



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y ANALÍTICA

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA MULTIFACTORIAL DE
MIEL EN RELACIÓN A LA INFECCIÓN POR *NOSEMA*
CERANAE EN ABEJAS, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y
ORIGEN GEOGRÁFICO DEL PRODUCTO

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

OSCAR HUGO SANHUEZA ROJAS

DIRECTOR Y PATROCINANTE DE TESIS

DR. EDWAR FUENTES PÉREZ

Santiago, Chile

2016

“...que la ciencia nos diga lo que debemos olvidar y lo que debemos creer”.

Pierre Joseph Proudhon

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer el apoyo procedente de mi familia, especialmente de parte de mi madre, la cual ha tenido una paciencia impresionante.

Agradezco a mis amigos, los que sin importar lo que sucediera estuvieron hasta el final y no abandonaron ni cuando la situación se tornaba más difícil, gracias por estar ahí para oírme siempre.

Muchas gracias a todas las personas con las que tuve la suerte de compartir durante mi estadía en el laboratorio, gracias por su compañía, animo, sus buenos deseos y buena disposición para responder mis dudas y ayudarme cada vez que lo necesite. En especial doy las gracias a mi profesor guía por su preocupación, consejos y apoyo, lo que ha sido clave para lograr desenvolverme mejor durante este ciclo.

Finalmente, gracias a la Universidad de Chile por ser un segundo hogar durante este largo periodo y permitirme un gran crecimiento personal y profesional, y agradecer el financiamiento otorgado por Fondecyt para el desarrollo del presente trabajo (Proyecto 1140328).

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Miel.....	7
2.2 Herramientas quimiométricas.....	12
2.2.1 Análisis por componentes principales PCA.....	12
2.2.2 Mínimos cuadrados parciales PLS.....	14
2.2.2 Resolución multivariada de curvas con mínimo cuadrados alternantes MCR-ALS.....	16
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivos generales.....	19
4.2 Objetivos específicos.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Materiales.....	21
5.1.1 Reactivos.....	21
5.1.2 Materiales.....	22
5.1.3 Equipos.....	22
5.1.4 Software.....	23
5.1.5 Muestras.....	24

5.2 Métodos.....	27
5.2.1 Determinación de prolina libre en miel.....	27
5.2.2 Determinación de acumulación de peróxido de hidrógeno en miel como reflejo de la actividad de la GOX.....	28
5.2.3 Obtención y análisis de matrices de excitación-emisión de mieles.....	29
5.2.4 Obtención de la fracción de mieles entre 3 y 10 KDa.	30
5.2.5 Detección de péptidos antimicrobianos en la fracción 3-10 KDa.....	31
5.2.5.1 Obtención y análisis de matrices de excitación- emisión en fracciones 3-10 KDa.....	31
5.2.5.2 Detección y cuantificación de puentes disulfuro en fracciones 3-10 KDa.....	31
5.2.6 Detección de <i>Nosema ceranae</i> en abejas.....	33
5.2.7 Actividad antimicrobiana en miel.....	33
5.2.8 Análisis de componentes principales.....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1 Determinación de prolina en miel.....	34
6.2 Acumulación de peróxido de hidrógeno en miel.....	41
6.3 Análisis de matrices de excitación-emisión de mieles por MCR- ALS.....	46
6.3.1 Mieles de la VI Región.....	46

6.3.2 Mieles de la X Región y miel del LBFM-UDD.....	50
6.4 Detección de péptidos antimicrobianos en la fracción de miel de 3-10 KDa.....	53
6.5 Actividad Antimicrobiana en miel.....	62
6.6 Análisis de componentes principales.....	64
6.6.1 PCA sobre parámetros registrados para las mieles de la VI Región.....	64
6.6.2 PCA sobre parámetros registrados para la miel de la X Región.....	69
7. CONCLUSIONES.....	72
8. BIBLIOGRAFÍA.....	74

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Gráfico del número de colmenas de abejas melíferas manejadas (en millones) en estados unidos entre 1945 y 2008 reportado por el servicio nacional de estadísticas agrícolas USDA. No hay registros del número de colmenas entre 1982 y 1985 (Pettis y Delaplane, 2010).....	2
Figura 2. Principios de PCA, descomposición de la matriz de información..	12
Figura 3. Principios de PLS-1, representación de los modelos obtenidos...	15
Figura 4. Mapa de la VI Región, donde se observan los sectores donde fueron realizados los muestreos. Chimbarongo, Codegua, Peumo y Rengo.....	24
Figura 5. Esquema de ultrafiltración para la obtención de la fracción entre 3 y 10 KDa de miel.....	30
Figura 6. Esquema de reacción entre ninhidrina y prolina.....	34
Figura 7. Espectros de absorbancia (a) y curva de calibración (b) obtenidos a partir de las muestras de calibrado para la determinación de prolina en miel.....	35
Figura 8. Espectros de absorción de las muestras de miel obtenidos para la determinación de prolina.....	37
Figura 9. Esquema de reacción de oxidación de la glucosa catalizada por la enzima glucosa oxidasa.....	41
Figura 10. Esquema de reacción entre o-dianisidina y peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima peroxidasa.....	42

Figura 11. Curva de calibrado obtenida para la acumulación de peróxido de hidrógeno en miel.....	42
Figura 12. Espectros de excitación (a) y de emisión (b) de los cuatro componentes extraídos por MCR-ALS para las muestras de la VI Región. Aminoácidos fluorescentes (azul), riboflavina (verde), compuestos fenólicos (rojo) y productos de la reacción de Maillard (cian).....	47
Figura 13. Espectros de excitación de los cuatro componentes extraídos mediante MCR para las muestras de miel de la VI Región.....	48
Figura 14. Espectros de excitación (a) y de emisión (b) de los cuatro componentes extraídos por MCR-ALS para las mieles de la X Región y la miel del Laboratorio de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo. Productos de Maillard (azul), Aminoácidos aromáticos (verde), compuestos fenólicos (rojo) y riboflavina (cian).....	51
Figura 15. Espectros de excitación de los cuatro componentes extraídos mediante MCR para las muestras de miel de la X Región y la miel LBFM-UDD.....	52
Figura 16. Secuencia de aminoácidos de los péptidos antimicrobianos defensina-1 y royalisina-F, donde C es cisteína, W es triptófano e Y es tirosina.....	53
Figura 17. Matrices de excitación/emisión de las fracciones 3-10 KDa de las mieles de la X Región y la muestra del Laboratorio de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo, obtenidas por fluorescencia total.....	55
Figura 18. Matrices de excitación/emisión para patrones de tirosina (a) y triptófano (b), obtenidos por fluorescencia total.....	55
Figura 19. Esquema para la reacción de reducción de puentes disulfuro, y formación de cromóforo por la reacción entre los tioles y 4-DTDP.....	56

Figura 20. Gráfico de los espectros de absorbancia obtenidos a partir de las muestras de calibrado (a) y curva de calibración construida (b) para la determinación de péptidos antimicrobianos por medio de sus puentes disulfuro.....	57
Figura 21. Región espectral utilizada para la determinación de péptidos antimicrobianos de la fracción de miel entre los 3 y 10 KDa (a) y región espectral observada entre 200 y 450 nm (b).....	59
Figura 22. Espectros de absorbancia obtenidos para las tres muestras de insulina analizadas en triplicado.....	60
Figura 23. Gráfico de coeficientes para PCA realizado sobre los parámetros obtenidos para las muestras de miel de la VI Región. RF: riboflavina, Pro: prolina, Fur+HMF: furosina + hidroximetilfurfural, CF: compuestos fenólicos, Aa: aminoácidos aromáticos (tripófano), Per de H: acumulación H ₂ O ₂	65
Figura 24. Gráfico de puntuaciones y coeficientes para PCA realizados sobre parámetros obtenidos para las muestras de miel de la VI Región. RF: riboflavina, Pro: prolina, Fur+HMF: furosina + hidroximetilfurfural, CF: compuestos fenólicos, Aa: aminoácidos aromáticos (tripófano), Per de H: acumulación H ₂ O ₂	68
Figura 25. Gráfico de coeficientes para PCA realizado sobre los parámetros obtenidos para las muestras de miel de la X Región. RF: riboflavina, Pro: prolina, Fur+HMF: furosina + hidroximetilfurfural, CF: compuestos fenólicos, Aa: aminoácidos aromáticos (tripófano), Ac H ₂ O ₂ : acumulación H ₂ O ₂ , Def-1: Defensina-1, AAM: Actividad antimicrobiana.....	69
Figura 26. Gráfico de puntuaciones y coeficientes para PCA realizados sobre parámetros obtenidos para las muestras de miel de la X Región y la miel del Laboratorio de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la miel (%).....	9
Tabla 2. Valor promedio de la actividad de enzimas presentes en la miel..	10
Tabla 3. Parámetros que deben cumplir las mieles para asegurar su calidad, de acuerdo a las normas del <i>Codex Alimentarius</i> y del Concilio relativo a la miel de la Unión Europea.....	11
Tabla 4. Detalles de las muestras de miel recolectadas en la VI Región.....	25
Tabla 5. Detalles de las muestras provenientes de la X Región y la muestra del LBFM-UDD (XR5).....	26
Tabla 6. Parámetros de calidad de los calibrados de orden cero y uno obtenidos para la determinación de prolina en miel.....	36
Tabla 7. Concentración de prolina (mg/kg) en las muestras de miel predichas con los calibrados de orden cero y uno y presencia de nosemosis en las colmenas respectivas.....	38
Tabla 8. Valores promedio de prolina en mg/Kg, organizados de acuerdo al origen geográfico y floral de las mieles de la VI Región.....	39
Tabla 9. Parámetros de calidad del calibrado para la determinación de peróxido de hidrógeno.....	43
Tabla 10. Acumulación de peróxido de hidrógeno en las muestras de miel ($\mu\text{g/g} \times \text{hora}$) y presencia de nosemosis en las colmenas respectivas.....	44
Tabla 11. Concentración relativa de los componentes extraídos para las mieles de la VI Región.....	49

Tabla 12. Concentración relativa de los componentes extraídos para las mieles de la X Región y la miel LBFM- UDD.....	52
Tabla 13. Parámetros de Calibrado de orden cero y uno obtenidos para la determinación de péptidos antimicrobianos por medio de sus puentes disulfuro.....	58
Tabla 14. Concentración de tioles expresados en mg de cisteína/L, determinados en las muestras de insulina comercial predichos con los calibrados de orden cero y uno (valor nominal 34,8 mg de cisteína/L).....	60
Tabla 15. Valores de concentración de péptidos antimicrobianos en la fracción 3-10 KDa de mieles de la X Región y LBFM-UDD, predichos con los calibrados de orden cero y uno.....	61
Tabla 16. Actividad antimicrobiana de mieles de la X Región. Se presentan la media de los halos de inhibición en mm *	62

ABREVIATURAS

(SA)⁻¹: Inverso de la sensibilidad analítica.

