si la colonia alcanza el tamaño máximo para la caja de Apidea, se añade un alza. Se proporcionó jarabe de azúcar (34 %) y agua en comederos dentro de la carpa para evitar la falta de carbohidratos y estimular la actividad de búsqueda de alimento.

Los experimentos incluyeron los siguientes tratamientos:

Dieta 1 = una dieta que contiene el 15-30 % de proteínas, el 5-10 % de grasas, el 1 % de vitaminas/minerales y > 40 % de carbohidratos, a la que no se le añaden esteroides.

Dieta 2 = Dieta 1 a la que se añaden 24-metilencolesterol e isofucoesterol a concentraciones más bajas que la realización preferida anterior, y se añaden campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol y colesterol en proporciones y concentraciones según la realización preferida anterior.

Dieta 3 = Dieta 2 pero con mayores concentraciones de 24-metilencolesterol e isofucoesterol, según la realización preferida anterior, colesterol, y concentraciones más bajas de campesterol, beta-sitosterol y estigmasterol, para mantener un porcentaje de esteroles total similar al de la dieta 2.

Dieta 4 = similar a la dieta 3 pero sin inclusión de 24-metilencolesterol y de colesterol, manteniendo el porcentaje de esteroides totales como en la dieta 7.

5 Dieta 5 = similar a la dieta 3 pero sin inclusión de isofucosterol.

Dieta 6 = similar a la dieta 3 pero sin inclusión de 24-metilencolesterol y de isofucosterol.

10 Dieta 7 = similar a la dieta 3 pero sin inclusión de 24-metilencolesterol, isofucosterol y colesterol, manteniendo el porcentaje de esteroides totales como en la dieta 4.

Dieta 8 = tortita de polen (el 60,5 % de bolitas de polen mixto recolectadas por abejas, el 25,2 % de azúcar en polvo y el 14,3 % de miel).

15 Figura 6: Resultados del Ejemplo 4C: Resultados de un experimento de alimentación a largo plazo en colonias de Apidea con abejas alimentadas con una multiplicidad de esteroides con lo que la concentración total de esteroides en la dieta se mantiene constante y la presencia (concentración) de esteroides específicos varía entre dietas.

20 **EJEMPLO 5: Experimentos con mosca soldado negra**

La Figura 7 muestra los resultados del Ejemplo 5A: Alimentar a moscas soldado negras adultas con una dieta que contenga una multiplicidad de esteroides: efecto sobre la tasa de eclosión de los huevos puestos y el peso de la masa de huevos puestos. La supervivencia de adultos y el número de masas de huevos puestos de una población alimentada con una dieta sustituta del polen (como se especifica en el documento US2019/0090507 a Apex Biosciences) se midió diariamente usando los métodos de crianza descritos en Thinn y Kainoh 2022. JARQ 56 (2), 211-217 (2022).

La Figura 8 muestra los resultados del Ejemplo 5B: Alimentar a moscas soldado negras adultas con una dieta que contenga una multiplicidad de esteroides: efecto sobre la longevidad de los adultos y la supervivencia de las larvas hasta la fase de prepupa. Las larvas de mosca soldado negra (BSF) se alimentaron con una dieta que contenía el 22 % de proteína y el 4 % de grasa como se describe en Hogsette 1992. J. Econ. Entomol. 85(6): 2291-2294 hasta la eclosión. Los esteroides se obtuvieron como compuestos puros añadidos directamente a la dieta hasta una cantidad total del 0,1 %. La supervivencia de larvas y adultos durante un período de 50 días se midió como en Georgescu y col., Eur. J. Entomol. 118: 297-306, 2021.

35 La Figura 9 muestra los resultados del Ejemplo 5C: Alimentar a las moscas soldado negras adultas con diferentes dietas que contienen una multiplicidad de esteroides: esteroides que se encuentran en los tejidos de las moscas soldado negras alimentadas con una multiplicidad de esteroides. Se añadieron esteroides a la dieta. La medición de esteroides en tejidos se realizó después de la saponificación de tejidos de BSF usando GC-MS como se describe en Boukid y col. 2022. Insects 12, 672.

40 **EJEMPLO 6: Experimentos con mosca soldado negra**

Cambiar la composición nutricional de una larva de BFS para una especie objetivo (abeja) incorporando una multiplicidad de esteroides en la dieta de las larvas de BFS, elaborar una formulación alimenticia que contenga larvas y alimentar con esas larvas la especie objetivo. Las larvas de mosca soldado negra se alimentaron con una dieta como la de la Figura 10. Los esteroides que necesitan las abejas se añadieron a la dieta en cantidades especificadas como en la Dieta 2 o como esteroides simples (24-metilencolesterol, 24MC o isofucosterol). A un grupo no se le añadió esteroide directamente a la dieta. Los extractos se elaboraron usando hexano de larvas de BSF liofilizadas. Se añadió a la dieta el disolvente hexano que contenía la fracción grasa; se dejó que el hexano se evaporara antes de usar la dieta para alimentar a las larvas.

Este ejemplo muestra generalmente cómo alimentar con una multiplicidad de esteroides adaptados para satisfacer las necesidades de una especie objetivo puede beneficiar el rendimiento de la especie objetivo. Dado que las BFS cultivadas en diferentes flujos de desechos no contienen perfiles de esteroides óptimos para algas o plancton que se alimentan de peces, crustáceos e invertebrados marinos cultivados y sus larvas, este método de añadir fucosterol o isofucosterol, 24-metilencolesterol (todos enriquecidos en algas pero ausentes en las actuales dietas artificiales sin algas para las dietas de las especies anteriores) a dietas de BFS y a continuación alimentar con lípidos o proteínas o extractos totales de estas larvas de BFS a organismos de acuicultura que se alimentan de algas es un método para mejorar el rendimiento de las dietas artificiales de acuicultura para organismos que normalmente se alimentan de plancton y larvas y que requieran isofucosterol/fucosterol y/o 24-metilencolesterol.

La Figura 10 muestra los resultados del Ejemplo 6: Alimentar colonias de abejas en un experimento de Apidea con una dieta que contenía un extracto de moscas soldado negras que fueron alimentadas con una multiplicidad de esteroides.

EJEMPLO 7: Desarrollo de una dieta completa para las abejas: importancia del isofucoesterol y una multiplicidad de esteroides

En la siguiente realización, nos propusimos poner a prueba si la eliminación de un solo fitosterol o un par de fitosteroides de una dieta libre de polen que contiene una multiplicidad de esteroides añadidos está afectando la producción de crías a largo plazo de una colmena alimentada exclusivamente con esta dieta.

Para ello, configuramos un ensayo en donde las colmenas están completamente contenidas en una carpa grande (Figura 11A a 11D) y no tienen acceso a alimentos externos y se alimentan con dietas libres de polen con diferentes composiciones de esteroides, pero con una concentración de esteroides totales idéntica que es similar a la encontrada en el polen y las abejas:

Se prepararon tres dietas:

▪ **Dieta A:** Una dieta para abejas sin polen que contiene proteínas, lípidos, minerales, vitaminas y antioxidantes y una traza de esteroides, pero sin esteroides añadidos. Esta dieta de investigación fue formulada por APIX Biosciences NV Bélgica usando ingredientes disponibles industrialmente como una tortita que se puede colocar encima de los marcos para abejas en una colmena, como es estándar para los “suplementos proteicos” en la industria (PCT/GB2016/053573). Esta dieta es similar a la dieta usada por Herbert y col, excepto que es más completa y más equilibrada en sus nutrientes y tiene una base nutricional superior. En esta dieta mezclamos (disueltos en lípidos) el 0,375 % de esteroides añadidos [24-metilen-colesterol (0,125 %), isómeros de isofucoesterol/fucoesterol (0,0625 %) y el 0,1875 % de una mezcla de esteroides [incluidos Beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol (sin isofucoesterol ni 24-metilen-colesterol) que típicamente se encuentra en el polen obtenido por las abejas] dando como resultado concentraciones y proporciones de fitosteroides que reflejan en promedio la composición natural del polen. 24-Metilencolesterol semisintético (97 % de pureza) e isofucoesterol semisintético (97 % de pureza; 75 % de isofucoesterol y 25 % de su isómero E-Z fucoesterol; en adelante denominados indistintamente “isofucoesterol/fucoesterol” o “isofucoesterol”) se adquirieron de Phytant NV Bélgica. La dieta basal de la dieta A es una dieta patentada (desarrollada por APIX Biosciences NV, Bélgica) formulada con ingredientes de alimentación animal registrados y libres de polen (PCT/GB2016/053573).

▪ **Dieta B:** una dieta libre de polen y libre de isofucoesterol/fucoesterol. Esta es la dieta A de la que se omitió la mezcla de isofucoesterol/fucoesterol añadida al 0,0625 %. Para mantener constante la concentración total de esteroides añadidos en la dieta, la concentración de los otros esteroides añadidos en la dieta se incrementó proporcionalmente a la concentración total de esteroides de la dieta A con el 0,375 % de esteroides añadidos. Esto aumenta la concentración de los otros esteroides añadidos individualmente con un factor de 1,2 y esto da como resultado una concentración de estos esteroides dentro del medio de los intervalos presentes en el polen del que se alimentan con éxito las abejas.

▪ **Dieta C:** una dieta libre de polen y libre de 24-metilen-colesterol. Esta es la dieta A de la que se omitió el 24-metilen-colesterol añadido al 0,125 %. Para mantener constante la concentración total de esteroides añadidos en la dieta, la concentración de los otros esteroides presentes en la dieta se incrementó proporcionalmente a la concentración total de esteroides de la dieta A con el 0,375 % de esteroides añadidos. Esto da como resultado una concentración de otros esteroides añadidos dentro del medio de los intervalos presentes en el polen del que se alimentan con éxito las abejas.

Evaluamos la capacidad de estas 3 dietas y una cuarta dieta comercial que se usa ampliamente en los Estados Unidos (**dieta E**, véase la Figura 20 y el ejemplo 8) para sostener la producción de crías en una colmena durante 96 días (>4 generaciones de abejas nodrizas) cuando se suministra como única fuente de nutrientes (aparte del jarabe de azúcar y el agua proporcionada en la carpa a través de un comedero de azúcar y un bebedero de agua). Seis pequeñas colmenas por dieta pobladas por 800-850 ml (aproximadamente 2000 abejas) y una reina cada una se distribuyeron en recintos carpados adyacentes de 2 m x 4,5 m x 3 m cada uno (3 colmenas por carpa; Figura 11). Los recintos carpados están en Wingene, Bélgica (Día 0 = 23 de mayo). El día 0 sólo había trazas de polen y pan de abeja en las colmenas. Las reinas eran reinas hermanas recién apareadas de idéntica edad y origen genético. (*Apis mellifera ligustica*).

El pienso se proporcionó a cada colmena cada 6 días colocando una tortita encima de los marcos (por encima del nido de cría) según la práctica apícola estándar (Figura 11). Las tres colmenas en la misma carpa recibieron la misma dieta (dos carpas por dieta). Las abejas tenían acceso *ad libitum* a agua y 400 ml de jarabe de azúcar con sacarosa al 50 % cada 6 días colocados sobre una mesa en la carpa (no se proporcionó azúcar *ad libitum* para evitar llenar todas las celdas con jarabe, limitando así el espacio disponible para la cría) (Figura 11C). El consumo de alimento se midió cada 6 días pesando las tortitas no consumidas de cada colmena y reemplazándolas con tortitas frescas. Se tomaron fotografías de cada marco que contenía crías de cada colmena cada 12 días durante un período de 96 días (Figura 11D). Las crías operculadas se contaron manualmente en cada fotografía (Figuras 15, 16 y 17) por dos o tres individuos diferentes y los resultados fueron nuevamente verificados (control de calidad verificado) por otro individuo. Se eliminaron del experimento las colmenas en donde la reina dejó de poner huevos en los primeros 24 días (período de estabilización de la colmena) y las colmenas en donde la reina fue aplastada accidentalmente durante las observaciones. Este régimen de observación asegura que todas las abejas nacidas en la colmena (todas las crías que

se desarrollaron hasta convertirse en crías operculadas) fueron fotografiadas al menos una vez y sólo una vez. El día 84 se tomó una muestra de 25-30 abejas de cada colmena para estudios futuros.

Este diseño es similar a los experimentos de Herbert y col. (Ref) en donde se incorporaron una serie de fitosteroles individuales (pero no isofucoesterol) en una dieta hológica simple y se mantuvieron pequeñas colmenas con las dietas hasta que no se produjeron más huevos. Sin embargo, en nuestro diseño experimental añadimos una multiplicidad definida de esteroides, usamos una dieta basal más compleja y completa y evaluamos el efecto de omitir un solo esteroide de la dieta manteniendo constante la concentración total de esteroides.

Nuestros experimentos se realizaron durante 96 días (4,5 ciclos de cría de 21 días con dieta artificial). Se necesitan aproximadamente 24 días o 1,5 ciclos de vida de las abejas nodrizas para agotar los alimentos almacenados en las colmenas y cualquier reserva de nutrientes almacenados en las abejas que estaban presentes al comienzo del experimento. Todas las crías operculadas observadas el día 24 provienen de huevos puestos dentro de la carpa y, por tanto, se espera que sean completamente alimentadas con la dieta artificial. Se espera que las crías operculadas observadas a partir del día 36 en adelante sean completamente alimentadas por abejas nodrizas que fueron criadas, a su vez, con dieta artificial. Lo mismo se aplica a los nutrientes que las abejas nodrizas suministran a la reina.