4-DTDP: 4,4'-ditiodipiridina.

Ac H₂O₂: Acumulación de peróxido.

C: Cisteína.

CF: Compuestos fenólicos.

Fur+HMF: Furosina+hidroximetilfurfural.

GOX: Glucosa oxidasa.

LBFM-UDD: Laboratorio de biomedicina de la facultad de medicina, Universidad del Desarrollo.

LOD: Límite de detección.

LOQ: Límite de cuantificación.

MCR-ALS: Resolución multivariada de curvas con mínimos cuadrados alternantes.

PCA: Análisis de componentes principales.

PCR: Reacción en cadena de polimerasa.

PLS: Mínimos cuadrados parciales.

Pro: Prolina.

R²: Coeficiente de determinación.

REC: error relativo del calibrado.

RF: Riboflavina.

RM: Región metropolitana.

Ro-F: Royalisina-F.

UE: Unión Europea.

UV-vis: Ultravioleta-visible.

W: Triptófano.

Y: Tirósina.

λ máx: Longitud de onda máxima.

RESUMEN

Hoy en día existe una creciente preocupación mundial por la disminución sostenida de las abejas melíferas (*Apis Mellifera*). La desaparición inexplicable de estas en un corto plazo de tiempo se ha denominado “Síndrome de Colapso de Colmena”, entre cuyas causas estaría el parásito microsporideo *Nosema ceranae* al producir un estado de inmunidad deprimida a nivel individual y social (colmena). La inmunidad social se asocia a sustancias que las abejas generan en sus glándulas hipofaríngeas y que depositan en los productos destinados a la alimentación de la colmena como la jalea real y la miel. Entre estos compuestos están el péptido antimicrobiano defensina-1 y la enzima glucosa oxidasa (GOX) y cuya producción se ve alterada por la infección con *Nosema* spp. Por tanto, la miel es una solución saturada de azúcar que contiene además una mezcla compleja de proteínas, aminoácidos, compuestos fenólicos, etc.; provenientes tanto del néctar de flores ubicadas en el entorno geográfico de las colmenas, como del metabolismo de las abejas, siendo así un reflejo de este.

Consecuentemente, esta memoria plantea que el análisis multifactorial de algunos parámetros físico-químicos relevantes de la miel permitirá establecer relaciones con la presencia de *N. ceranae* en las abejas que la produjeron, con su actividad antimicrobiana y/o con su origen geográfico. El objetivo central del trabajo fue caracterizar mieles de diferentes regiones del país mediante sus contenidos de prolina, actividad de GOX, defensina-1 y compuestos fluorescentes y establecer las citadas relaciones.

Se implementaron y aplicaron de manera satisfactoria métodos para la determinación de prolina, acumulación de H₂O₂ (evidencia de la actividad de GOX) y presencia de defensina-1 en mieles de la VI y X regiones del país; basados en espectroscopía UV-visible y calibración de orden cero y primer orden. Para estos últimos se obtuvieron límites de cuantificación diez veces menores que para los de orden cero.

Los contenidos de prolina en las mieles (224 a 694 mg/kg) fueron mayores al mínimo indicado por las normas para considerarla como genuina, auténtica y madura (180 mg/kg). La acumulación de H₂O₂ fluctuó desde no detectada y 381 µg por cada 100 g de miel por hora. La determinación del contenido de péptidos antimicrobianos se realizó sólo en las muestras de la X Región, ya que en estas se determinó además su actividad antimicrobiana; obteniendo valores entre 16,6 y 25,9 mg/kg. Por otra parte, los perfiles de fluorescencia total de las mieles analizados mediante resolución multivariada de curvas (MCR), presentaron cuatro componentes asignados a aminoácidos aromáticos (principalmente triptófano), riboflavina, compuestos fenólicos y productos de las reacciones de Maillard.

El análisis de componentes principales (PCA) de los parámetros obtenidos para mieles de la VI Región (prolina, áreas relativas de los cuatro componentes fluorescentes, acumulación de H₂O₂ y presencia de *N. ceranae* en las abejas) mostró una relación directa entre la presencia de la infección y la acumulación de H₂O₂, lo cual indica que la infección incrementaría la producción y/o actividad de GOX. La variabilidad observada para los demás parámetros se debe principalmente al tipo de alimentación y al entorno en el que se desenvuelve la abeja, por lo que permitieron una clasificación inicial de las mieles por su origen geográfico. Por su parte, el PCA de los parámetros obtenidos para las mieles de la X Región (los antes indicados más concentración de defensina-1 y actividad antimicrobiana) mostró una relación directa entre la actividad antimicrobiana, la cantidad de defensina-1 y la acumulación de H₂O₂ en la miel; lo que indica que ambos factores contribuyen de manera significativa y complementaria a su actividad antimicrobiana, donde el primero tiene acción sobre bacterias Gram positiva con efectividad variable, mientras que el H₂O₂ es de “amplio espectro” sobre otras bacterias.

ABSTRACT

Today there is a growing global concern about the steady decline of honeybees (*Apis Mellifera*). The unexplained disappearance of these in a short period of time has been called “Colony Collapse Disorder”, among whose causes would be the microsporidea parasite *N. ceranae* to produce a state of immunity depressed at individual and social level (hive). Social immunity is associated with substances that bees produce in their hypopharyngeal glands and placed in products intended for feeding of the hive as royal jelly and honey. Between these compounds are the antimicrobial peptide defensin-1 and the enzyme glucose oxidase (GOX) and whose output is altered by infection with *Nosema* spp. Therefore, honey is a saturated sugar solution also contains a complex mixture of proteins, amino acids, phenolic compounds, etc.; both from the nectar of flowers located in the geographical environment of the hive, like bees metabolism, thus being a reflection of this.

Consequently, this report proposes that the multifactorial analysis of some relevant physico-chemical parameters of honey will establish relations with the presence of *N. ceranae* on bee that produced it, with its antimicrobial activity and/or geographical origin. The main objective of the study was to characterize honeys from different regions of the country through its contents proline, GOX activity, defensin-1 and fluorescent compounds and establish these relationships.

They were implemented and applied satisfactorily methods for determining proline, accumulation of H_2O_2 (evidence of GOX activity) and presence of defensin-1 in honeys of VI and X regions; based UV-visible spectroscopy and calibration of zero order and first order. For the latter limits of quantification obtained were ten times lower than for zero order.

Proline content in honey (224 to 694 mg/kg) were higher than the smallest value indicated by the norm to be considered as genuine, authentic and mature (180 mg/kg). H₂O₂ accumulation ranged from undetected to 381 µg per 100 g of honey per hour. The determination of antimicrobial peptides was performed only in samples from the X region, since in these antimicrobial activity it was also determined; obtaining values between 16.6 and 25.9 mg/kg. Moreover, total fluorescence profiles of honeys analyzed by multivariate curve resolution (MCR), presents four components assigned to aromatic amino acids (mainly tryptophan), riboflavin, phenolic compounds and products of the Maillard reactions.

The principal component analysis (PCA) of the parameters obtained for VI region honeys (proline, relative areas of the four fluorescent components, accumulation of H₂O₂ and presence of *N. ceranae* in honeybees) showed a direct relationship between the presence of infection and accumulation of H₂O₂, indicating that infection increase the production and/or activity of GOX. The variability observed for other parameters are mainly due to the type of food and the environment in which the bee unfolds, so they allowed an initial classification of honey by their geographical origin. Meanwhile, the PCA of the parameters obtained for honeys from the X region (the above more defensin-1 concentration and antimicrobial activity) showed a direct relationship between the antimicrobial activity, the amount of defensin-1 and the accumulation of H₂O₂ in honey; It is indicating that both factors contribute significantly and complementary way to their antimicrobial activity, where the first acts on Gram positive bacteria with varying effectiveness, while H₂O₂ is "extended spectrum" on other bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una creciente preocupación por la disminución sostenida de la población de insectos polinizadores ocurrida en los últimos años, entre las cuales se encuentran las abejas melíferas (*Apis mellifera*) que son esenciales para la producción agrícola, polinizando de manera eficiente sus cultivos.

La disminución de polinizadores produce efectos adversos sobre la cantidad y la calidad de la producción de frutas y semillas, provoca un déficit en la biodiversidad de la producción agrícola y un decrecimiento en la cantidad y diversidad de los alimentos. Existen diversos trabajos que dan cuenta de la relación que existe entre cultivos y polinizadores. En un estudio realizado sobre 1330 especies vegetales de origen tropical se determinó que el 70% de estas ven mejorada su producción por acción de los polinizadores (Roubik, 1995). Otro estudio realizado sobre 264 cultivos concluyó que la producción del 84% de éstos es dependiente de los polinizadores (Williams, 1994). En el mismo sentido, se observó que la polinización realizada por insectos incrementa la cantidad y la calidad de frutos y semillas en 39 de los 57 principales cultivos en el mundo, que corresponden al 35% de la producción mundial de cultivos de alimentos (Klein y col., 2007). En otro estudio se observó la disminución en paralelo de especies polinizadoras y los cultivos que éstos polinizaban en Reino Unido y Holanda (Biesmeijer y col., 2006).

Por otra parte, se ha reportado que el número de colonias de abejas melíferas ha disminuido entre un 15 y 30% entre 1985 y 2005 en locaciones en Italia, Austria, Francia, Alemania, Holanda, Suecia y Hungría. Mientras que en Estados Unidos se ha observado que el número de colmenas ha disminuido

desde 6 millones a 2,3 millones desde 1940 a 2008 (Figura 1) (Pettis y Delaplane, 2010).

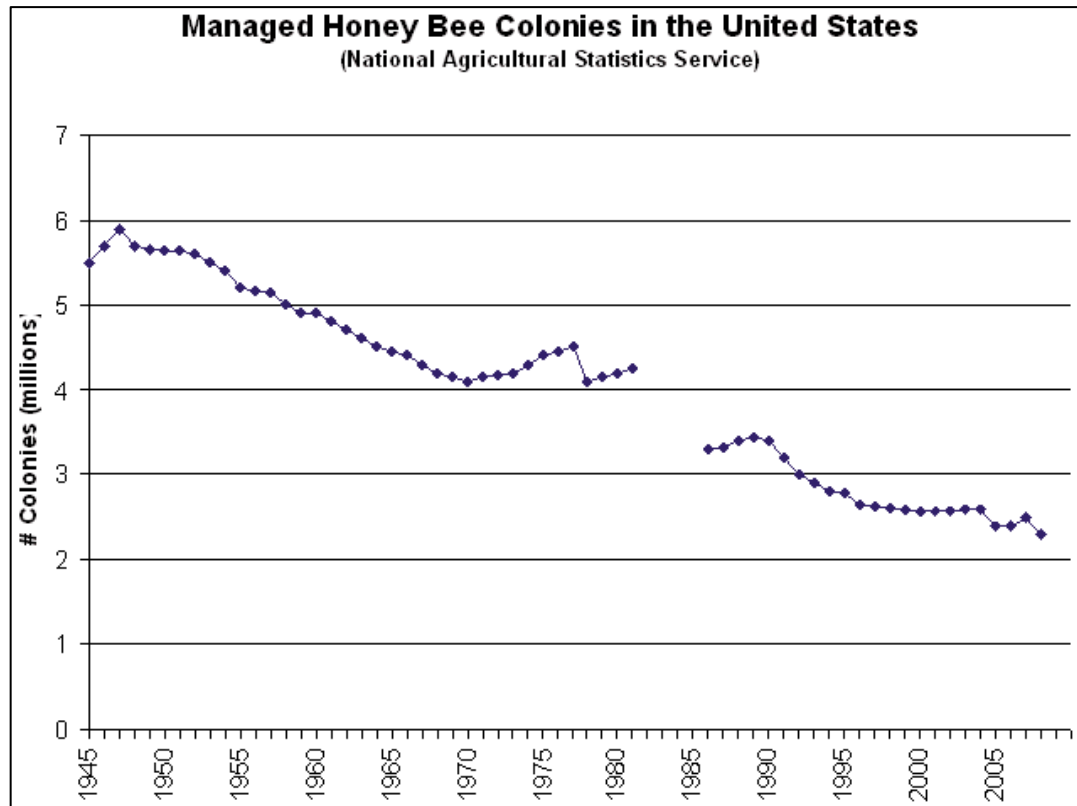


Figura 1. Gráfico del número de colmenas de abejas melíferas manejadas (en millones) en estados unidos entre 1945 y 2008 reportado por el servicio nacional de estadísticas agrícolas USDA. No hay registros del número de colmenas entre 1982 y 1985 (Pettis y Delaplane, 2010).

La desaparición inexplicable en un corto plazo de tiempo de abejas melíferas es un fenómeno conocido como el “Síndrome de Colapso de Colmena”. Éste se caracteriza por la rápida pérdida de abejas adultas (evidenciado por el exceso de la población de crías en relación a la cantidad de abejas adultas), ausencia de abejas obreras muertas dentro y en los alrededores de la colmena, la tardía invasión de plagas a la colmena (escarabajos pequeños y polillas de la

cera) y ausencia de cleptoparasitismo (robo de alimentos) de abejas de colmenas vecinas.

La causa de este fenómeno no ha sido determinada de manera concluyente y es probable que se deba a una combinación de diversos factores de estrés que contribuyen a la pérdida de abejas. Dentro de las causas probables se encuentran el cambio climático (extensos periodos de lluvia o clima húmedo), pérdida de diversidad genética de las abejas melíferas (debido al manejo humano y uso de reinas inseminadas artificialmente), falta de acceso a fuentes de alimentos, parásitos (principalmente el microsporideo *Nosema ceranae*) y uso de insecticidas de última generación (neonicotinoides de estructura química similar a la nicotina, agonistas del receptor de acetilcolina y cuyo principal representante es el imidacloprid). Estas dos últimas revisten gran interés debido a la alta probabilidad de una relación sinérgica negativa sobre la sobrevivencia de las abejas.

El microsporideo *N. ceranae* es un parásito relativamente nuevo en *Apis mellifera*, en comparación al *Nosema apis* que ha estado presente en esta desde mucho antes. En estudios comparativos de infección causada por *N. ceranae* y *N. apis*, se ha observado que en abejas infectadas con el primero de éstos el estrés energético es mayor (reflejado en el aumento de la demanda alimenticia medido como consumo de jarabe de azúcar) al igual que la tasa de mortalidad (Alaux y col., 2010b; Higes y col., 2011). Esto indica que la infección por el parásito *N. ceranae* es más virulenta que por *N. apis*. Estudios demuestran que la infección por *N. ceranae* en *Apis mellifera* disminuye significativamente la presencia de péptidos antimicrobianos, tales como abaecina e hymenoptaecina, mientras que la infección por *N. apis* disminuye la expresión del péptido antimicrobiano defensina-1, los que son sintetizados en la abeja en respuesta a una infección por bacterias, hongos o parásitos (Higes y col., 2009). También se observó la disminución significativa en la actividad de la enzima glucosa oxidasa

(GOX), que es un marcador de la activación de la respuesta inmunocelular y cuya actividad en la miel, donde es depositada por las abejas, ayuda a mantener una inmunidad social dentro de la colmena (Alaux y col., 2010a). Estos resultados demuestran que la infección con *N. ceranae* suprime parcialmente los mecanismos de defensa celular y humoral de las abejas.

Por otra parte, se ha estudiado la posible relación sinérgica entre la infección con el parásito *N. ceranae* y la exposición de las abejas a pesticidas neonicotinoides. Se ha observado que en abejas infectadas con el parásito y expuestas a niveles bajo la dosis letal de imidacloprid, hay una mayor producción de esporas de aquel (Pettis y col., 2012) (aunque otros estudios muestran una leve inhibición de la germinación de esporas en presencia del pesticida (Alaux y col., 2010). En este sentido, se ha observado que colonias expuestas a pesticidas neonicotinoides e infectadas con *N. ceranae* presentan una mayor proporción de abejas infectadas que las colonias no expuestas a estos pesticidas (Sheppard y col., 2012). Además, la concentración de proteínas en la cabeza de las abejas infectadas y la actividad de la GOX decrecen significativamente (Alaux y col., 2010). En otro estudio, se observó que la cantidad de carbohidratos y aminoácidos presentes en la hemolinfa de abejas infectadas con *N. ceranae* se ven alterados, particularmente los contenidos de prolina y serina (Jabali y col., 2012).

La miel es producida por las abejas utilizando como materia prima el néctar de las flores que colectan y almacenan. Varios de los compuestos presentes en el néctar presentan fluorescencia, por lo que ha sido posible caracterizar la procedencia de la fuente alimenticia de las abejas por medio del análisis de fluorescencia de la miel (Lenhardt y col., 2015). Además del néctar como materia prima, la miel es enriquecida con algunos compuestos que las mismas abejas producen en las glándulas hipofaríngeas ubicadas en su cabeza y que ayudan a

la inmunidad de la colmena, entre estas la GOX y el péptido antimicrobiano defensina-1 (Kwakman y col., 2010; Kwakman y Zaat, 2012).

En cuanto al péptido antimicrobiano defensina, en la abeja melífera se han descrito dos tipos denominados defensina-1 y defensina-2, que poseen una masa molecular de 5,5 y 4,8 kDa, respectivamente (Ilyasov et al., 2012). La defensina 1 posee 3 isoformas: la primera corresponde a la isoforma que se encuentra en la hemolinfa de la abeja; las otras dos se denominan royalsina. Una de estas, identificada como Ro-F (5525,1 kDa), se encuentra en la jalea real (Fujiwara y col., 1990). Posee 51 residuos de aminoácidos, entre los que se cuentan triptófano, tirosina y seis cisteínas que forman tres puentes disulfuro dentro de su estructura, lo que hace al péptido muy compacto y particularmente estable a la temperatura y cambios de pH (Ilyasov y col., 2013). Se ha descrito que posee una actividad antimicrobiana principalmente contra bacterias Gram positivas. La defensina-1 también ha sido encontrada en miel (sin indicar su isoforma) y contribuye a las propiedades antibacterianas del producto (Kwakman y col., 2010; Kwakman y Zaat, 2012). La defensina-1 sólo se expresa en las glándulas torácica, mandibular e hipofaríngea de las abejas, desde donde es vertida a la jalea real y la miel, lo que demuestra una expresión tejido-específica (Klaudiny y col., 2005).

De acuerdo a lo anterior, la miel es esencialmente una solución acuosa concentrada de azúcar que también contiene una mezcla compleja de enzimas, péptidos antimicrobianos, aminoácidos (siendo el más abundante la prolina, 50 a 80% del total), varios compuestos fluorescentes, compuestos volátiles, pigmentos y polen. Esto significa que la composición de la miel es un reflejo del estado metabólico de las abejas. Como se ha comentado anteriormente este estado se modifica significativamente por la infección con *N. ceranae*, particularmente una disminución de la actividad GOX y los cambios en el perfil de aminoácidos. Así, la actividad de GOX, el nivel de prolina y la presencia de

defensina-1 podrían ser considerados como marcadores químicos de la infección por *N. ceranae* en las abejas y podrían detectarse en la miel como receptor final. Además estos parámetros, en adición a los compuestos fluorescentes presentes, permitirían caracterizar y clasificar las mieles y ser relacionados con su actividad antimicrobiana.

Extraer la información relevante desde muestras complejas como lo es la miel y posteriormente establecer las relaciones entre los diferentes parámetros, puede ser abordada de mejor forma mediante el uso de herramientas quimiométricas. Entre estas se cuentan los mínimos cuadrados parciales (PLS) el análisis de componentes principales (PCA) y la resolución multivariada de curvas (MCR).

El objetivo de esta memoria es caracterizar mieles de diferentes regiones del país mediante la determinación de parámetros físico-químicos relevantes (prolina, actividad de GOX, perfil de fluorescencia, péptidos antimicrobianos del tipo defensina) y establecer relaciones con la presencia de *N. ceranae* en las abejas que la produjeron, con su actividad antimicrobiana y/o con su origen geográfico.

Consecuentemente, la determinación de los citados marcadores en la miel constituiría una herramienta analítica que ayude a la detección de la nosemosis en las abejas, apoyar estudios sobre la infección por este parásito y el gran daño que produce en abejas y eventualmente clasificar las mieles según su origen geográfico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Miel

La miel está definida por el *Codex Alimentarius* como la sustancia dulce natural producida por abejas melíferas a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje. Para la UE la definición es básicamente la misma, solo que está restringida a la producción de la *Apis mellifera*.

Existen distintas variedades de mieles que pueden caracterizarse según su origen en: miel de flores o miel de néctar que es la miel que procede del néctar de las plantas; miel de mielada que corresponde a la miel que procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (Hemíptera) presentes en las partes vivas de las plantas o de secreciones de las partes vivas de las plantas.