La importancia del isofucoesterol/fucoesterol

Las abejas y las colmenas mostraron un comportamiento normal en la carpa como lo demuestra un ciclo diurno normal de vuelo y regreso a las colmenas al anochecer o en caso de lluvia, recolección de jarabe de azúcar y agua por parte de recolectoras, orientación y vuelos de defecación. Sin embargo, en estas condiciones las colmenas experimentan tensiones importantes: (1) estar encerradas en la colmena y volar contra la red (2) lo que es más importante, las colmenas se abrieron y se retiraron todos los marcos para fotografiarlos cada 12 días, un procedimiento que expuso a las crías a temperaturas frías y alteró sustancialmente la colmena. Este último procedimiento habrá tenido un impacto negativo significativo sobre la salud y la productividad de las colmenas. Otro elemento que considerar es que comenzamos con colmenas pequeñas recién establecidas (800-850 ml abejas y una reina recién apareada). Las colmenas pequeñas son más sensibles a las molestias y pueden calentarse/enfriarse menos que las colonias más grandes de, por ejemplo, 4000 abejas. Durante una ola de calor bajamos la temperatura en las carpas nebulizando agua desde una sola boquilla manteniendo la temperatura a 37,5 °C como máximo.

A pesar de estas tensiones, pudimos mantener las colmenas alimentadas exclusivamente con la dieta A libre de polen y una solución de azúcar en buen estado de salud y produciendo crías de manera estable durante más de 96 días en los recintos carpados. Las colmenas alimentadas con una tortita de proteína comercial muestran una fuerte disminución de cría después de 36 días (Dieta E, Figura 20).

Hasta la fecha no se ha informado de ninguna dieta completa libre de polen artificial para las abejas.

Los resultados se presentan en las Figuras 12 a 20 y en las Tablas 2 a 4, que se enumeran a continuación.

Tabla 2A: Resumen de los promedios mostrados en las tablas 3

Recuento de crías		D24	D36	D48	D60	D72	D84	D96
Dieta A que contiene todos los esteroides	Dieta promedio A	320	445	364	307	291	322	303
Dieta B = Dieta A menos isofucoesterol - fucoesterol	Dieta promedio B	219	119	96	173	105	81	98
Dieta C = Dieta A menos 24-metilen-colesterol	Dieta promedio C	322	434	249	281	223	206	168

Tabla 2B: Resumen de los promedios mostrados en las tablas 4

Recuento de crías acumuladas		D24	D36	D48	D60	D72	D84	D96
Dieta A que contiene todos los esteroides	Dieta promedio A	320	765	1129	1436	1727	2049	2353
Dieta B = Dieta A menos isofucoesterol - fucoesterol	Dieta promedio B	219	338	434	607	712	792	890
Dieta C = Dieta A menos 24-metilen-colesterol	Dieta promedio C	322	756	1005	1286	1509	1715	1882

Tabla 3: Crías operculadas medidas en cada colmena en cada momento (día 0 = inicio de la colocación de las colmenas en recintos carpados e inicio de la alimentación con las dietas).

Recuento de crías operculadas	Colmena n.º	D24	D36	D48	D60	D72	D84	D96
Dieta A	4	443	849	430	215	172	339	399
	29	236	384	342	255	268	361	178

Recuento de crías operculadas	Colmena n.º	D24	D36	D48	D60	D72	D84	D96
	40	427	276	375	508	483	525	576
	56	400	578	465	406	359	204	213
	57	93	137	210	153	173	180	151
Dieta promedio A		320	445	364	307	291	322	303
Dieta B	12	484	146	412	349	364	394	353
	15	160	22	12	197	3	0	0
	26	280	157	74	123	98	78	130
	28	38	308	53	292	104	12	102
	50	61	22	0	72	56	0	2
	51	292	60	22	5	4	0	0
Dieta promedio B		219	119	96	173	105	81	98
Dieta C	14	271	503	254	186	93	190	228
	30	307	528	125	215	135	85	51
	34	459	223	364	396	336	219	148
	41	252	480	253	328	328	328	243
Dieta promedio C		322	434	249	281	223	206	168

Tabla 4: Crías operculadas acumuladas completamente alimentadas con la dieta medida en cada colmena a partir del día 24 (día 0 = inicio de la colocación de las colmenas en recintos carpados e inicio de la alimentación con las dietas).

Recuento de crías acumuladas	Colmena n.º	D24	D36	D48	D60	D72	D84	D96
Dieta A	4	443	1292	1722	1937	2109	2448	2847
	29	236	620	962	1217	1485	1846	2024
	40	427	703	1078	1586	2069	2594	3170
	56	400	978	1443	1849	2208	2412	2625
	57	93	230	440	593	766	946	1097
	Dieta promedio A	320	765	1129	1436	1727	2049	2353
Dieta B	12	484	630	1042	1391	1755	2149	2502
	15	160	182	194	391	394	394	394
	26	280	437	511	634	732	810	940
	28	38	346	399	691	795	807	909
	50	61	83	83	155	211	211	213
	51	292	352	374	379	383	383	383
	Dieta promedio B	219	338	434	607	712	792	890
Dieta C	14	271	774	1028	1214	1307	1497	1725
	30	307	835	960	1175	1310	1395	1446
	34	459	682	1046	1442	1778	1997	2145
	41	252	732	985	1313	1641	1969	2212
	Dieta promedio C	322	756	1005	1286	1509	1715	1882

5 La Figura 12 y las tablas 2, 3, 4 muestran que, en promedio, una colmena alimentada con la dieta A produce 2353 crías operculadas entre los días 12 y 96 frente a 890 crías operculadas en el mismo período en promedio para las colmenas alimentadas con la dieta B. La Figura 12 también muestra que después del día 60 la cantidad de crías producidas en todas menos 1 colmena alimentada con la dieta B (Colmena n.º 12) disminuye mientras que todas las

10 colmenas alimentadas con la dieta A muestran un aumento de crecimiento lineal. Tres de cada cinco colmenas alimentadas con la dieta B dejaron de tener crías operculadas el día 84, mientras que todas las colmenas alimentadas

con la dieta A continuaron produciendo crías. Esto demuestra que la omisión de isofucoesterol-fucoesterol en la dieta A afecta gravemente la capacidad de una colmena de abejas para producir crías y que los otros esteroides no pueden compensar esta deficiencia. La producción de crías es una función esencial para la supervivencia de una colmena.

Las Tablas 2 y 3, y las Figuras 12, 14, 15, 16 y 17 muestran que en la dieta A la cantidad de crías en cada momento es estable (Figura 14A), mientras que en la dieta B la cantidad de crías producidas en cada momento es menor que en la dieta A. Concluimos que con la dieta A las colmenas son estables en las condiciones puestas a prueba durante 96 días o 4,5 generaciones de abejas nodrizas (a pesar de la tensión severa descrita anteriormente). Las colmenas claramente tienen menos rendimiento en la producción de crías y son menos estables cuando se omite de la dieta el isofucoesterol-fucoesterol al 0,0625 % y se reemplaza aumentando proporcionalmente la concentración de cada uno de los otros esteroides añadidos.

La Figura 13 muestra el consumo de las dietas A y B. Dado que el uso principal del polen en una colmena es alimentar a las abejas nodrizas que a continuación alimentan a las larvas y a la reina, es lógico que, si se producen menos crías, se consumirá menos dieta (Figura 13).

Las fotografías de los marcos con crías ilustran claramente la diferencia en el número y patrón de crías operculadas en una colmena n.º 29 alimentada con dieta promedio A (Figura 15) y en una colmena n.º 26 alimentada con dieta promedio B (Figura 16).

La Figura 17 muestra que las colmenas alimentadas con la dieta A producen consistentemente más crías que las alimentadas con la dieta B.

Concluimos que la adición de isofucoesterol-fucoesterol a una dieta incompleta que contiene colesterol, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol y 24-metilen-colesterol en concentraciones similares al polen, pero sin isofucoesterol-fucoesterol, da como resultado una dieta que sostiene una colmena durante más de 4,5 ciclos de cría (generaciones) de abejas nodrizas (sin acceso a polen u otros nutrientes (excepto solución de azúcar)). Dicho a la inversa, la realización muestra que la omisión de isofucoesterol-fucoesterol de una dieta completa reduce gravemente la aptitud de la colmena y de las abejas y que la compensación proporcional de esta omisión de isofucoesterol-fucoesterol con los otros esteroides no compensa esta omisión.

Esta es una primera y clara demostración de que el isofucoesterol-fucoesterol es funcionalmente importante y esencial en la dieta de una colmena de abejas. Los datos muestran que el isofucoesterol-fucoesterol es necesario para la producción de crías en las abejas a pesar de la presencia de todos los demás esteroides principales presentes en el polen y las abejas y que su función fisiológica no puede ser asumida por los otros esteroides (colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol, beta-sitosterol que normalmente representan >80 % del total de esteroides presentes en las abejas - siendo el resto isofucoesterol-fucoesterol) presentes en la dieta. La Dieta A es también la primera dieta artificial completa para abejas que está libre de polen.

La importancia del 24-metilen-colesterol

Las colmenas alimentadas con la dieta C = dieta A de la cual se omitió el 24-metilen-colesterol comenzaron a mostrar una diferencia creciente en la cantidad producida desde el día 48 en adelante (Figuras 18 y 19, Tablas 2, 3 y 4). Entre el día 36 y el día 96, las colmenas alimentadas con la dieta C produjeron 1126 crías operculadas acumuladas en promedio frente a 1588 crías operculadas acumuladas en promedio para las colmenas alimentadas con la dieta A. Observamos que la diferencia en las crías operculadas producida en la dieta A frente a la dieta B (menos isofucoesterol-fucoesterol) ya es evidente en los días 24-36 (Tabla 2, Tabla 3). La aparición tardía de un fenotipo debido a la omisión de 24-metilen-colesterol como se observa con la dieta C en comparación con el efecto de la omisión de isofucoesterol en la dieta B puede explicarse mediante las observaciones de Sbovoda y col. (Tabla 7) que las abejas tienen un mecanismo para reciclar una reserva de 24-metilen-colesterol en una colmena para criar y alimentar a las abejas, reteniendo así (parte de) la reserva en la colmena. Los datos presentados en esta realización destacan aún más la mayor importancia del isofucoesterol-fucoesterol en una dieta artificial para abejas frente al 24-metilen-colesterol, ya que el efecto de su omisión se manifiesta antes.

Estos datos son la primera demostración técnica de que el 24-metilen-colesterol es funcionalmente necesario en la dieta de una abeja y que su función fisiológica no puede compensarse completamente con la presencia de otros esteroides (colesterol, isofucoesterol/fucoesterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol) presentes en la dieta y a concentraciones y proporciones normalmente presentes en el polen.

EJEMPLO 8: Fenotipos conductuales de las deficiencias de isofucoesterol/fucoesterol y 24-metilen-colesterol.

El número de abejas y abejas nodrizas en una colmena es importante, pero la calidad y la aptitud fisiológica de las abejas son igualmente fundamentales para la aptitud de una colmena y su capacidad para polinizar cultivos.

Las abejas necesitan ejecutar funciones de comportamiento complejas en la colmena (limpiar, alimentar a las crías, construir celdas, proteger, ventilar, calentar...) y fuera de la colmena (volar largas distancias, hasta 2 km desde la

colmena, encontrar el camino de regreso a casa, señalar la ubicación de fuentes de alimentación a las compañeras de nido, recolectar néctar, polen, minerales, agua, propóleo...). La cantidad de abejas en una colmena y su longevidad determina cuántos recursos pueden recolectar las colmenas para sostener y hacer crecer la colmena. Desde una perspectiva comercial, las colmenas más grandes, más activas y bien alimentadas (con recolectoras que viven más tiempo y están más en forma) polinizan mejor los cultivos y pueden soportar mejor la exposición a pesticidas y otros factores estresantes (calor, transporte, enfermedades). En resumen, no sólo es importante la cantidad de abejas en una colmena sino también su calidad.

Se sabe que los diferentes esteroides afectan de manera diferente las estructuras de membrana en las células. Una de las funciones de los esteroides en las membranas de las células animales es regular la fluidez de las membranas y la organización de las proteínas en balsas en las membranas, lo que es importante para el funcionamiento adecuado de, entre otros, células de músculos y neuronas, la formación de la curvatura de la membrana y vesículas y la adaptación a diferentes temperaturas ambientales.

En esta realización, examinamos si las colmenas en recintos carpados alimentadas con diferentes dietas que difieren sólo en la composición de esteroides producen abejas con la misma aptitud conductual.

Caracterizamos el comportamiento y la actividad de las abejas alimentadas con las siguientes dietas en la misma carpas siguiendo los mismos protocolos descritos anteriormente (véase la Figura 11):

1. Colmena en exterior: Estas colmenas comenzaron al igual que las colmenas en las carpas con reinas hermanas y la misma cantidad de abejas, pero se colocaron en exterior, junto a las carpas, con pleno acceso al flujo de polen y al néctar de la naturaleza.

2. Colmenas en carpas - Dieta A: Dieta A, véase anteriormente (mismas colmenas y momentos que en el Ejemplo 7). Dieta A' = dieta A con el doble de concentración de esteroides añadidos (0,75 %) en la misma composición y proporciones que la Dieta A. Las dietas A y A' tienen fenotipos idénticos.