Otra clasificación según la elaboración o presentación de la miel:

* Miel en panal: que es la depositada por las abejas en los alvéolos operculados de panales recientemente contruidos por ellas, o en finas hojas de cera en forma de panal realizadas únicamente con cera de abeja, sin larvas y vendida en panales, enteros o no.

* Miel con trozos de panal o panal cortado en miel: que corresponde a la que contiene uno o más trozos de panal.

* Miel escurrida: obtenida mediante el escurrido de los panales desoperculados, sin larvas.

* Miel centrifugada: obtenida por la centrifugación de los panales desoperculados.

* Miel prensada: obtenida mediante la compresión de los panales, sin larvas, con o sin aplicación de calor moderado, de hasta un máximo de 45 °C.

* Miel filtrada: que se obtiene eliminando materia orgánica o inorgánica ajena a la miel de manera tal que se genere una importante eliminación de polen.

Por otra parte, se encuentra la miel para uso industrial, que es la miel apropiada para este uso o para su utilización como ingrediente de otros productos alimenticios que se elaboran ulteriormente, y que puede presentar un sabor o un olor extraño, o haber comenzado a fermentar o haber fermentado y haberse sobre calentado.

La miel está compuesta esencialmente de diferentes azúcares, sobre todo de fructosa y glucosa, así como de otras sustancias, como ácidos orgánicos (principalmente ácido glucónico), proteínas (enzimas), aminoácidos libres (esencialmente prolina, que representa un 50-85% del total) y partículas sólidas derivadas de su recolección. El pH de la miel en promedio es de 3,9 y se encuentra en un rango de 3,4 a 6,1. El color de la miel puede tener desde un tono casi incoloro a un tono pardo oscuro. Puede tener una consistencia fluida, espesa o cristalizada (en parte o en su totalidad). El sabor y el aroma pueden variar, pero se derivan del origen vegetal (*Codex Alimentarius*).

En la tabla 1 se muestran los principales constituyentes presentes en la miel, los datos corresponden a mieles provenientes de Estados Unidos; sin embargo, estas representan la composición básica de mieles en cualquier país.

Tabla 1. Composición de la miel (%).

Constituyentes	Valor promedio	Rango de variación
Humedad	17,2	13,4-22,9
Fructosa	38,2	27,3-44,3
Glucosa	31,3	22,0-40,8
Sacarosa	2,4	1,7-3,0
Maltosa	7,3	2,7-16,0
Azúcares superiores	1,5	0,1-8,5
Otras azúcares	3,1	0-13,2
Nitrógeno	0,06	0,05-0,08
Minerales (cenizas)	0,22	0,20-0,24
Ácidos libres*	22	6,8-47,2
Lactonas*	7,1	0-18,8
Ácidos totales*	29,1	8,7-59,5

*medido en meq/Kg

Las enzimas que se encuentran en la miel y su actividad se presentan en la tabla 2. La actividad de estas enzimas en conjunto con la cantidad de hidroximetilfurfural (HMF), producto de la deshidratación de algunas azúcares por calentamiento de la miel, son de gran significancia para asegurar si las mieles fueron o no sometidas a tratamientos con calor (Belitz y col., 2009); ya que las primeras tienden a disminuir su actividad con este, mientras que el HMF se incrementa.

Tabla 2. Valor promedio de la actividad de enzimas presentes en la miel.

Número	Enzima	Actividad*
1	α -glucosidasa	7,5-10
2	diastasa (α - y β -amilasa)	16-24
3	glucosa oxidasa	80,8-210
4	Catalasa	0-86,8
5	fosfatasa ácida	5,07-13,4

*1: g de sacarosa hidrolizados por cada 100 g de miel por hora a 40°C; 2: g de almidón degradado por cada 100 g de miel por hora a 40°C; 3: μ g de H₂O₂ formados por g de miel por hora; 4: actividad catalítica/g de miel; y 5: mg P/100 g de miel liberado en 24 horas.

De acuerdo a las normas del *Codex Alimentarius* y del concilio relativo a la miel de la UE, las características o parámetros que deben cumplir las mieles se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros que deben cumplir las mieles para asegurar su calidad, de acuerdo a las normas del *Codex Alimentarius* y del Concilio relativo a la miel de la Unión Europea.

Contenido de agua	
en general	no más del 20%
miel de breso (<i>Calluna</i>) y miel para uso industrial	no más del 23%
miel de breso (<i>Calluna</i>) para uso industrial	no más del 25%
Contenido de fructosa y glucosa (suma de ambos)	
miel de flores	no menos de 60 g/100 g
miel de mielada, mezclas de miel de mielada con miel de flores	no menos de 45 g/100 g
Contenido de sacarosa	
en general	no más de 5 g/100 g
falsa acasia (<i>Robinia pseudoacacia</i>), alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), Banksia de Menzies (<i>Banksia menziesii</i>), Sulla (<i>Hedysarum</i>), Eucalipto rojo (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>), <i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia milliganii</i> , <i>Citrus</i> spp.	no más de 10 g/100 g
espliego (<i>Lavandula</i> spp.), borraja (<i>Borago officinalis</i>)	no más de 15 g/100 g
Contenido de sólidos insolubles en agua	
en general	no más de 0,1 g/ 100 g
miel prensada	no más de 0,5 g/100 g
Conductividad eléctrica	
miel en general y mezclas de estas	no más de 0,8 mS/cm
miel de mielada, miel de castaño y mezclas de las mismas excepto con las mieles que se enumeran a continuación:	no menos de 0,8 mS/cm
madroño (<i>Arbustus unedo</i>), argaña (<i>Erica</i>), eucalipto, tilo (<i>Tilia</i> spp.), brezo (<i>Calluna vulgaris</i>), (<i>Leptospermum</i>), árbol del té (<i>Melaleuca</i> spp.)	
Ácidos libres	
en general	no más de 50 meq/Kg
miel para uso industrial	no más de 80 meq/Kg
Índice diastático (escalade Schade)	
en general, excepto para mieles de uso industrial	no menos de 8
mieles con un contenido bajo de enzimas naturales (por ejemplo, mieles de cítricos) y un contenido de HMF no superior a 15 mg/Kg	no menos de 3
HMF	
en general, excepto para mieles de uso industrial	no más de 40 mg/Kg
miel de origen declarado procedente de regiones de clima tropical y mezclas de estas mieles	no más de 80 mg/Kg

2.2 Herramientas quimiométricas

2.2.1 Análisis por componentes principales, (PCA)

El PCA se emplea fundamentalmente con fines cualitativos para describir un conjunto de muestras caracterizadas por varios parámetros físico-químicos. Este consiste en la descomposición de una matriz X en dos matrices más pequeñas, una de puntuaciones o scores (T) y otra de coeficientes o *loadings* (P) como se muestra en la ecuación 1 y se representa en la figura 2:

$$X = T.P \quad (1)$$

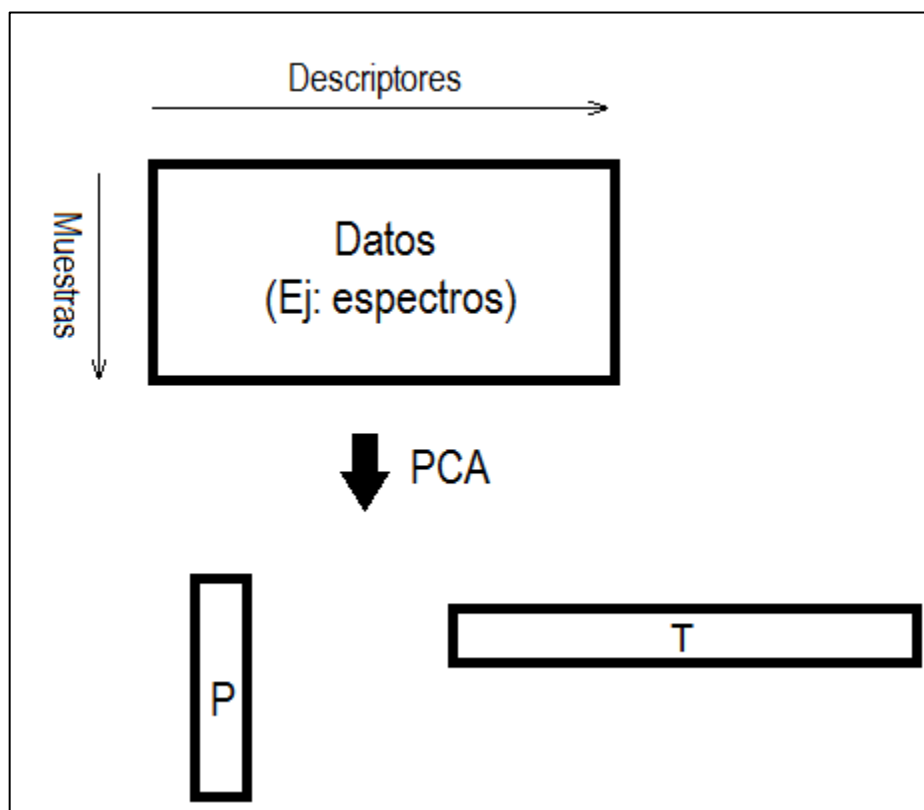


Figura 2. Principios de PCA, descomposición de la matriz de información.

La matriz de puntuaciones tiene las siguientes propiedades:

1. El número de filas es igual al número de filas en la matriz original de datos, usualmente corresponde al número de muestras. Contiene información extraída que permite visualizar las relaciones entre las muestras.
2. El número de columnas es igual al número de factores significativos de los datos, puede ser desde 1 hacia arriba. Se puede extraer como máximo tanto factores como parámetros iniciales describen a cada muestra. Sin embargo, sólo los primeros acumulan una mayor cantidad de información (variabilidad) debido a la “compresión” de la información.
3. La suma de cuadrados de los elemento de cada columna de la matriz de puntuaciones se relaciona con el número llamado *eigenvalue* o auto-valor que corresponde al peso o importancia del componente. Entre mayor sea el *eigenvalue* mayor significancia tiene el componente, el componente principal es determinado en orden de su significancia.

La matriz de coeficientes tiene las siguientes propiedades:

1. El número de columnas es igual al número de columnas en la matriz de datos original, usualmente el número parámetros iniciales que describen a las muestras.
2. El número de filas es igual al número de factores significantes en los datos. Cada fila corresponde a un componente principal.
3. La suma de los cuadrados de los elementos de cada columna es igual a 1.