3. Colmenas en carpas - Dieta B: Dieta A menos isofucosterol/fucosterol (la concentración de otros esteroides añadidos se ajusta proporcionalmente hacia arriba como se ha descrito anteriormente; mismas colmenas y momentos que la realización 1)

4. Colmenas en carpas - Dieta C: Dieta A menos 24-metilen-colesterol (la concentración de otros esteroides añadidos se ajusta proporcionalmente hacia arriba como se ha descrito anteriormente; mismas colmenas y momentos que la realización 1)

5. Colmenas en carpas - Dieta D: Dieta A sin isofucosterol/fucosterol y 24-metilen-colesterol (la concentración de otros esteroides añadidos se ajustó hacia arriba a la concentración de la dieta A' (0,75 %); ejecución en carpas paralelas en los momentos como en la realización 1; mismo protocolo general de alimentación y evaluación de la colmena)

6. Colmenas en carpas - Dieta E: Dieta disponible comercialmente (dieta completamente diferente; ejecución en carpas paralelas en los momentos como en la realización 1; mismo protocolo general de alimentación y alteración de la colmena)

Las colmenas alimentadas con la dieta E (dieta comercial) esencialmente dejaron de producir crías después de los 36 años (tabla 5, Figura 20). Las colmenas alimentadas con las dietas A, B, C y D todavía estaban produciendo crías el día 96. Las dietas y el diseño experimental se describen en el ejemplo 7.

El día 98-99, las colmenas se abrieron y se puntuaron visualmente para varios fenotipos (puntuaciones: fenotipo ausente (-), fenotipo presente (+), fenotipo más severo (++), el fenotipo es aún más severo (+++)).

Fueron puntuadas de forma independiente por 2 observadores para los siguientes fenotipos:

- Letárgico: Abejas sentadas inmóviles en colmenas.
- Temblores, falta de coordinación: abejas que caminan con las patas traseras arrastradas, caminan de manera inestable, las alas se colocan con menos rapidez desde la posición abierta hasta la posición plegada (indicaciones de actividad neuromuscular descoordinada)
- Reacción débil - sin vuelo: Las abejas en un marco responden lentamente al ser molestadas al retirar el marco de la colmena o arrastrando un par de pinzas a través de las abejas en un marco, las abejas se arrastran más lentamente hacia arriba después de ser empujadas fuera de un marco, no pueden volar cuando se les molesta.
- Movimiento lento: Las abejas caminan más lentamente de lo normal sobre los marcos y/o alrededor del comedero de azúcar y/o la entrada del nido

- Reactividad: Esta es una puntuación integrada del 1-5 (de menor a mayor) que representa la actividad general de la colmena y el vigor de las abejas dentro y fuera de la colmena

5 Los resultados de estas observaciones se presentan en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5 Análisis fenotípico después de 98 y 99 días con diferentes dietas en condiciones en carpas cerradas y en exterior.

DIETA	Letárgico	Temblores, falta de coordinación	Reacción débil, sin vuelo	Movimiento lento	Reactividad
Colmenas en exterior junto a carpas - recolectando polen	-	-	-	-	5
Dietas A (0,375 % de esteroides; todos los esteroides) y Dieta A' (0,750 %; todos los esteroides) - en carpa	-	-	-	-	5
Dieta C (Dieta A menos 24-metilen-colesterol) - en carpa	-	-	-	+	3
Dieta B (Dieta A menos isofucoesterol/fucoesterol I) - en carpa	++	+	++	++	2
Dieta D (Dieta A menos 24 metilen-colesterol y menos isofucoesterol; 0,75 % de concentración de esteroides) - en carpa	-	+++	++	++	3
Dieta E: Tortita disponible comercialmente - en carpa	+++	-	+++	+++	1

10

Fenotipo ausente - Fenotipo más severo ++
Fenotipo presente + El fenotipo es muy severo +++

Tabla 6: Mesa superior: Promedio de crías operculadas presentes en cada momento desde el día 24 al 96 para las dietas A, B, C y E (una dieta comercial ampliamente extendida en los Estados Unidos). Mesa inferior: Recuentos de crías operculadas para colmenas alimentadas con la Dieta E

15

Recuento de crías operculadas	D24	D36	D48	D60	D72	D84	D96
Dieta promedio A	320	445	364	307	291	322	303
Dieta promedio B	219	119	96	173	105	81	98
Dieta promedio C	322	434	249	281	223	206	168
Dieta promedio E	255	244	77	69	16	0	0

Recuento de crías operculadas	Número de colmena	D24	D36	D48	D60	D72	D84	D96
Dieta E	9	199	229	52	41	9	0	0
	13	245	287	54	88	33	1	0
	37	364	174	108	86	34	0	0

Recuento de crías operculadas	Número de colmena	D24	D36	D48	D60	D72	D84	D96
	44	344	258	54	109	4	0	0
	55	124	270	116	19	0	0	0
Promedio		255	244	77	69	16	0	0

20 Las abejas con las dietas A y A' eran igualmente activas, sensibles y móviles que las abejas de las colmenas que recolectaban alimentos en la naturaleza ubicadas junto a los recintos carpados.

Las colmenas alimentadas con la dieta C (dieta A menos el 24-metilen-colesterol) mostraron el fenotipo de movimiento lento (+) y habían reducido una puntuación de capacidad de respuesta de 3.

Las colmenas alimentadas con la dieta B (dieta A menos isofucosterol/fucosterol) mostraron letárgico (++), temblores/descoordinación (++); fenotipos de reacción débil/sin vuelo (++) y movimiento lento (++) y tuvieron una puntuación de reactividad reducida de 2.

Las colmenas alimentadas con la dieta D (Dieta A' menos 24 metilen-colesterol y menos isofucosterol) presentaron sorprendentemente más fenotipo de temblores/descoordinación (+++) que la Dieta B, pero ningún fenotipo letárgico. Debido a la ausencia del fenotipo letárgico en la Dieta D, las colmenas alimentadas con la Dieta D recibieron una puntuación de reactividad de 3. Los fenotipos de reacción débil/sin vuelo (++) y movimiento lento (++) fueron similares en las colmenas alimentadas con las dietas B y D, pero claramente diferentes de la Dieta C.

Concluimos que la omisión de isofucosterol/fucosterol, o 24-metilen-colesterol, de la dieta A que contiene los principales esteroides presentes en las abejas (colesterol, 24-metilen-colesterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, isofucosterol/fucosterol) no solamente da como resultado menos crías operculadas producidas (realización 1), sino que también da como resultado abejas que presentan una serie de fenotipos que probablemente afecten su aptitud fisiológica para ejecutar tareas complejas de la colmena de manera eficiente.

Muestra además que los fenotipos debidos a la ausencia de isofucosterol-fucosterol o de 24-metilencolesterol o de ambos esteroides no pueden compensarse fisiológicamente mediante un aumento de los otros esteroides. Además, muestra que eliminar tanto el isofucosterol como el 24-metilencolesterol tiene un efecto neuromuscular (descoordinado) más severo que omitir uno de estos esteroides en un momento de la dieta A', lo que afecta su aptitud.

La observación de que el efecto de eliminar el isofucosterol/fucosterol de la dieta A es más severo que el efecto de eliminar el 24-metilen-colesterol es un hallazgo sorprendente para el campo, ya que en el campo se afirma ampliamente que el 24-metilen-colesterol es "el fitosterol crítico y esencial en las abejas revisado en "Sterol and Lipid metabolism in bees" Furse y col 2023, <https://doi.org/10.1007/s11306-023-02039-1>).

Los ejemplos de datos 7 y 8 muestran que las abejas requieren una multiplicidad de esteroides ya que tanto el isofucosterol como el 24-metilencolesterol omitidos solos o en combinación no pueden ser reemplazados funcionalmente en la fisiología de la abeja por otros esteroides presentes en el polen.

Concluimos que la dieta A es una dieta completa no sólo desde la perspectiva de sostener la producción de crías en una colmena sino también desde la perspectiva de producir abejas de calidad. Además, concluimos que el isofucosterol/fucosterol es esencial en esta dieta y que no puede sustituirse aumentando proporcionalmente los otros fitosteroides clave presentes en el polen. Lo mismo se demostró con el 24-metilencolesterol, pero en menor medida. La Figura 20 y la Tabla 5 muestran el rendimiento superior de la dieta completa A en comparación con una tortita de proteína disponible comercialmente y ampliamente usada en los Estados Unidos.

Tabla 7: Lista de referencias de literatura

Chakrabarti y col.

- doi:10.3390/molecules25030571

Grupo Herbert y Svoboda

- doi:10.1007/BF02534310
- doi:10.1016/0022-1910(80)90135-3
- doi:10.1016/0022-1910(80)90136-5
- doi:10.1016/0020-1790(86)90024-7
- doi:10.1007/BF02535107

Feldlaufer

- doi.org/10.1002/arch.940030502

Furse S y col

- doi: 10.1007/s11306-023-02039-1

Tian y col

- doi:10.1038/s41467-018-05619-1

REIVINDICACIONES

1. Un método para alimentar invertebrados u organismos de acuicultura, que comprende

- 5 ▪proporcionar una composición sustituta del polen que comprende una cantidad nutricionalmente eficaz de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos; y
 ▪administrar la composición sustituta del polen a invertebrados u organismos de acuicultura;

10 en donde la composición sustituta del polen comprende una cantidad nutricionalmente eficaz de al menos un esteroles adicional, preferiblemente al menos dos esteroides adicionales seleccionados del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol o un conjugado fisiológicamente disponible de los mismos.

15 2. El método de la reivindicación 1, en donde

- los invertebrados son insectos que se alimentan de polen, preferiblemente insectos de los órdenes *Hymenoptera* y *Coleoptera*, más preferiblemente abejas, abejorros, moscas soldado negras, sírfidos, o coccinélidos,
 20 ▪los organismos de acuicultura son organismos de acuicultura que se alimentan de plancton y algas, preferiblemente peces, larvas de peces, ostras, almejas, moluscos, gasterópodos, o crustáceos.

25 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad nutricionalmente eficaz de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos es una dosis diaria del 0,0006 % en peso al 0,052 % en peso del peso corporal de los invertebrados u organismos de acuicultura con vida.

30 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad nutricionalmente eficaz de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos es del 10 % en peso al 60 % en peso de la cantidad total de esteroides del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de los invertebrados u organismos de acuicultura, o en la composición sustituta del polen.

35 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos se administra en una proporción de 0,14 g a 12 g de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos por 30000 abejas por período de dos semanas.

40 6. El método de la reivindicación 5, en donde el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos se administra en una cantidad del 10 % en peso al 60 % en peso de la cantidad total de esteroides del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de los invertebrados u organismos de acuicultura, o de la composición sustituta del polen.

45 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores,

- en donde la cantidad nutricionalmente eficaz de isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y el al menos un esteroles adicional es una proporción de administración de 0,2 a 48 gramos por 30000 abejas por un período de tiempo de dos semanas, y
 ▪en donde el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos se administra en una cantidad del 10 % en peso al 60 % en peso de la cantidad total de esteroides del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de abejas o de la composición sustituta del polen.

50 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,

- en donde el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y el al menos un esteroles adicional se administran en una proporción de 0,4 g a 36 g por 30000 abejas por un período de tiempo de dos semanas, y
 ▪en donde el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos se administra en una cantidad del 10 % en peso al 60 % en peso de la cantidad total de esteroides del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de abejas o de la composición sustituta del polen.

55 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,

- en donde el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos y el al menos un esteroles adicional se administran en una proporción de 0,6 g a 20 g por 30000 abejas por un período de tiempo de dos semanas, y

•en donde el isofucosterol, fucosterol o una mezcla de los mismos se administra en una cantidad del 10 % en peso al 60 % en peso de la cantidad total de esteroides del grupo de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en la dieta total de abejas o de la composición sustituta del polen.

10. Los métodos de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, beta-estigmasterol, estigmasterol y/o campesterol se administran en una cantidad del 0,001 % en peso al 0,087 % en peso del peso de los invertebrados u organismos de acuicultura con vida por día.

11. Los métodos de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad nutricionalmente eficaz es:

- isofucosterol en una cantidad del 10 % en peso al 60 % en peso,
- colesterol en una cantidad del 0 % en peso al 50 % en peso,
- 24-metilencolesterol en una cantidad del 0 % en peso al 50 % en peso,
- beta-sitosterol, estigmasterol y/o campesterol en una cantidad del 0 % en peso al 50 % en peso

en comparación con la cantidad total de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, beta-estigmasterol, estigmasterol y/o campesterol.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración total de esteroides es del 0,01 % en peso al 4 % en peso, preferiblemente del 0,05 % en peso al 3 % en peso y aún más preferiblemente del 0,05 % en peso al 2 % en peso, y aún más preferiblemente del 0,05 % en peso al 1,5 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las concentraciones de esteroides se seleccionan del grupo de:

- colesterol en una cantidad del 0,001 % en peso al 2 % en peso, preferiblemente del 0,001 % en peso al 1,5 % en peso, más preferiblemente del 0,06 % en peso al 1,2 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen,
- 24-metilencolesterol en una cantidad del 0,001 % en peso al 2 % en peso, preferiblemente del 0,001 % en peso al 1,5 % en peso, más preferiblemente del 0,06 % en peso al 1,2 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen,
- sitosterol, preferiblemente beta-sitosterol en una cantidad del 0,001 % en peso al 2 % en peso, preferiblemente del 0,001 % en peso al 1 % en peso, más preferiblemente del 0,03 % en peso al 0,6 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen,
- isofucosterol en una cantidad del 0,01 % en peso al 5 % en peso, preferiblemente del 0,01 % en peso al 2 % en peso, más preferiblemente del 0,01 % en peso al 1,0 % en peso, más preferiblemente del 0,03 % en peso al 0,6 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen,
- campesterol en una cantidad del 0,001 % en peso al 2 % en peso, preferiblemente del 0,001 % en peso al 1 % en peso, más preferiblemente del 0,02 % en peso al 0,35 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen,
- estigmasterol en una cantidad del 0,001 % en peso al 2 % en peso, preferiblemente del 0,001 al 1 % en peso, más preferiblemente del 0,01-0,2 %, en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen, o
- cualquier combinación de los mismos.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es una dieta de invertebrados completa, parte de una dieta de invertebrados o un suplemento dietético y en donde la proporción de 24-metilencolesterol con respecto al esteroide adicional o a la combinación de esteroides adicionales es de 10:1 a 1:1.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición se administra a invertebrados de las familias *Apidae*, en particular abejas (*Apini*), abejorros (*Bombini*) o abejas sin aguijón (*Meliponini*).