Los componentes principales pueden ser representados geoméricamente. Una muestra, por ejemplo, puede ser representada en un espacio de j dimensiones, donde cada eje de este nuevo espacio representa a

uno de los parámetros originales que describen a la muestra. El primer componente puede ser definido como el mejor ajuste lineal en este espacio multi-dimensional. Las puntuaciones representan la distancia a lo largo de esta línea y los coeficientes la dirección (ángulo) de la línea recta. Si hay un solo componente en una serie de muestras, todas las muestras se encontrarían aproximadamente sobre la línea recta, por lo tanto, la intensidad de cada parámetro descriptor se relacionaría directamente con la concentración. Es distinto, si hay dos componentes, idealmente dos componentes principales serán calculados y representados en los ejes de un plano. Y así sucesivamente, si hay diez componentes, diez componentes principales serán calculados y representados en un espacio de diez dimensiones. La cantidad de componentes necesarios para describir adecuadamente la matriz X se obtiene mediante validación cruzada (Brereton, 2000).

2.2.2 Mínimos cuadrados parciales, (PLS)

PLS se utiliza para la construcción de modelos de calibrado de primer orden, los que permiten cuantificar un analito en una muestra empleando como información los espectros que ellas generan. Estos modelos de calibrado (conocidos como calibrado de primer orden), permiten aumentar la selectividad y disminuir los límites de detección en comparación con el calibrado clásico de orden cero que emplea un único valor de absorbancia (λ máx). En el método PLS, en lugar de modelar exclusivamente la variable x, se obtienen dos sets de modelos de la forma,

$$X = T.P + E \quad (2)$$

$$c = T.q + f \quad (3)$$

Donde q es análogo a un vector de coeficientes. Estas matrices se muestran en la figura 3.

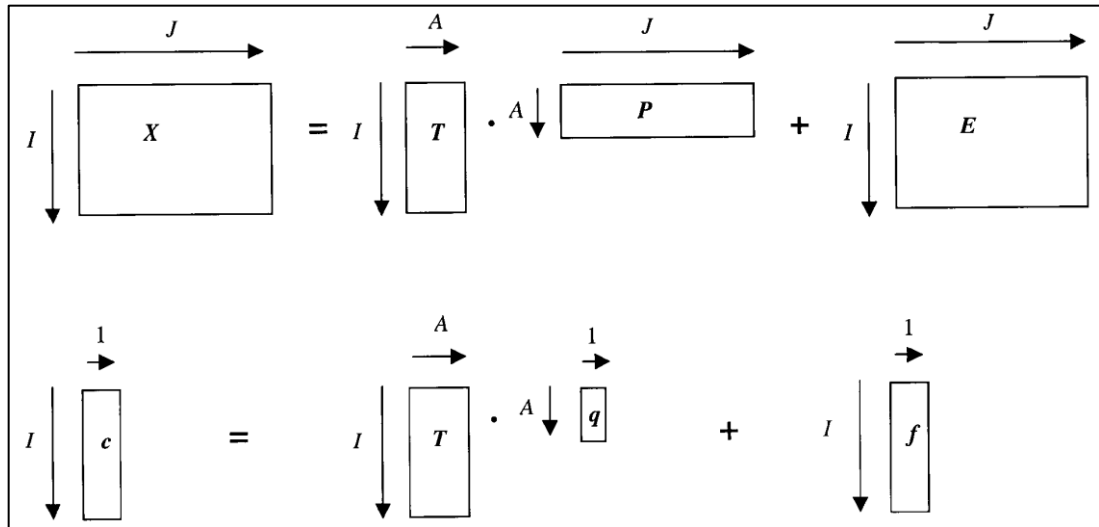


Figura 3. Principios de PLS-1, representación de los modelos obtenidos.

Donde el producto de T y P se aproxima a los datos espectrales y , el producto de T y q se aproxima a las concentraciones reales del analito de interés. Una característica importante de PLS es que es posible obtener una matriz de puntuaciones que es común tanto para concentración (c) como para las mediciones (x). La suma de los cuadrados de las puntuaciones de cada sucesivo componente es a menudo llamado *eigenvalue* o autovalor; aunque el autovalor de PLS no es el mismo que el de PCA y dependerá tanto del bloque x como del bloque c (Brereton, 2000).

2.2.3 Resolución multivariada de curvas con mínimos cuadrados alternantes, (MCR-ALS)

MCR-ALS se puede emplear con fines cualitativos y cuantitativos para describir un conjunto de muestras caracterizadas por espectros de distinta naturaleza o diferentes parámetros físico-químicos. Este descompone matemáticamente la respuesta instrumental para una mezcla en la contribución pura de cada componente involucrado en el sistema estudiado. Los datos para el monitoreo espectroscópico de un proceso químico pueden ser organizado en una matriz D ($r \times c$), las filas r son los espectros registrados a través del proceso y las columnas c son las respuestas instrumentales medidos en cada longitud de onda. La descomposición de la matriz se lleva a cabo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$D = CS^T + E \quad (4)$$

Donde C ($r \times n$) es la matriz que describe como es la contribución de las n especies involucradas en el proceso, las cuales son espectroscópicamente activas, en los cambios en las diferentes r filas de la matriz de datos (perfiles de concentración). S^T ($n \times c$) es la matriz que describe como la respuesta instrumental de estas n especies cambia en las c columnas de la matriz de datos (perfiles de espectros puros). E ($r \times c$) es la matriz residual, la cual contiene la varianza no explicada por el producto CS^T .

La ecuación (4) puede ser resuelta iterativamente por medio de optimización ALS. El procedimiento general de ALS es el siguiente:

1. Determinación del número de componentes en X (determinado usando PCA o conocido de antemano).
2. Generación de estimaciones iniciales (E_j : matriz tipo- C).

3. Calculo de ST bajo restricciones.
4. Calculo de C bajo restricciones.
5. Reproducción de X a partir del producto CST.
6. Volver al paso 3 hasta alcanzar la convergencia.

Por lo tanto, el modelo de MCR-ALS consiste en resolver los siguientes dos problemas de mínimos cuadrados bajo las restricciones adecuadas.

$$\text{Min } \hat{C} \left\| X_{PCA} - \hat{C} \hat{S}^T \right\| \quad (5)$$

$$\text{Min } \hat{S}^T \left\| X_{PCA} - \hat{C} \hat{S}^T \right\| \quad (6)$$

3. HIPÓTESIS

El análisis multifactorial de parámetros físico-químicos relevantes de la miel (prolina, actividad de glucosa oxidasa, perfil de fluorescencia y péptidos antimicrobianos del tipo defensina) permitirá establecer relaciones con la presencia de *Nosema ceranae* en las abejas que la produjeron, con su actividad antimicrobiana y/o con su origen geográfico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

Caracterizar mieles de diferentes regiones del país mediante la determinación de algunos parámetros físico-químicos relevantes y establecer su relación con la presencia de *N. ceranae* en las abejas que la produjeron, con su actividad antimicrobiana y/o con su origen geográfico.

4.2 Objetivos específicos

1. Implementar un método para la determinación de prolina libre en miel basado en su reacción con ninhidrina y espectroscopía UV-visible.
2. Implementar un método para la determinación de la actividad de GOX en miel, mediante un acoplamiento a la reacción catalizada por peroxidasa y espectroscopía UV-visible.
3. Implementar un método para la determinación de péptidos antimicrobianos del tipo defensina en miel, mediante su separación por tamaño y posterior detección de puentes disulfuro.
4. Determinar el perfil de fluorescencia total de las mieles y analizarlo mediante MCR-ALS.
5. Determinar el contenido de prolina, actividad de la GOX y concentración relativa de compuestos fluorescentes en mieles de la VI Región elaboradas por abejas sanas e infectadas por *N. ceranae* y evaluar sus relaciones mediante PCA.

6. Determinar el contenido de prolina, concentración relativa de compuestos fluorescentes, presencia de péptidos antimicrobianos del tipo defensina, actividad de GOX y actividad antimicrobiana en mieles de la X Región y evaluar sus relaciones mediante PCA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos

1. Prolina 99%, Sigma-Aldrich.
2. Ninhidrina, apto para detección de aminoácidos, Sigma-Aldrich.
3. Orto-dianisidina 95%, Sigma-Aldrich.
4. peroxidasa 150 U/mg, Sigma-Aldrich.
5. Cisteína 97%, Sigma-Aldrich.
6. 4-DTDP 98%, Sigma-Aldrich.
7. Mono metil éter etilenglicol 99,5%, Merk.
8. 2-propanol 99,9%, Merk.
9. Peróxido de hidrógeno 30% v/v, Merk.
10. Ácido fórmico 98%, Merk.
11. Ácido acético 99,8%, Merk.
12. Ácido clorhídrico 37% m/v, Merk.
13. Boro hidruro de sodio 96%, Merk.
14. Hidróxido de sodio 99%, Merk.
15. Fosfato mono ácido de sodio 99,5%, Merk.
16. Insulina comercial 100 UI/mL, Actrapid®, NovoRapid® Flexpen®.

5.1.2 Materiales

1. Materiales de vidrio de uso general y volumétrico clase A.
2. Micropipeta de desplazamiento de aire 20-200 μL y 100-1000 μL .
3. Viales de vidrio ámbar, tapa rosca y contratapa de teflón.
4. Tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca.
5. Papel filtro.
6. Tubos Amicom Ultra-15 de 3 y 10 KDa, Merk.

5.1.3 Equipos

1. Balanza analítica modelo 405M-200AS ($\pm 0,001$ g), Precisa.
2. Balanza de precisión modelo 4000C ($\pm 0,00001$ g), Precisa.
3. pHmetro Oakton (Vernon Hills, USA) modelo pH 1100.
4. Microondas Milestone, modelo MLS-1200 MEGA, módulo de escape de gases modelo EM-45/A, monitor de control modelo MEGA-240 y rotor de polipropileno
6. Espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies, modelo Cary 8454, equipado con lámpara de tungsteno y deuterio y detector de arreglo de diodos.
7. Espectrómetro de fluorescencia Varian, modelo Cary-Eclipse equipado con dos monocromadores Czerny-Turner y una lámpara de destello de xenón, conectado a un computador mediante interfase serial IEEE 488 (GPIB).

5.1.4 Software

1. Matlab v7.6.0.324 (R2008a), The MathWorks, Inc., fue utilizado para análisis multivariado por medio de los algoritmos PLS-1 y MCR-ALS.
2. The Unscrambler v9.7, CAMO software AS., fue utilizado para realizar análisis por componentes principales PCA.
3. STATGRAPHICS Centurion XVI v16.1.03, Stat Point Technologies, Inc., fue utilizado para análisis de datos y construcción de curvas de calibrado.
4. OriginPro8 v8.0724 (B724), OriginLab Corporation, fue utilizado para análisis de datos y obtención de gráficos.

5.1.5 Muestras

Por una parte se recolectaron muestras de mieles y abejas en 31 colmenas de 9 apiarios, provenientes de 4 sectores distintos de la VI Región, durante el mes de noviembre de 2015, los lugares donde se realizó el muestreo se observan en la figura 4. Los detalles de las muestras se resumen en la tabla 4. En estas muestras de miel se determinó la cantidad de prolina libre, acumulación de peróxido de hidrógeno y perfil de fluorescencia en miel, mientras que en las correspondientes abejas se estableció la presencia del patógeno *N. ceranae*. Los datos obtenidos se emplearon para establecer relaciones entre los parámetros determinados en la miel y la presencia de la infección por nosemosis y caracterizar las mieles por origen geográfico.



Figura 4. Mapa de la VI Región, donde se observan los sectores donde fueron realizados los muestreos. Chimbarongo, Codegua, Peumo y Rengo.

Tabla 4. Detalles de las muestras de miel recolectadas en la VI Región.

Sector	Lugar	Apiario	Número colmena	Código	Presencia <i>Nosema ceranae</i> *	Tipo de Flor de néctar**	Cultivos agrícolas cercanos
Chimbarongo	La Cantera	Manuel Lorca	2	CLC1	-	polifloral	manzanos y cerezos
			3	CLC2	-		
			4	CLC3	-		
			5	CLC4	-		
			8	CLC5	-		
	La Viña	Manuel Lorca	1	CLV1	-	polifloral	manzanos y cerezos
			6	CLV2	-		
			7	CLV3	+		
Codegua	La Punta	La Falda	1	CPF1	-	polifloral	manzanos, almendros, cerezos, naranjos
			2	CPF2	-		
	La Punta	Don Toño	1	CPT1	+	polifloral	manzanos, almendros, cerezos, naranjos
			2	CPT2	-		
Peumo	Los Quillayes	Canal González	2	PQG2	- (**)	cítrico y peumo	limoneros y naranjos
			1	PQGA	- (**)		
			3	PQGB	- (**)		
			4	PQGC	- (**)		
	Los Quillayes	Pochito	3	PQP3	- (**)	cítrico y peumo	limoneros y naranjos
			1	PQPA	+ (**)		
			2	PQPB	- (**)		
			3	PQPC	+ (**)		
Rengo	Las Nieves	La Cantera	1	RNC1	-	quillay	manzanos
			2	RNC2	-		
			3	RNC3	-		
			4	RNC4	-		
	Las Nieves	El Último	1	RNE1	-	quillay	manzanos
			2	RNE2	-		
			4	RNE4	-		
			1	RNV1	-		
	Las Nieves	El Valle	2	RNV2	-	tebo	manzanos
			3	RNV3	-		
			4	RNV4	-		
			3	RNV3	-		

*Presencia de *N. ceranae* en abejas muestreadas en las correspondientes colmenas, determinada de acuerdo a lo indicado en sección.5.2.6.

**Tipo de néctar según lo indicado por los apicultores, no corroborado por métodos oficiales.

(**) Los productores declararon presencia de nosemosis en sus colmenas en agosto de 2015.

Por otra parte se realizaron mediciones sobre 4 mieles provenientes de la X Región, cuyo origen floral es conocido y se muestra en la tabla 5. En estas muestras se determinó la cantidad de prolina libre, acumulación de peróxido de hidrógeno, perfil de fluorescencia, péptidos antimicrobianos del tipo defensina y la actividad antimicrobiana. Los datos obtenidos se emplearon para establecer relaciones entre los parámetros determinados y la actividad antimicrobiana en estas mieles. Adicionalmente se analizó una quinta muestra la cual fue obtenida de las colmenas pertenecientes al Laboratorio de Biomedicina de la Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo (LBFM-UDD).

Tabla 5. Detalles de las muestras provenientes de la X Región y la muestra del LBFM-UDD (XR5).

Muestra	Origen geográfico	Origen floral
XR1	X Región	Ulmo
XR2	X Región	Tineo
XR3	X Región	Tiaca
XR4	X Región	Alfalfa chilota
XR5	RM	Polifloral

5.2 Métodos

5.2.1 Determinación de prolina libre en miel

La cantidad de prolina en miel se determinó mediante el método desarrollado por Ough (Ough, 1969), basado en la medición espectrofotométrica del complejo coloreado formado por la reacción entre prolina y ninhidrina; al que se le hicieron algunas modificaciones.

Para ello se preparó una solución patrón de prolina de concentración de 1000 mg/L, a partir de la cual se toman las alícuotas correspondientes y se diluyen con agua nanopure, para preparar soluciones estándar de prolina de concentraciones entre 10 y 90 mg/L. Las soluciones obtenidas fueron utilizadas para construir los modelos de calibración. Por otra parte, se prepararon disoluciones de miel de concentración 10% m/v en agua nanopure, todas las disoluciones fueron filtradas.

En un tubo de ensayo con tapa rosca se agregaron 0,5 mL de solución estándar de prolina o solución de miel 10% m/v, a continuación se agregaron 0,25 mL de ácido fórmico y 0,5 de solución de ninhidrina al 3% m/v en mono metil éter etilenglicol. Se taparon los tubos y éstos se llevaron a un horno de microondas donde se calentó la mezcla de reacción durante 10 minutos utilizando 200 W de potencia, luego se enfriaron rápidamente utilizando baño de agua fría. Una vez que la mezcla de reacción se enfrió se agregaron rápidamente 5 mL de una mezcla 2-propanol/agua (1:1), se agitó para homogenizar y se dejó por 35 minutos para permitir el desarrollo del color. Finalmente, se midió por espectrometría UV-Vis, utilizando como blanco una mezcla de reacción análoga que no fue sometida a calentamiento por microondas. Se obtuvieron datos en

una vía (absorbancia a 513 nm), los que se utilizaron para construir un modelo de calibración univariado y para analizar las muestras; y datos en dos vías (espectro de absorbancia entre 420 y 790 nm), los cuales fueron utilizados para construir un modelo de calibración multivariado mediante PLS y para analizar las muestras.

5.2.2 Determinación de la acumulación de peróxido de hidrógeno en miel como reflejo de la actividad de GOX

La determinación del peróxido de hidrógeno acumulado en la miel por la actividad de la GOX, se realizó mediante un método basado en la formación de un cromóforo por la reacción de oxidación de la o-dianisidina catalizada por peroxidasa y su análisis por espectrometría UV-Vis (White y col., 1963; Kwakman y col., 2010).

Para ello se preparó una solución patrón de peróxido de hidrógeno de 435 mg/L de concentración, a partir de esta solución se realizaron diluciones para obtener soluciones estándar de concentraciones entre 2,2 y 17,4 mg/L preparadas en buffer fosfato 0,01 M pH 6,5. Estas muestras se utilizaron para construir la curva de calibrado.

Se prepararon soluciones de miel de concentración 20% m/v en buffer fosfato 0,01 M pH 6,5. Las soluciones obtenidas se filtraron y se recolectaron en viales ámbar, los que fueron almacenados durante 24 horas a temperatura ambiente, permitiendo la formación de peróxido de hidrógeno por acción de la GOX.

En un tubo de ensayo de tapa rosca se agregaron 0,5 mL de la solución estándar de peróxido de hidrógeno o de la solución de miel 20% m/v preparada, a continuación se agregaron 1,5 mL de buffer fosfato 0,01 M pH 6,5; además de

0,5 mL de solución de peroxidasa 0,05 mg/L (preparada a partir de solución stock de 1 mg/L en el mismo buffer) y 0,25 mL de solución de orto-dianisidina 0,4 mg/mL (preparado inicialmente 1 mg/L), ambas soluciones preparadas in situ y en buffer fosfato 0,01 M pH 6,5. La mezcla de reacción se agitó y se dejó reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 444 nm, utilizando como blanco una mezcla análoga reemplazando la solución de orto-dianisidina por buffer fosfato 0,01 M pH 6,5. Se obtuvieron datos en una vía, con los cuales se construyó una curva de calibrado y se analizaron las muestras.

5.2.3 Obtención y análisis de matrices de excitación-emisión de mieles

Se prepararon soluciones de miel al 10 y 20% m/v con agua nanopure, las soluciones fueron filtradas. Luego se obtuvieron los espectros de excitación-emisión para las soluciones de miel por fluorescencia total, utilizando una celda de cuarzo de 3 mL y paso óptico de 1 cm. La longitud de onda de excitación utilizada fue 220 a 450 nm cada 10, y de emisión de 250 a 600 nm cada 2 nm, con un slit de emisión y de excitación de 10 nm. A estos espectros se les eliminó la dispersión del *Raileigh* y *Ramman* primario y secundario mediante una rutina de cálculo usando matlab (espectros corregidos).

Los espectros de excitación-emisión corregidos de las distintas mieles fueron concatenados de forma vertical (incremento del tamaño de las columnas “*column wise*”) y analizados por MCR. Se aplicó inicialización con el espectro más puro (“*pure method*”), dirección espectros de emisión (columnas), considerando un 10% de ruido y ALS con no negatividad en ambos modos. El número de componentes extraídos fue determinado mediante PCA según su importancia en explicar la variabilidad de los datos (“*eigenvalue*”); a partir de ello se obtuvieron modelos para describir la fluorescencia presente en las muestras de miel.

5.2.4 Obtención de la fracción de mieles entre 3 y 10 KDa

Para obtener la fracción de miel comprendida entre 3 y 10 kDa se procedió de la siguiente forma. Se prepararon soluciones de miel de concentración 20% m/v en buffer fosfato 0,3 M pH 8,3, estas soluciones se filtraron y se vertieron 10 mL en un tubo Amicom ultra-15® con membrana de tamaño de poro de 10 KDa. Se realizó luego una ultrafiltración a 4000 rpm por 40 minutos y el filtrado obtenido fue vertido en un segundo tubo Amicom ultra-15® con membrana de tamaño de poro de 3 KDa. Se realizó una nueva ultrafiltración a 4000 rpm por 80 minutos y un lavado con 5 mL de buffer fosfato 0,3 M pH 8,3 a 4000 rpm por 30 minutos. La fracción retenida entre 3 y 10 KDa se recuperó y reconstituyó a un volumen de 1 mL con buffer fosfato 0,3 M pH 8,3. El esquema de ultrafiltración se muestra en la figura 5.