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición se administra

- en forma sólida, tal como en forma de una tortita o un polvo, o en forma líquida, tal como en forma de una solución, aceite o aerosol;
- dentro o fuera de la colmena.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde

- 5 •la fuente del isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos es un tejido sustituto del polen de una o más especies vegetales seleccionado del grupo que consiste en hojas, tallos, raíces, tubérculos, flores, semillas, cortezas y frutos y combinaciones de los mismos; y/o
- 5 •la fuente del esterol adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol, y estigmasterol, en particular el colesterol, es un tejido sustituto del polen de una o más especies vegetales seleccionado del grupo que consiste en hojas, tallos, raíces, tubérculos, flores, semillas, cortezas y frutos y combinaciones de los mismos.
- 10 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuente del isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos o la fuente del al menos un esterol adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol es un extracto, un aceite o un refinamiento de un tejido no polínico de una o más especies vegetales o una combinación de los mismos.
- 15 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuente del isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos o la fuente del al menos un esterol adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol, estigmasterol es un tejido sustituto del polen de una o más especies vegetales seleccionadas del grupo que consiste en *Solanaceae*, *Poaceae*, *Ranunculaceae*, *Fabaceae*, *Corylaceae*.
- 20 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuente del isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos o la fuente del al menos un esterol adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol es una fuente sustituta del polen seleccionada del grupo que consiste en:
- 25 •una especie de alga marina o de agua dulce, en particular un extracto, un aceite o un refinamiento de *Ulva lactuca*;
- 30 •una especie de diatomea marina, en particular un extracto, un aceite o un refinamiento de *Thalassiosira pseudonana*, *Thalassiosira rotula* o *Chaetoceros muelleri*; y
- 30 •un hongo, en particular un extracto, un aceite o un refinamiento de una levadura tal como *Saccharomyces cerevesiae* o *Yarrowia lipolytica*.
- 35 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el isofucoesterol o fucoesterol y el al menos un esterol adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol se sintetiza química o enzimáticamente, o se obtiene mediante organismos hospedadores modificados genéticamente, tales como hongos, bacterias o algas.
- 40 22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuente del isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos o el al menos un esterol adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol se selecciona del grupo que consiste en algas, plantas, hongos, algas, diatomeas y combinaciones de los mismos, y en donde la fuente del isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos es un tejido sustituto del polen.
- 45 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos y el al menos un esterol adicional seleccionado del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol y beta-sitosterol y estigmasterol se proporciona a una colonia de abejas eusociales a partir de una fuente sintética.
- 50 24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el isofucoesterol, fucoesterol o una mezcla de los mismos y el uno o más esteroides adicionales del grupo que consiste en colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol se proporcionan como parte de una composición sustituta del polen, en donde la composición sustituta del polen comprende:
- 55 •proteínas en una cantidad del 10 % en peso al 50 % en peso, preferiblemente del 15 % en peso al 40 % en peso,
- 55 •ácidos grasos en una cantidad del 1 % en peso al 20 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso al 12 % en peso,
- 60 •carbohidratos en una cantidad del 20 % en peso al 90 % en peso, preferiblemente del 30 % en peso al 70 % en peso,
- 60 •opcionalmente vitaminas, y
- 60 •opcionalmente minerales,
- en donde la cantidad total de componentes suman el 100 % en peso y en donde los % en peso se refieren al peso seco total de la composición.
- 65 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición sustituta del polen está esencialmente libre de polen.

26. Uso de la composición sustituta del polen de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para alimentar a un organismo seleccionado del grupo que consiste en:
- 5 •invertebrados, preferiblemente insectos que se alimentan de polen, más preferiblemente insectos de los órdenes *Hymenoptera* y *Coleoptera*, aún más preferiblemente abejas, abejorros, moscas soldado negras, sírfidos o coccinélidos,
- 10 •organismos de acuicultura, preferiblemente organismos de acuicultura que se alimentan de plancton y algas, más preferiblemente peces, larvas de peces, ostras, almejas, moluscos, gasterópodos o crustáceos.
27. Uso de la composición sustituta del polen según la reivindicación 26 como una tortita concentrada, en donde la concentración de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol es del 10 % en peso al 33 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen.
- 15
28. Uso de la composición sustituta del polen según la reivindicación 27, en donde la composición comprende un constituyente que induce el consumo/apetito de las abejas seleccionado del grupo que consiste en polen, azúcar, aceite o grasa, miel o proteína o una mezcla de los mismos.
- 20
29. Uso de la composición sustituta del polen según la reivindicación 28, en donde la concentración del componente que induce el apetito/consumo de las abejas es del 1 % en peso al 20 % en peso, preferiblemente del 2,5 % en peso al 15 % en peso, aún más preferiblemente del 5 % en peso al 10 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen.
- 25
30. Uso de la composición sustituta del polen según la reivindicación 26, en donde la composición sustituta del polen está en forma líquida o en polvo.
- 30
31. Uso según la reivindicación 30, en donde la concentración de isofucosterol, fucosterol, colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol es del 0,01 % en peso al 99 % en peso en comparación con el peso seco total de la composición sustituta del polen.
- 35
32. Una composición de pienso libre de polen o una composición sustituta del polen en particular para abejas que comprende bien
- 40 •del 0,01 % en peso al 1 % en peso de isofucosterol, preferiblemente del 0,01 % en peso al 0,3 % en peso de isofucosterol, en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen, en donde la composición opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento; o
- 45 •del 0,01 % en peso al 1 % en peso de fucosterol, preferiblemente del 0,01 % en peso al 0,3 % en peso, en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen, en donde la composición opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento; o
- 50 •del 0,01 % en peso al 1 % en peso de isofucosterol y fucosterol, preferiblemente del 0,01 % en peso al 0,3 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen, en donde la proporción en peso de isofucosterol con respecto a fucosterol es de 0,01:a 100 a 100:0,01 y en donde la composición opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento; o
- 55 •del 0,01 % en peso al 1 % en peso de isofucosterol/fucosterol, preferiblemente del 0,01 % en peso al 0,3 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen;
- 60 -en donde la proporción en peso de isofucosterol con respecto a fucosterol es de 0,01:100 a 100:0,01;
- 65 -en donde la composición sustituta del polen comprende además del 0,01 % en peso al 0,5 % en peso de 24-metilen-colesterol en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen;
- en donde la proporción de isofucosterol y fucosterol con respecto a 24-metilen-colesterol es de 2:100 a 100:2; y
- en donde la composición sustituta del polen opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento; o

- del 0,01 % en peso al 1 % en peso de 24-metilen-colesterol, preferiblemente del 0,01 % en peso al 0,3 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen;
- 5 -en donde la composición sustituta del polen comprende además isofucosterol y fucosterol con una proporción en peso de isofucosterol con respecto a fucosterol de 0,01:100 a 100:0,01;
- en donde la proporción en peso de isofucosterol y fucosterol con respecto a 24-metilen-colesterol es de 2:100 a 100:2; y
- 10 -en donde la composición sustituta del polen opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento.
- 33. Una composición de pienso libre de polen o una composición sustituta del polen en particular para abejas que comprende del 0,02 % en peso al 3 % en peso de esteroides, en donde los esteroides se seleccionan de un grupo que consiste en 24-metilen-colesterol, isofucosterol, fucosterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, ergosterol y colesterol en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen;
- 15 -en donde la proporción en peso de isofucosterol y fucosterol con respecto a 24-metilen-colesterol es de 0,5:100 a 100:0,5; y/o
- 20 -en donde la proporción en peso de isofucosterol con respecto a fucosterol es de 0:10 a 10:0; y/o
- de isofucosterol con respecto a la suma de uno o más otros esteroides seleccionados del grupo de 24-metilen-colesterol, fucosterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, colesterol, ergosterol de 2:100 a 100:2; y/o
- 25 -en donde la proporción en peso de fucosterol con respecto a la suma de otros esteroides seleccionados del grupo de 24-metilen-colesterol, isofucosterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, colesterol, ergosterol de 2:100 a 100:2; y/o
- en donde la proporción en peso de 24-metilen-colesterol con respecto a la suma de uno o más otros esteroides seleccionados del grupo de isofucosterol, fucosterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, colesterol, ergosterol de 2:100 a 100:2; y/o
- 30 -en donde la proporción en peso de colesterol con respecto a la suma de uno o más esteroides seleccionados del grupo de 24-metilen-colesterol, isofucosterol, fucosterol, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, ergosterol de 15:1 a 1:100; y/o
- en donde la composición sustituta del polen opcionalmente comprende además polen natural en una cantidad del 1 % en peso al 15 % en peso en comparación con el peso total de la composición sustituta del polen para aumentar el consumo de alimento.
- 35