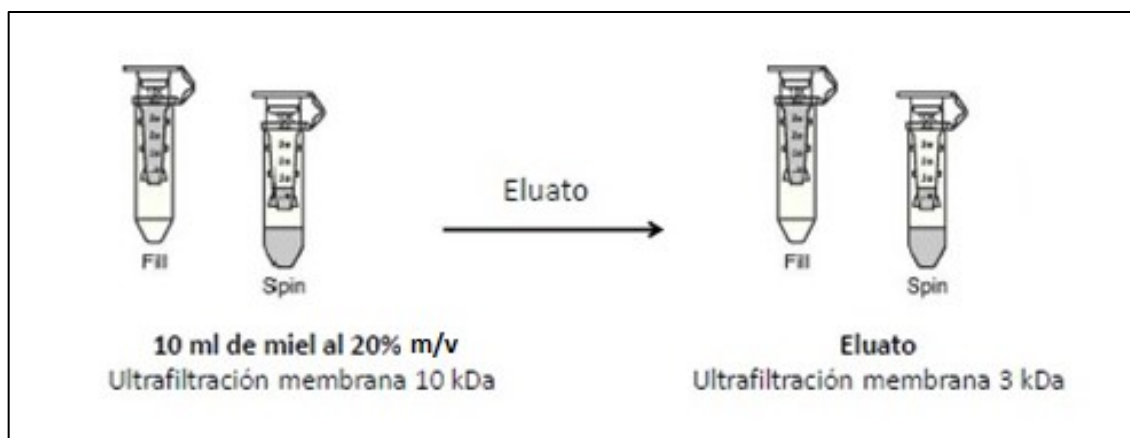


Figura 5. Esquema de ultrafiltración para la obtención de la fracción entre 3 y 10 KDa de miel.

5.2.5 Detección de péptidos antimicrobianos en la fracción 3-10 KDa

5.2.5.1 Obtención y análisis de matrices de excitación-emisión en fracciones 3-10 KDa

Se obtuvieron las matrices de excitación-emisión para las fracciones de miel 3-10 KDa, utilizando una celda de cuarzo de 0,4 mL y paso óptico de 1 cm, el intervalo espectral utilizado fue de 250 a 450 nm cada 2 nm para la longitud de onda de emisión y de 220 a 350 nm cada 5 nm para la longitud de onda de excitación, con un slit de emisión y excitación de 10 nm. La corrección de las matrices y sus posterior análisis mediante MCR se realizó como lo indicado en el punto 5.2.3.

5.2.5.2 Detección y cuantificación de puentes disulfuro en fracciones 3-10 KDa.

Se identificó la presencia de los puentes disulfuro que los péptidos antimicrobianos del tipo defensina poseen mediante su reducción con boro hidruro de sodio y posterior formación de un cromóforo por la reacción entre los tioles formados y el reactivo 4-DTDP en medio ácido (pH 4) (Riener y col., 2002; Hansen y col., 2007).

Se preparó una solución patrón de cisteína de concentración 1000 mg/L en agua nanopure utilizando gotas de ácido clorhídrico diluido para lograr su disolución. A partir de esta disolución se tomaron alícuotas y se diluyeron en buffer Acético 0,4 M pH 4 para obtener soluciones estándar de cisteína de

concentraciones entre los 5 y 85 mg/L, las que se utilizaron para construir los modelos de calibrado.

En un tubo de ensayo de tapa rosca se agregaron 0,3 mL de solución estándar o de muestra, y 0,05 mL de solución de NaBH_4 7 M, 1M NaOH y se dejó reaccionar a 50 °C durante 30 minutos. Posterior a la reacción de reducción, se agregaron 0,02 mL de 2-propanol como antiespumante, 0,08 mL de HCl 6 M y se agitó cuidadosamente asegurándose de eliminar todo el hidruro sobrante. En seguida se agregaron 0,55 mL de buffer acético 0,4 M de pH 4 y 0,5 mL de disolución de 4-DTDP 1,8 mM (preparado inicialmente 18 mM en el mismo buffer) en buffer acético 0,4 M pH 4, se agitó y dejó reaccionar durante 5 minutos para formar el cromóforo. Luego se analizó por espectrometría UV-Vis utilizando como blanco una muestra análoga sin que esta haya sido sometida a la reducción con NaBH_4 , el que es reemplazado por buffer fosfato 0,3 M pH 8,3. Se obtuvieron datos en una vía (324 nm), los que se utilizaron para construir un modelo de calibrado de orden 0 y para analizar muestras por este modelo, y datos en dos vías (espectro entre 304 y 354 nm), los cuales fueron utilizados para construir un modelo de calibración de orden 1 por medio de la utilización del algoritmo PLS y para analizar muestras a través de este modelo de calibración.

Junto con analizar la fracción 3-10 kDa de miel, se analizaron muestras de insulina comercial de 100 UI/mL (3,5 mg/mL) diluidas en buffer fosfato 0,3 M pH 8,3. Estas muestras se utilizaron para evaluar la eficiencia de la reacción de reducción con boro hidruro de sodio y posterior formación del cromóforo derivado de la reacción de los tioles obtenidos y 4-DTDP.

5.2.6 Detección de *Nosema ceranae* en abejas

La presencia del parásito en las abejas se confirmó mediante un método de amplificación de material genético por reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real, el que se realizó en el LBFM-UDD.

5.2.7 Actividad antimicrobiana en miel

La actividad antimicrobiana en las mieles de la X Región fue determinada por el método de difusión en agar sobre bacterias gram positiva (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) y gram negativa (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*). Este análisis fue realizado en el LBFM-UDD.

5.2.8 Análisis de componentes principales

Se construyó una matriz de información conteniendo en las filas las muestras analizadas y en las columnas los diferentes parámetros evaluados para cada muestra. Posteriormente se realizó un PCA sobre matriz de correlación (se estandarizan los descriptores por la desviación estándar observada en cada uno de éstos para que tengan la misma trascendencia) y utilizando la validación cruzada total para seleccionar el número de componentes relevantes.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de prolina libre en miel

La determinación de la concentración de prolina libre en miel se llevó a cabo por medio de la formación de un compuesto cromóforo producido por la reacción entre prolina y ninhidrina (figura 6) acelerada con radiación de microondas y posterior medición por espectroscopía UV-Vis.

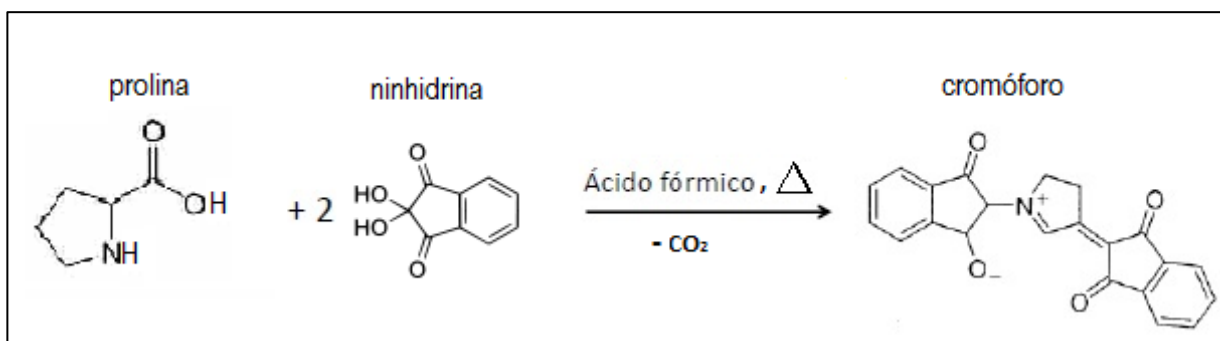


Figura 6. Esquema de reacción entre ninhidrina y prolina.

En la figura 7a se muestran los espectros de absorbancia entre 420 y 790 nm para las muestras de calibrado, registrándose un máximo de absorbancia a 513 nm. A partir de esta información se construyó un modelo de calibrado de orden 0, correlacionando los valores de concentración con la intensidad de la señal observada a 513 nm, obteniéndose la curva de calibración que se muestra en la figura 7b.

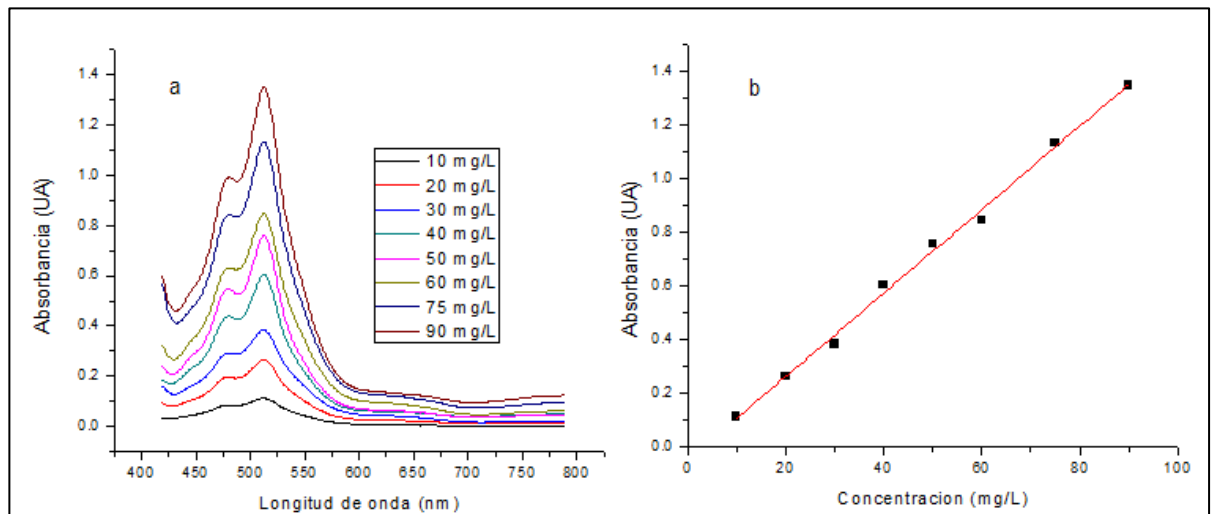


Figura 7. Espectros de absorbancia (a) y curva de calibración (b) obtenidos a partir de las muestras de calibrado para la determinación de prolina en miel.

También se construyó un modelo de calibrado de orden 1 mediante PLS, utilizando el intervalo espectral comprendido entre 420 y 790 nm (Figura 7a), procurando obtener el menor error relativo de calibrado (REC) y bajo límite de detección (LOD).