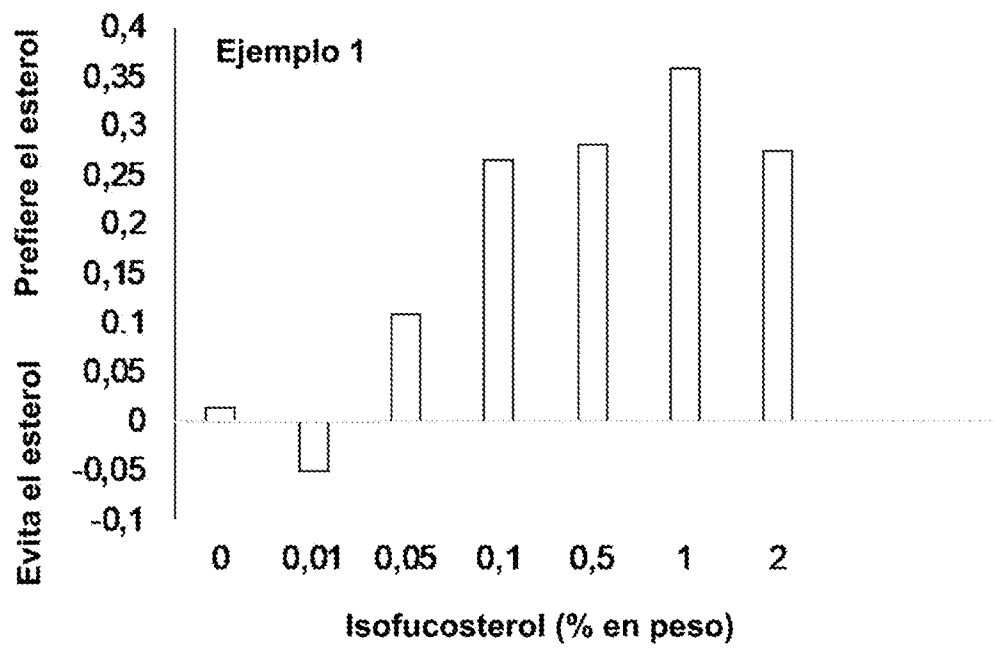


Figura 1

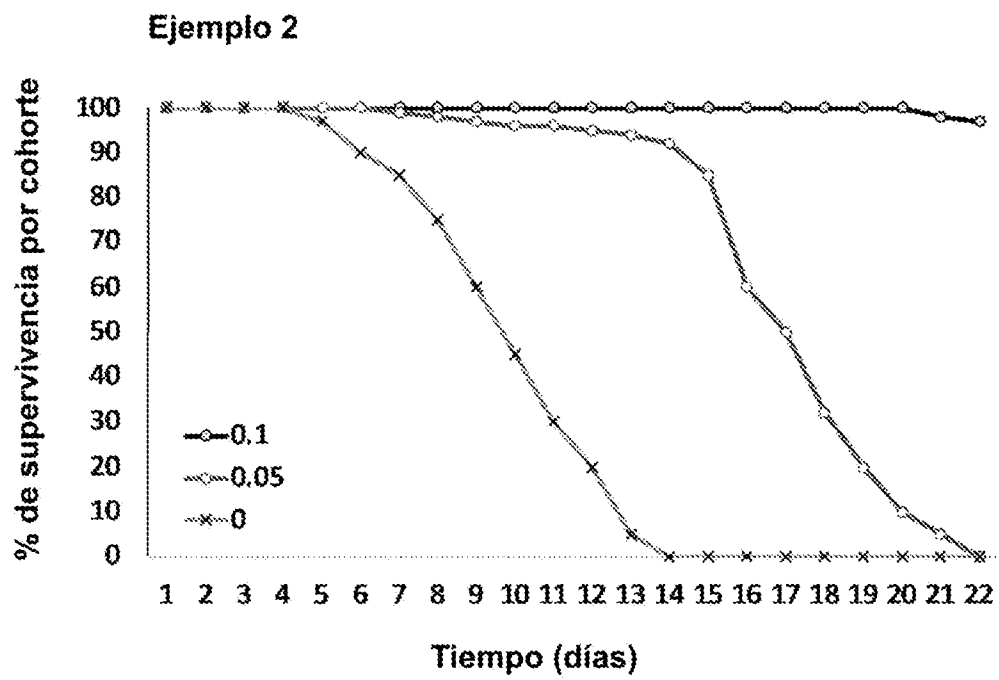


Figura 2

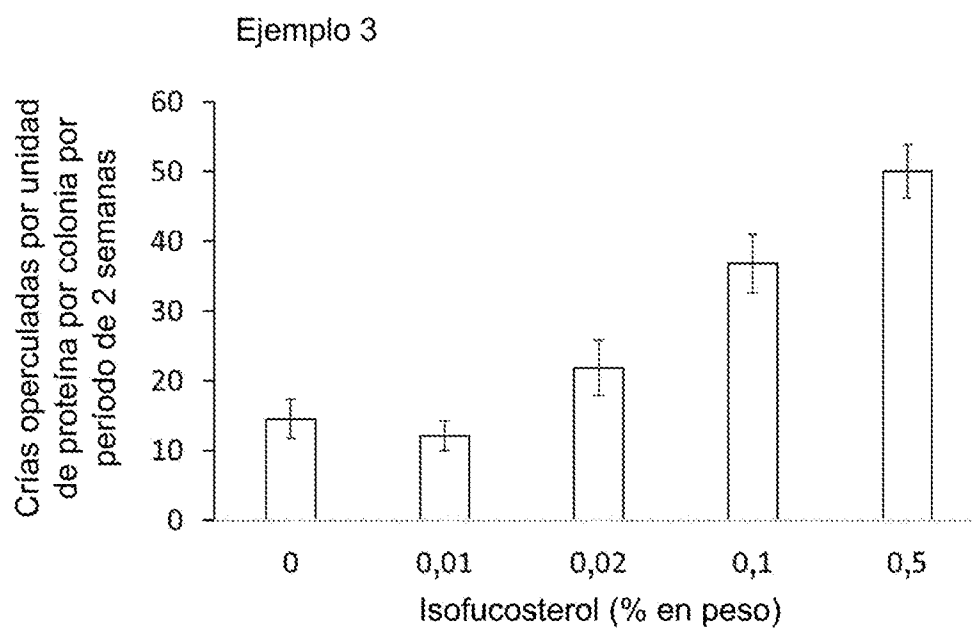


Figura 3

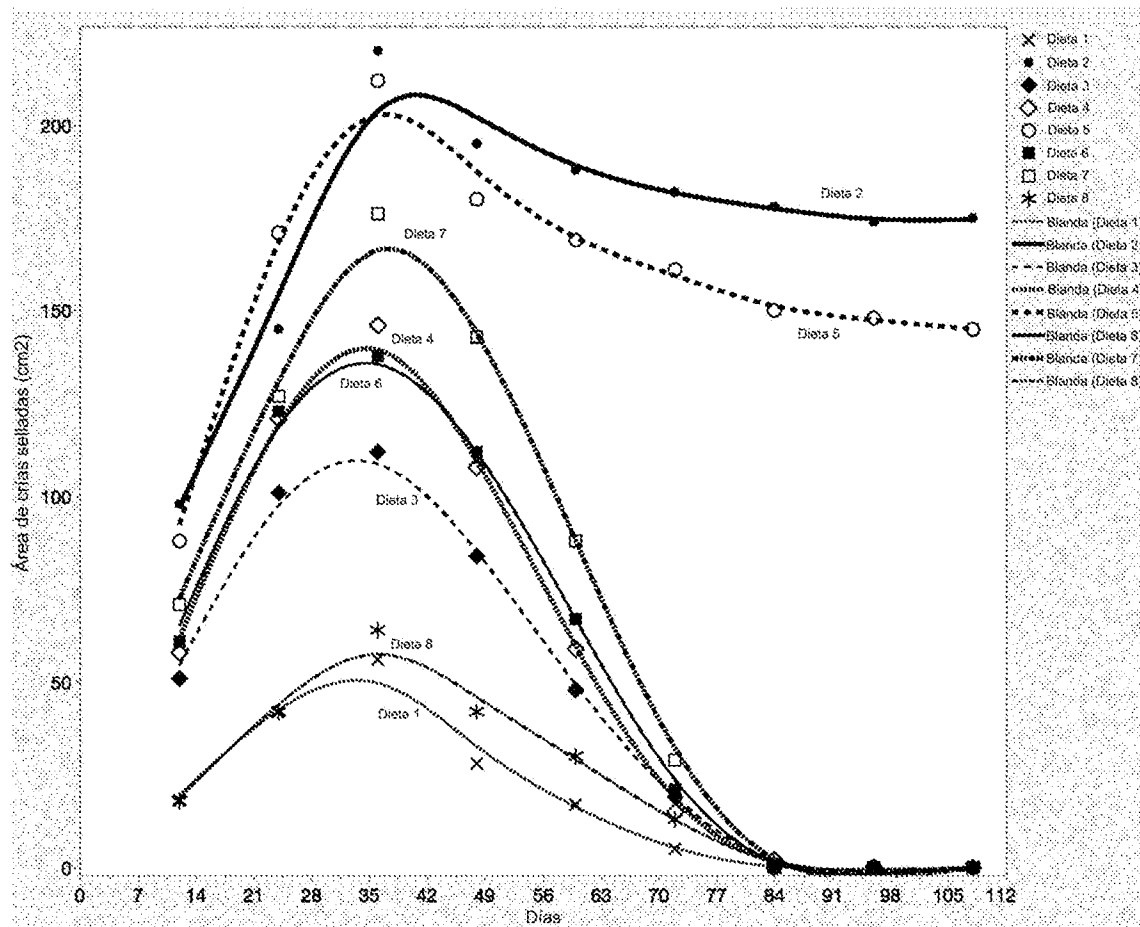


Figura 4

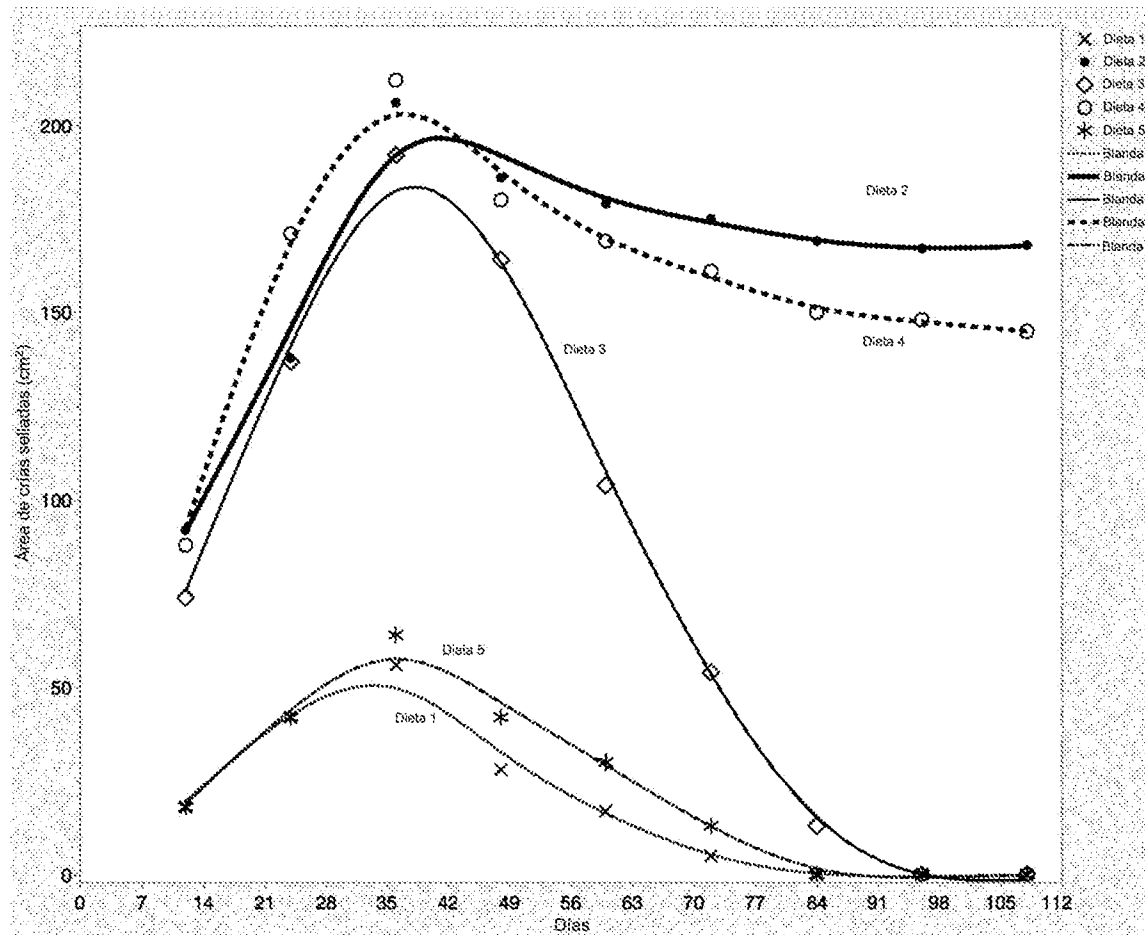


Figura 5

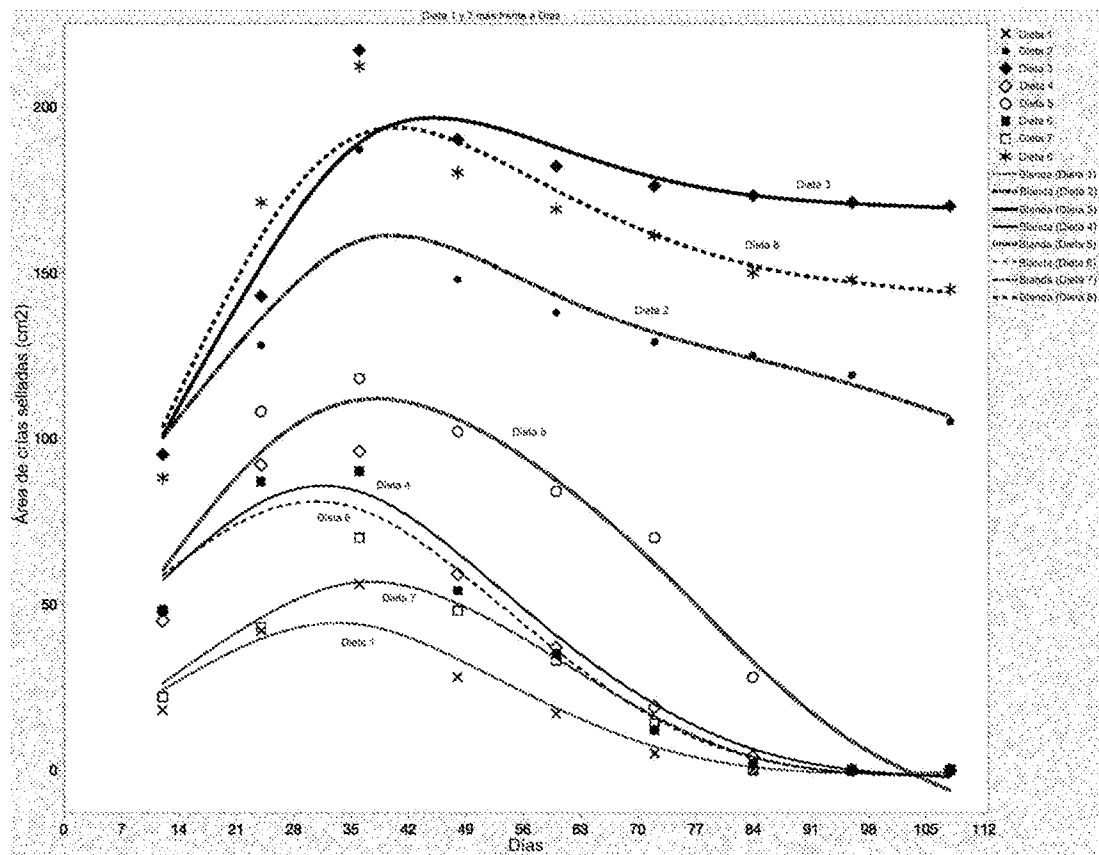


Figura 6

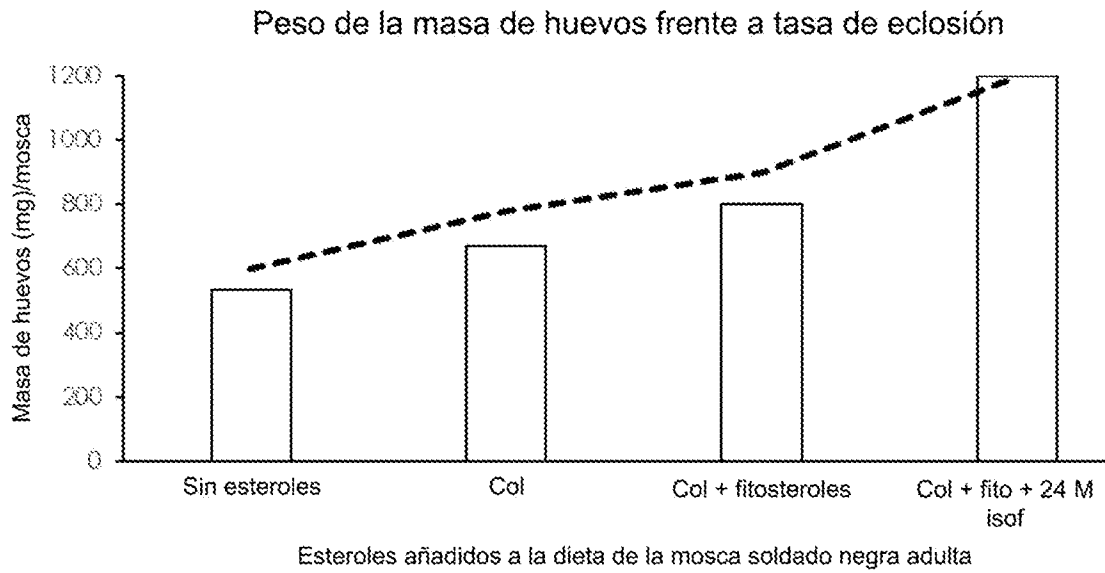


Figura 7

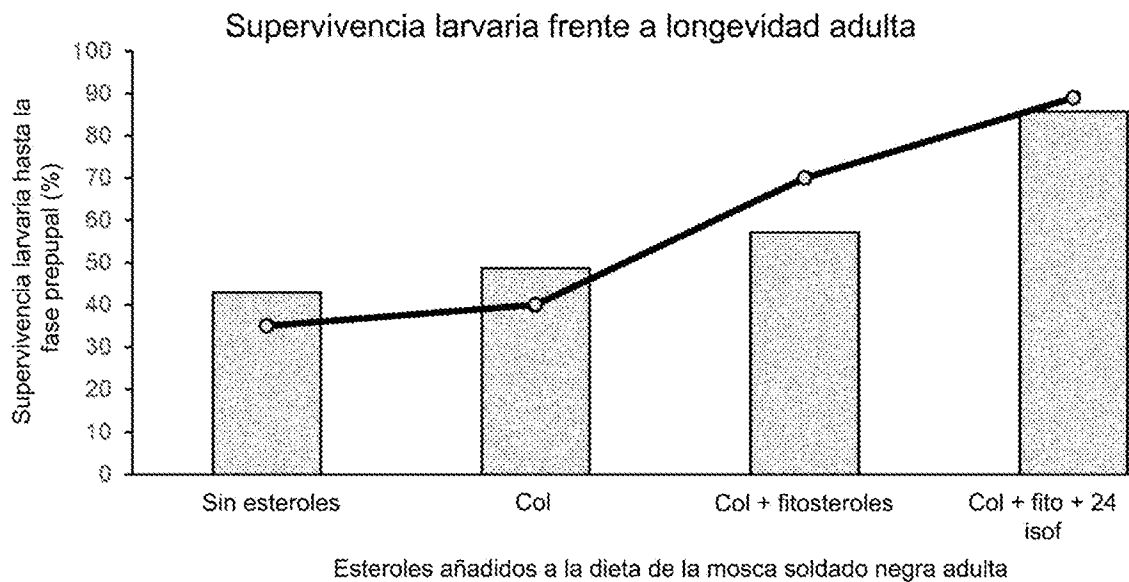


Figura 8

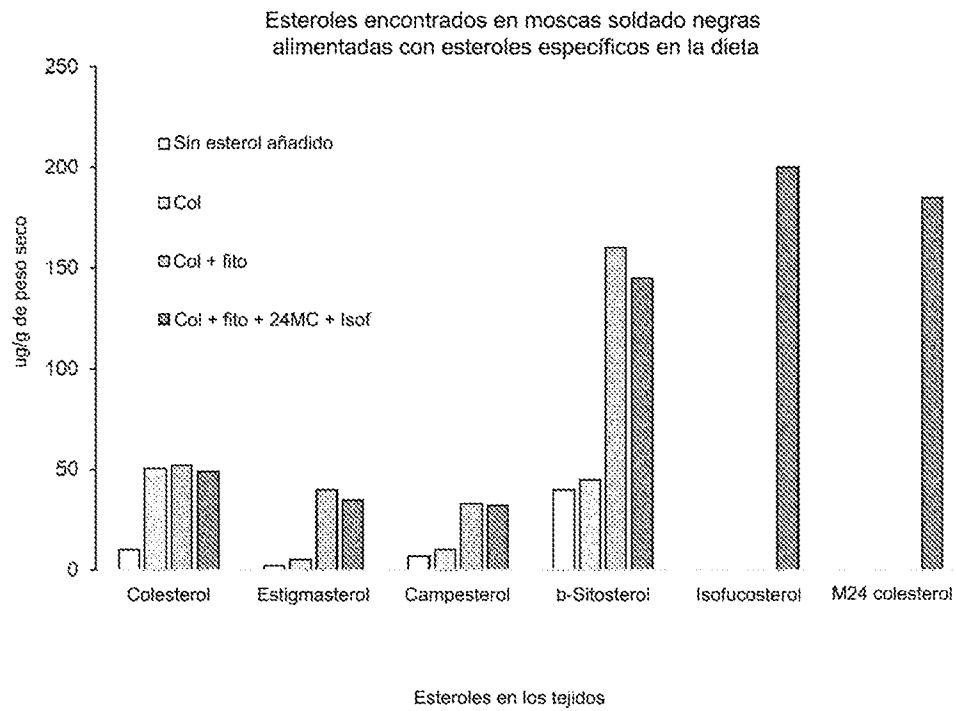


Figura 9

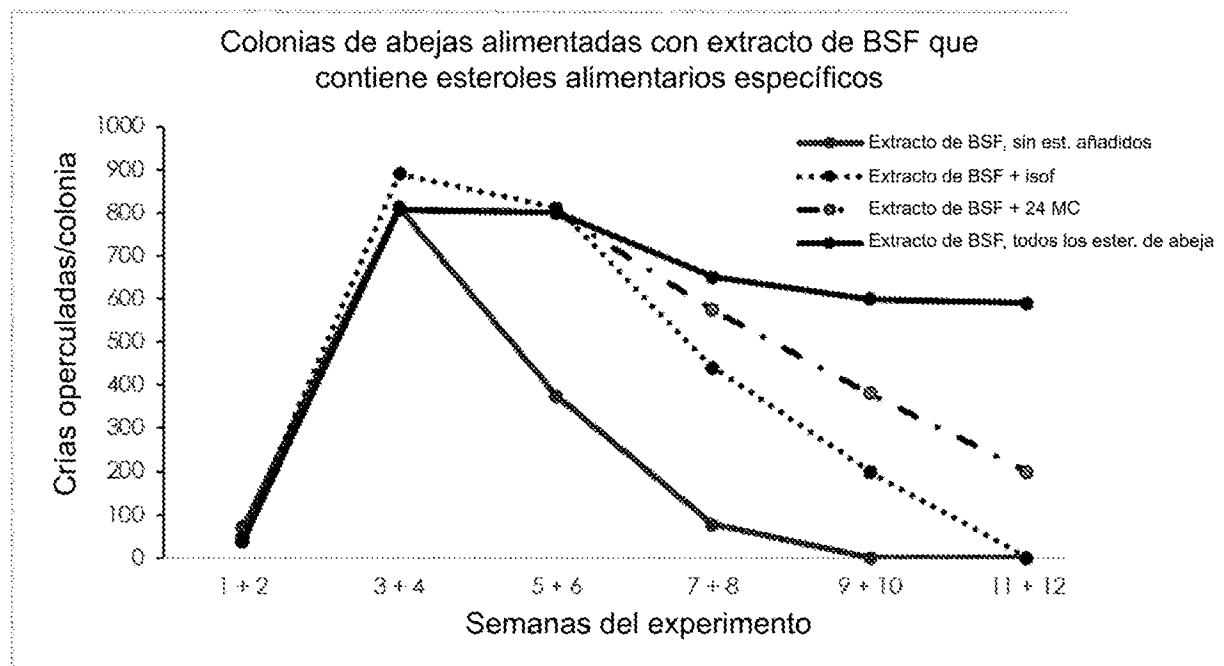


Figura 10

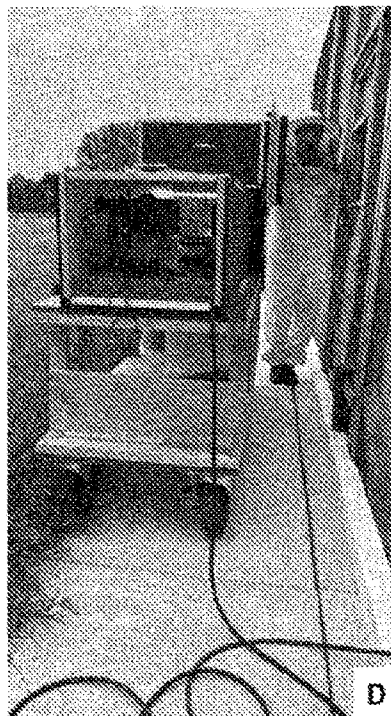
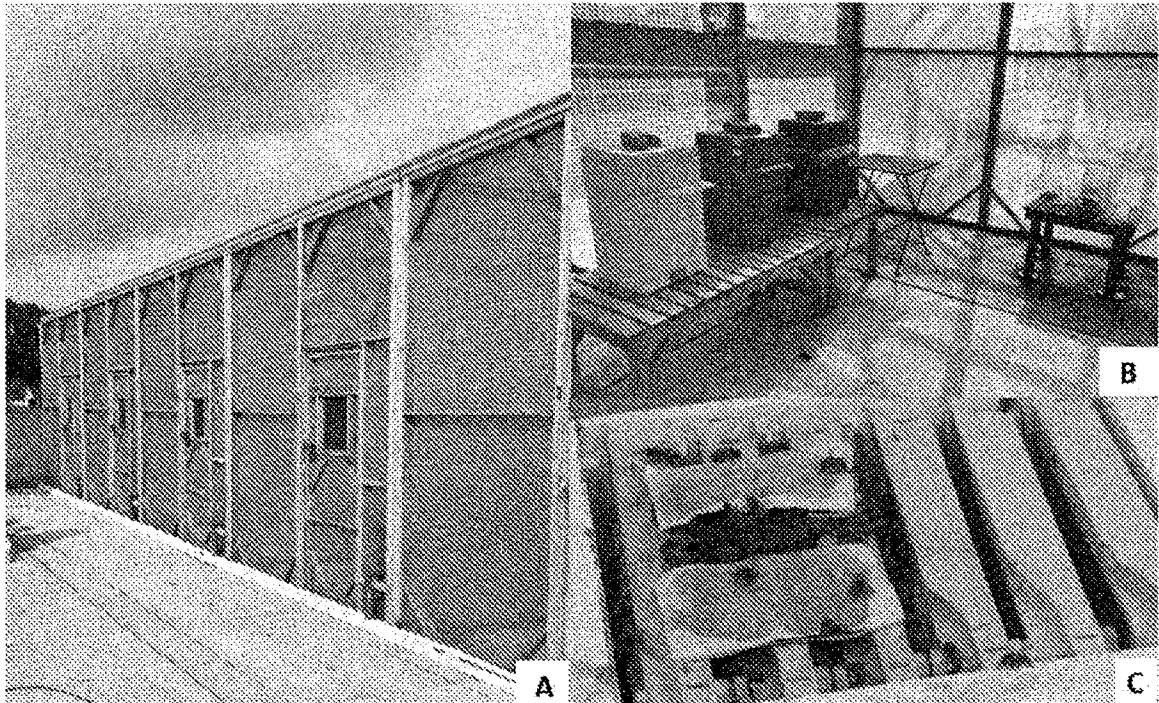


Figura 11

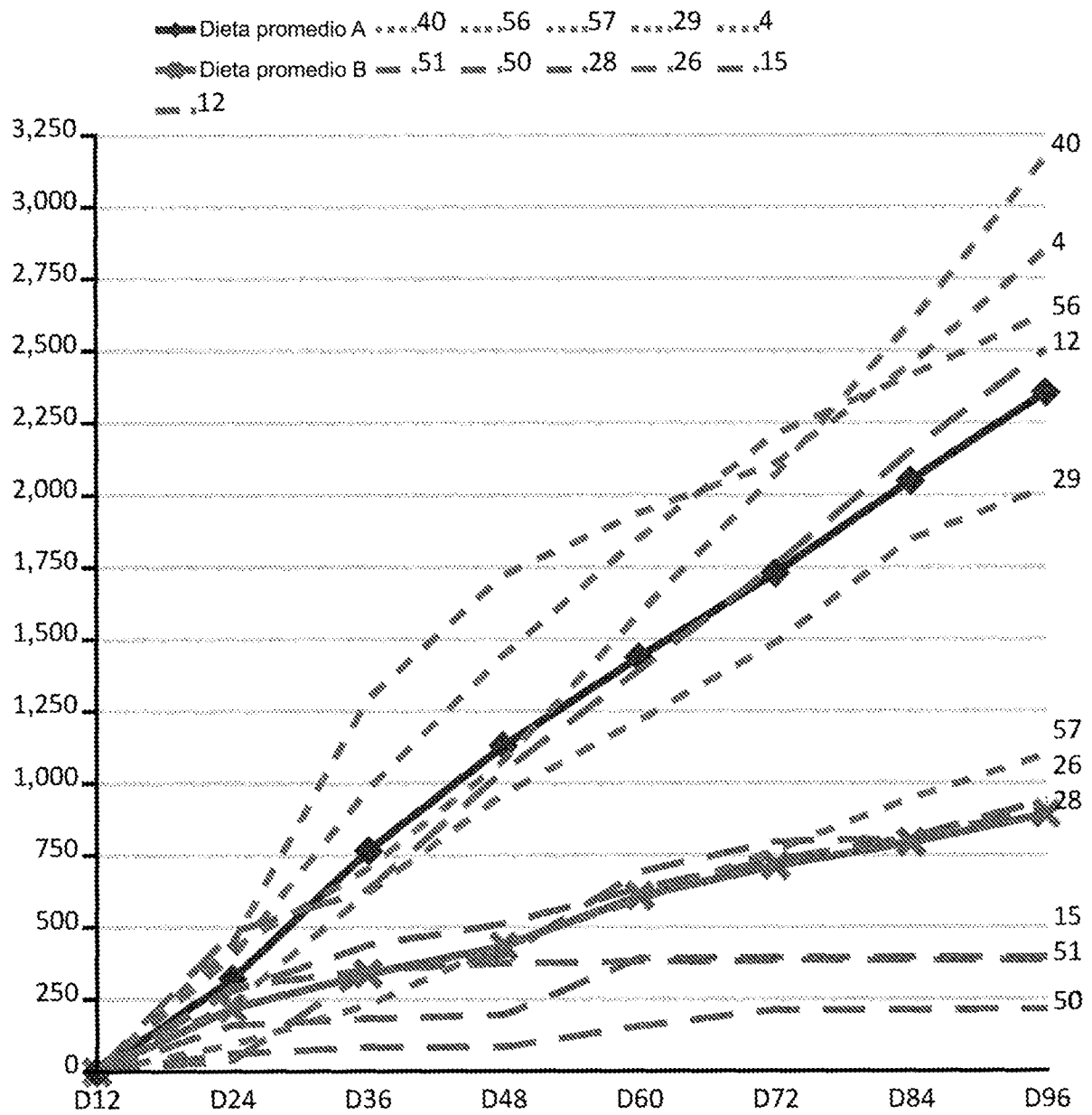


Figura 12

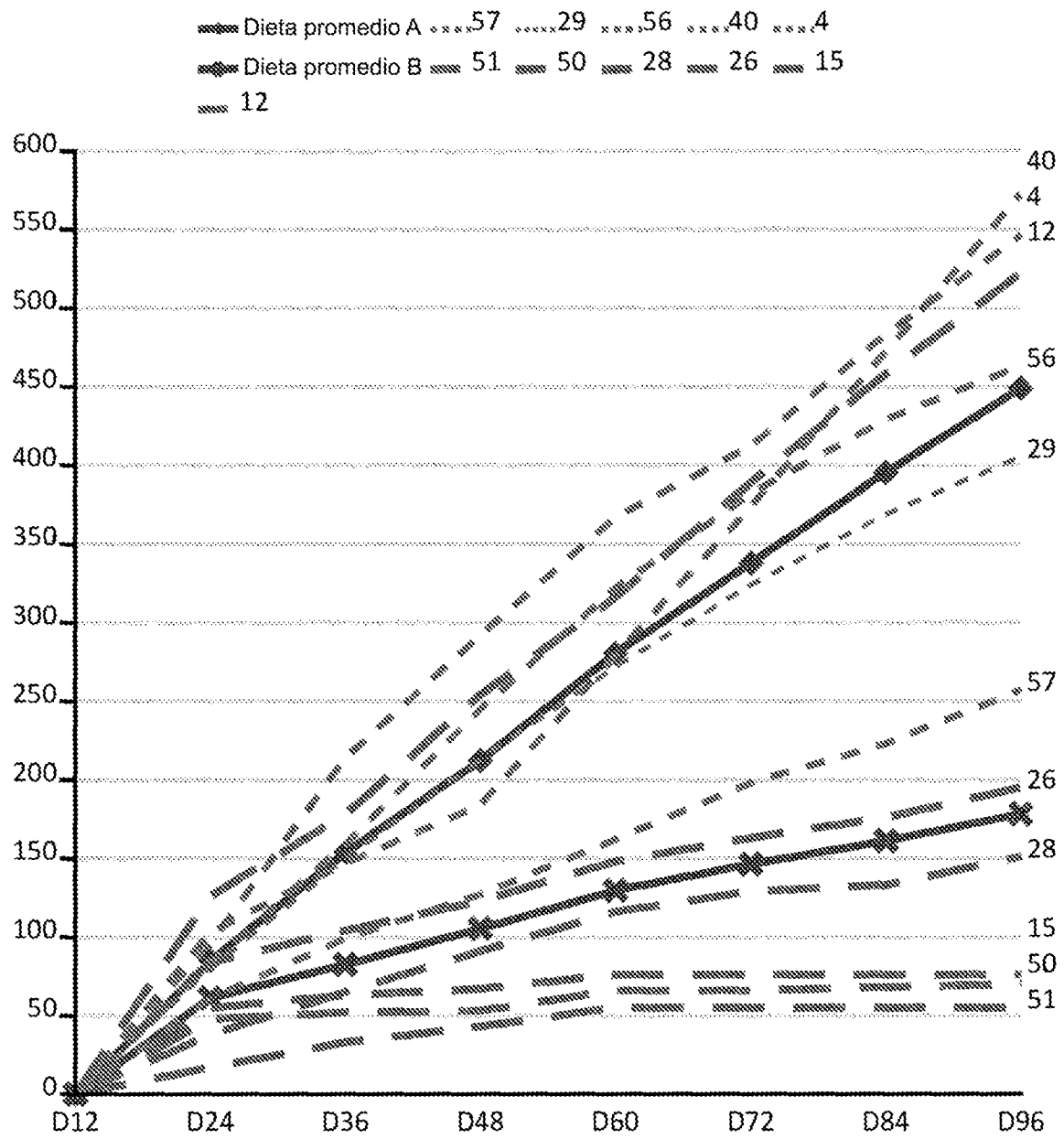


Figura 13

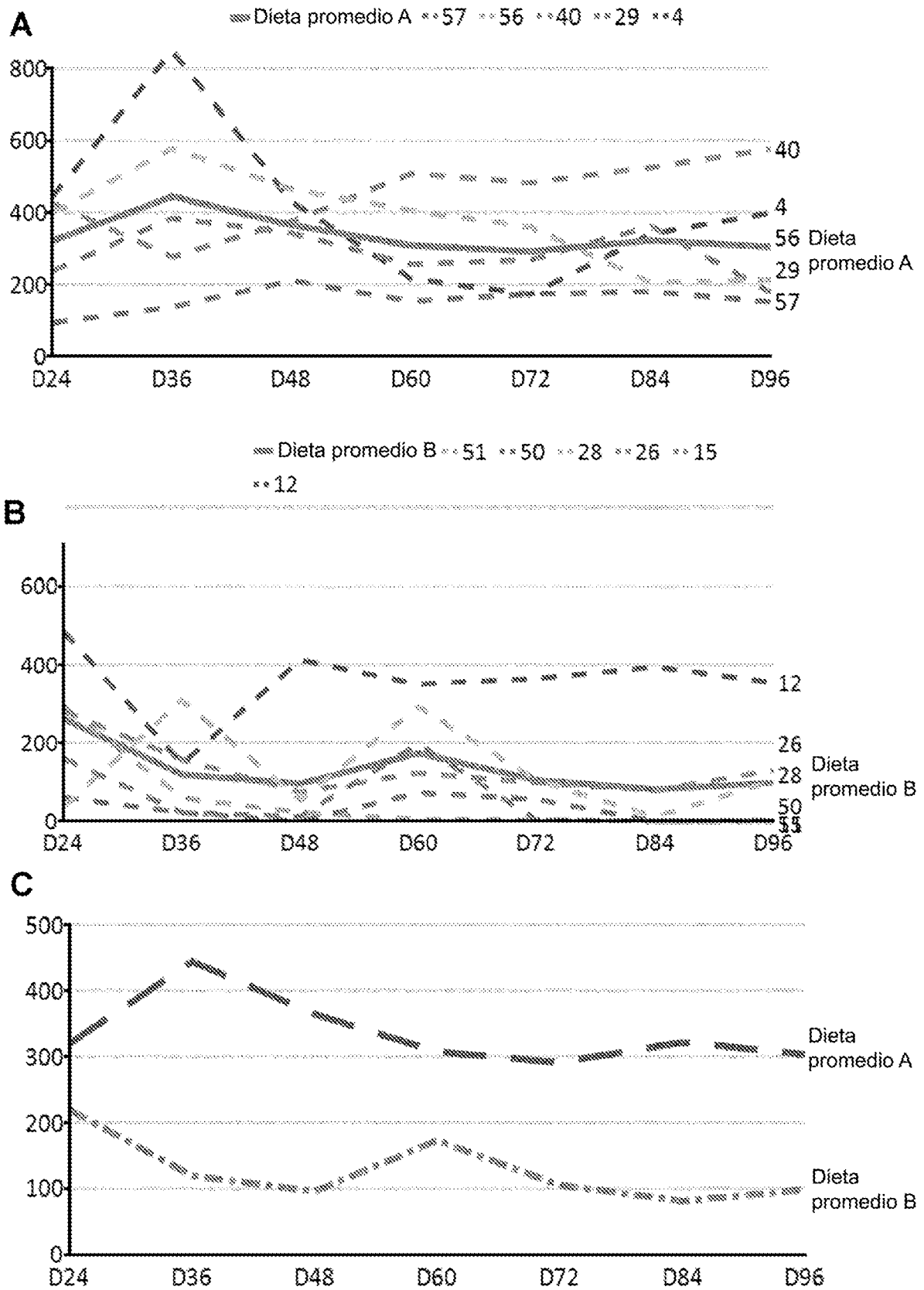


Figura 14

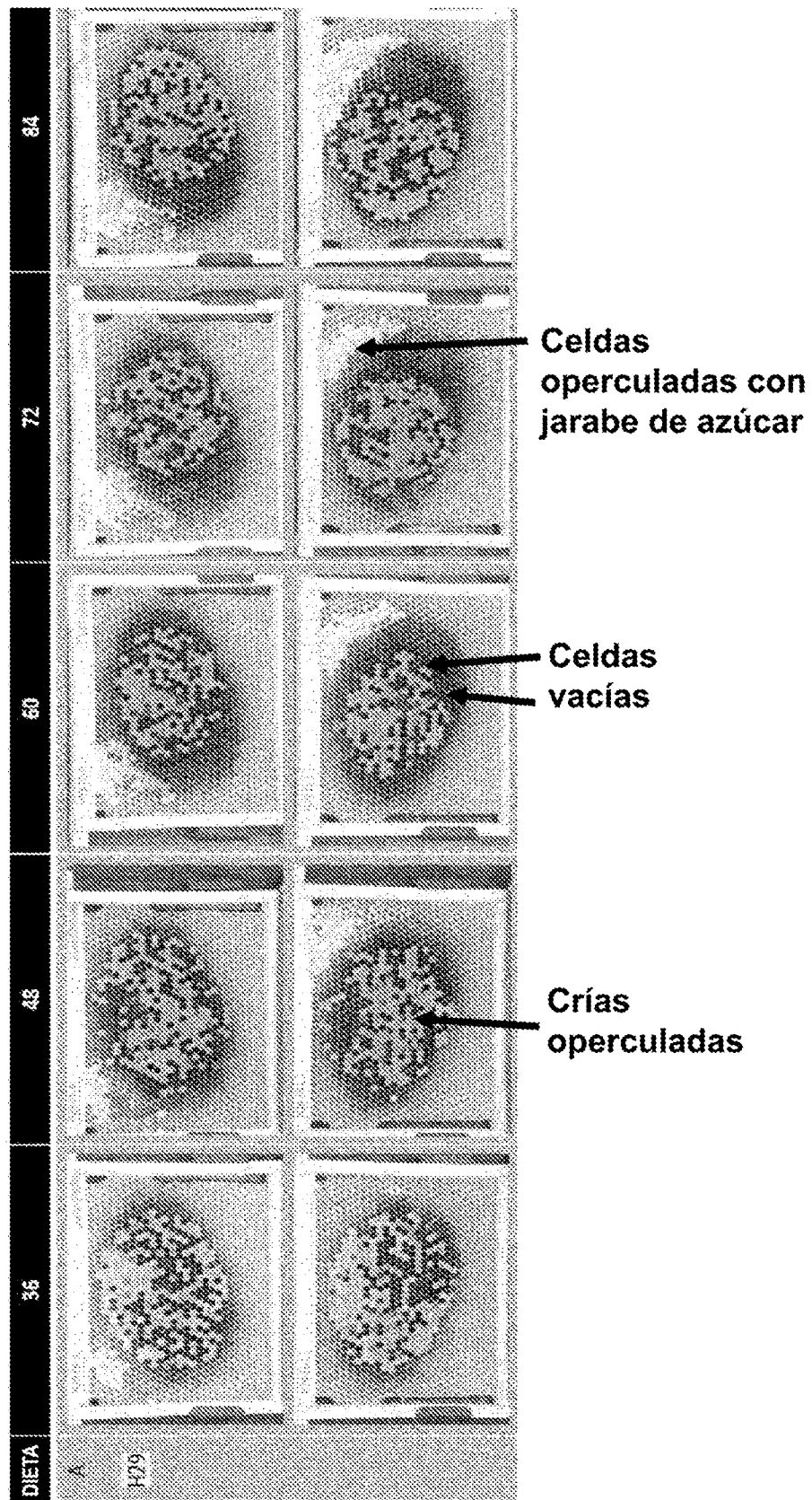
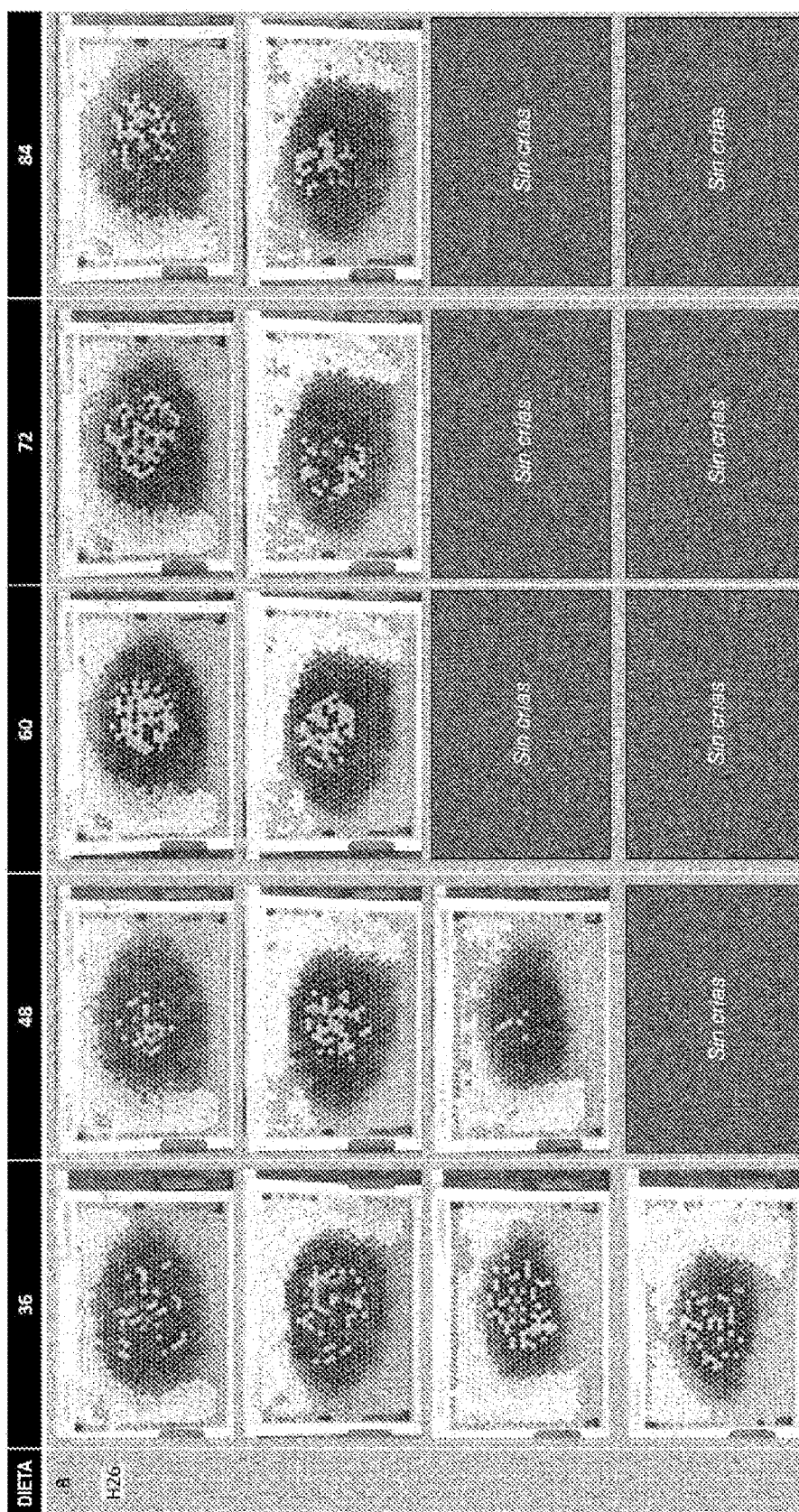
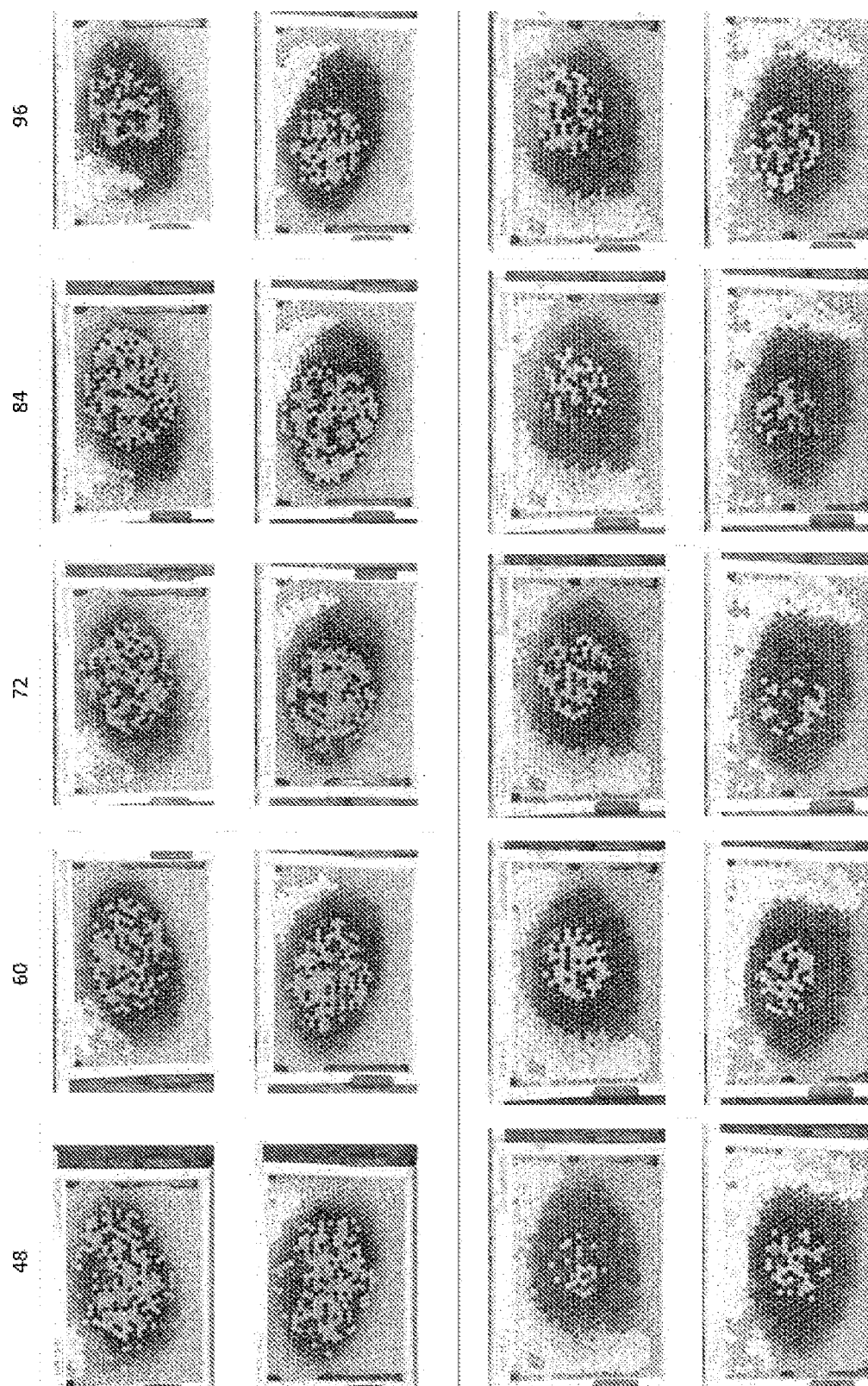


Figura 15

**Figura 16**



Dieta A – Colmena 29

Dieta B – Colmena 26

Figura 17

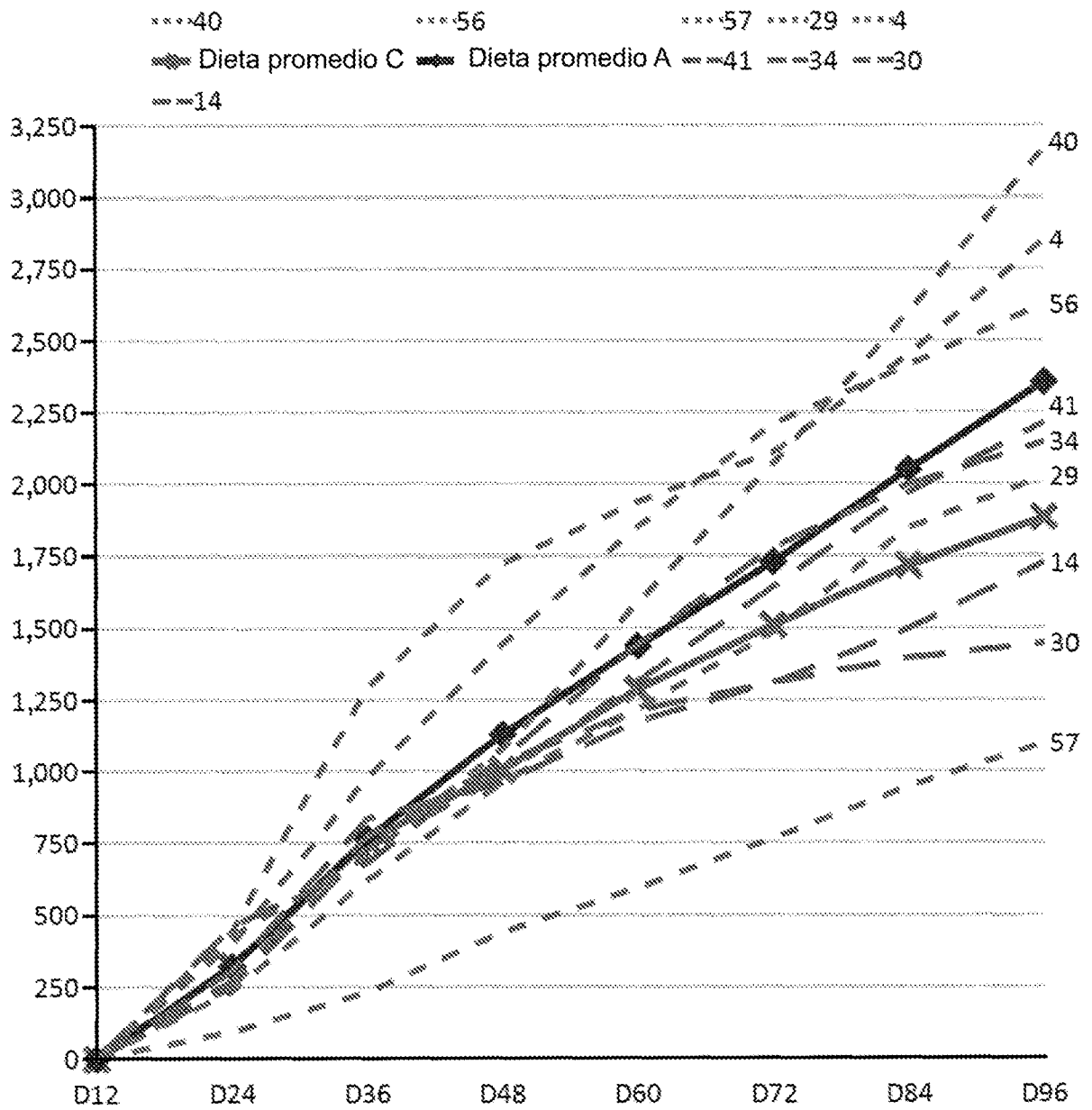


Figura 18

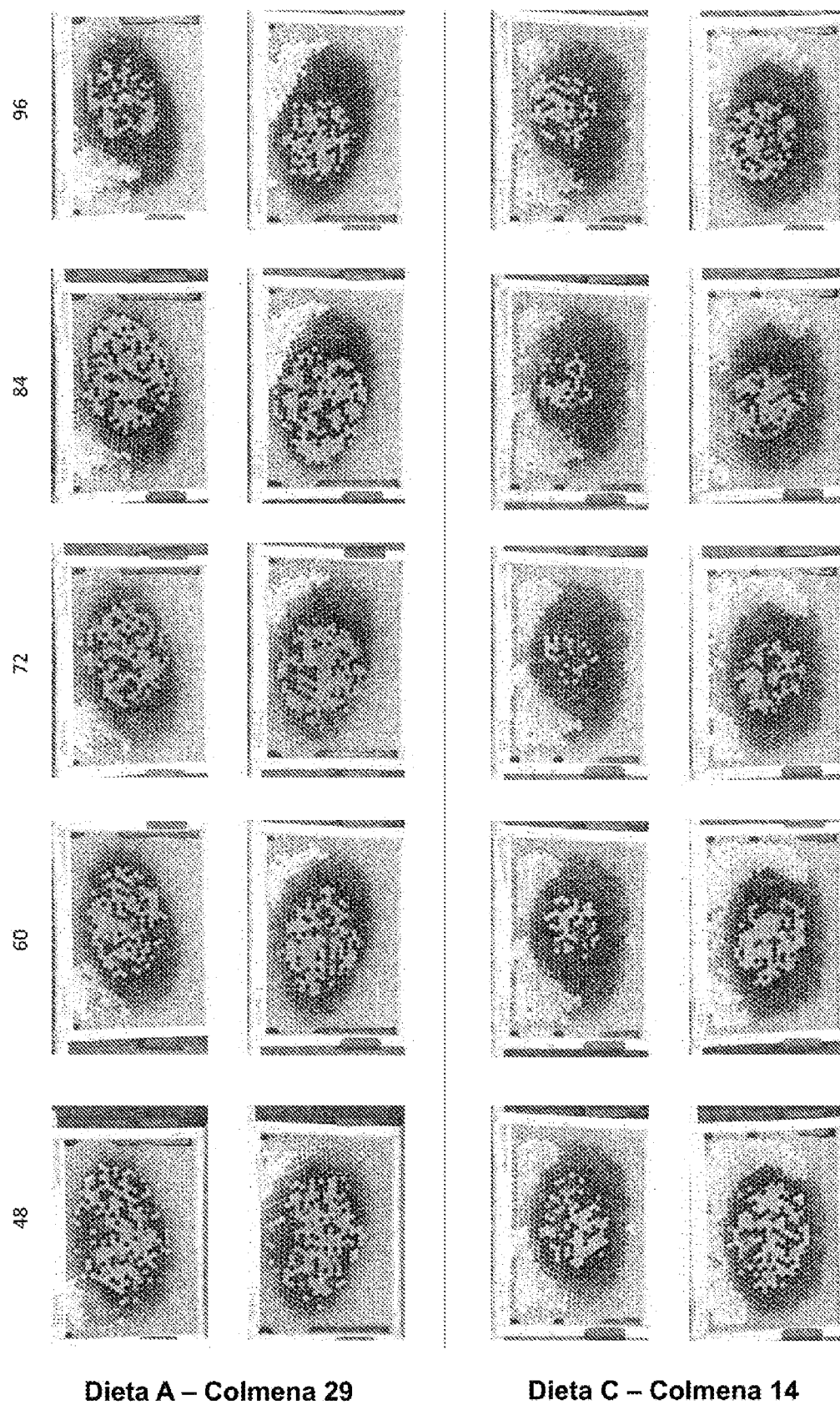


Figura 19