Con el fin de poder comparar los modelos de calibrado de orden cero y primer orden se obtuvieron diferentes parámetros de calidad como el coeficiente de determinación, la sensibilidad, el inverso de la sensibilidad analítica (SA)⁻¹, LOD, límite de cuantificación (LOQ) y el error relativo de calibrado (REC). Además a partir del análisis de las muestras de miel con el calibrado de orden 1, se obtuvieron igualmente (SA)⁻¹, LOD y LOQ; siendo estos últimos parámetros una aproximación más cercana para condiciones reales de trabajo. Los parámetros obtenidos para ambos modelos se resumen en la tabla 6.

Los coeficientes de determinación para el calibrado de orden cero (Abs = 0,016 [Pro] – 0,048) y de primer orden fueron 99,6% y 99,9%, respectivamente, lo cual indica una alta correlación lineal entre las variables y una gran variabilidad de la respuesta explicada mediante ambos calibrados.

Tabla 6. Parámetros de calidad de los calibrados de orden cero y uno obtenidos para la determinación de prolina en miel.

Parámetros de calidad para modelos de calibrado			
	Orden cero	Orden uno (autopredicción)	Orden uno (muestras reales)
R ² (%)	99,6	99,9	-
Sensibilidad	0,016	0,091	0,092
(SA) ⁻¹ (mg/L)	1,8	0,05	0,09
REC %	3,8	2,0	-
LOD (mg/L)	5,9	0,2	0,3
LOQ (mg/L)	18,0	0,5	0,9

Las (SA)⁻¹ de los modelos de calibración fueron 1,8 y 0,05 mg/L para el calibrado de orden cero y uno, respectivamente. Consecuentemente, el LOD para el calibrado de orden 0 en auto-predicción fue 5,9 mg/L, mientras que para el calibrado de orden 1 fue 0,2 mg/L (36 veces menor) y 0,3 mg/L (19 veces menor) al calcularlo a partir del residuo obtenido en muestras reales. Ello demuestra la ventaja que tiene el modelo de calibrado de orden 1 ya que logra una mayor sensibilidad y disminuyeron los LOD y LOQ en un orden de magnitud en comparación con el calibrado clásico de orden cero. Además la reacción de formación del cromóforo con la asistencia de radiación de microondas para el calentamiento, fue más rápida que en el método convencional con baño de agua, tomando sólo 10 minutos.

Se llevó a cabo la determinación de prolina sobre las 31 mieles provenientes de la VI Región, las 4 mieles de la X Región y la miel proveniente de panales de la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo. Los espectros obtenidos se muestran en la figura 8.

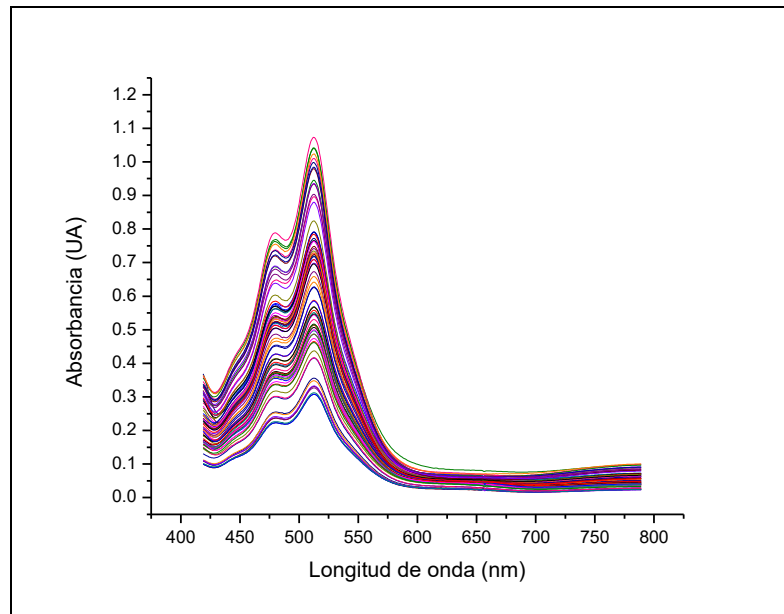


Figura 8. Espectros de absorción de las muestras de miel obtenidos para la determinación de prolina.

Una vez obtenidos los espectros de las muestras de miel, se utilizaron los calibrados de orden cero y uno para obtener los valores de concentración de prolina libre. Los resultados se resumen en la tabla 7.

En las mediciones de prolina se observó que todas las muestras de miel cumplen con la norma de calidad (mínimo 180 mg/Kg para que una miel sea considerada genuina, auténtica y madura). El mayor valor registrado fue de 694 mg/L para la muestra RNC3 proveniente de Rengo de origen floral observado quillay y el valor más bajo fue de 224 mg/Kg para la muestra CLC4 procedente de Chimbarongo y cuyo origen botánico observado es polifloral, ambos valores obtenidos con el calibrado de orden 1.

Tabla 7. Concentración de prolina (mg/kg) en las muestras de miel predichas con los calibrados de orden cero y uno y presencia de nosemosis en las colmenas respectivas.

Concentración de prolina				Concentración de prolina			
Muestra	Orden cero	Orden uno	Nosemosis	Muestra	Orden cero	Orden uno	Nosemosis
CLC1	353	351	-	PQPB	490	486	- (**)
CLC2	402	401	-	PQPC	621	613	+ (**)
CLC3	313	311	-	RNC1	540	535	-
CLC4	228	224	-	RNC2	429	430	-
CLC5	323	322	-	RNC3	703	694	-
CLV1	242	238	-	RNC4	666	657	-
CLV2	276	272	-	RNE1	516	511	-
CLV3	240	236	+	RNE2	396	395	-
CPF1	525	522	-	RNE4	471	467	-
CPF2	427	425	-	RNV1	382	379	-
CPT1	619	614	+	RNV2	513	507	-
CPT2	478	471	-	RNV3	370	369	-
PQG2	510	504	- (**)	RNV4	350	348	-
PQGA	626	615	- (**)	XR1	362	360	-
PQGB	528	522	- (**)	XR2	342	339	-
PQGC	480	475	- (**)	XR3	493	492	-
PQP3	348	346	- (**)	XR4	500	488	-
PQPA	650	640	+ (**)	XR5	673	665	-

(**) Los productores declararon presencia de nosemosis en sus colmenas en agosto de 2015.

Se ordenaron los valores de prolina de las mieles muestreadas en la VI Región por procedencia y origen floral con el fin de poder caracterizar a las mieles del sector. El contenido promedio de prolina, valores máximos, valores mínimos, desviación estándar y coeficiente de variación se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Valores promedio de prolina en mg/Kg, organizados de acuerdo al origen geográfico y floral de las mieles de la VI Región.

Sector	Rengo, Las Nieves HECAL, Apiario El Valle (n=4)	Rengo, Las nieves, Apiario El Último (n=3)	Rengo, Las Nieves, Apiario La Cantera (n=4)	Chimbarongo, La Cuesta, Apiario Manuel Lorca (n=5)	Chimbarongo, La Viña, Apiario Manuel Lorca (n=3)	Codegua, La Punta, Apiario La Falda (n=2)	Codegua, La Punta, Apiario Don Toño (n=2)	Peumo, Los Quillayes, Apiario Pochito (n=4)	Peumo, Los Quillayes, Apiario Canal Gonzalez (n=4)
Origen floral	Tebo	Quillay	Quillay	Polifloral	Polifloral	Polifloral	Polifloral	Peumo y Cítrico	Peumo y Cítrico
Promedio	401	458	579	322	249	474	543	521	529
Valor máximo	507	511	694	401	272	522	614	640	615
Valor mínimo	348	395	430	224	236	425	471	346	475
Desviación estándar	72	58	120	65	20	68	101	135	60
Coefficiente de Variación (%)	18	13	21	20	8	14	19	26	11

Los valores mostrados en la tabla son una buena forma de caracterizar las mieles de esta región por su contenido de prolina. El valor promedio de prolina más alto registrado fue de 579 mg/Kg para las mieles del sector de Rengo que tienen origen floral observado de quillay, mientras que el promedio de prolina más bajo fue de 249 mg/Kg de las mieles originarias de Chimbarongo cuyo origen observado es polifloral. En varios de estos grupos se observa que existe una gran variabilidad de los valores de prolina para muestras provenientes de un mismo sector y similar origen floral, los valores de coeficiente de variación dentro de los grupos fluctúan entre 8 y 26%.

Por otra parte, no se observó una relación entre el contenido de prolina en las mieles y la presencia de nosemosis en las colmenas, ya sea considerando las muestras en que efectivamente se comprobó la presencia de *N. ceranae* o aquellas en que los propios productores declararon presencia de nosemosis, dos meses antes de la recolección de las muestras. Ello indica que la modificación en la concentración de prolina en la miel que pudiese tener la infección es despreciable frente a la variabilidad por origen floral o geográfico.

6.2 Acumulación de peróxido de hidrógeno en miel

El peróxido de hidrógeno que se acumula en la miel es producido por la reacción de oxidación de glucosa para producir ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, la cual es catalizada por la GOX (figura 9). Para que la enzima se active y la reacción proceda debe haber ocurrido una dilución en la miel, debido a que debe existir disponibilidad de agua y difusión del oxígeno molecular disuelto en la miel.

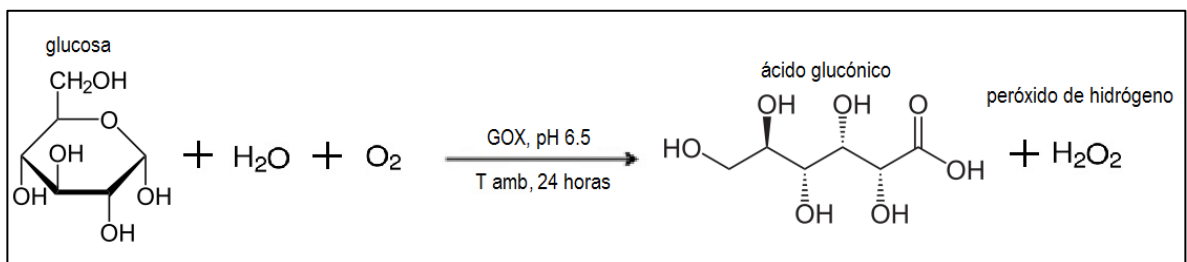


Figura 9. Esquema de reacción de oxidación de la glucosa catalizada por la enzima glucosa oxidasa.

La determinación de la cantidad de peróxido de hidrógeno acumulado se realizó por medio de la formación de un cromóforo por la reacción de este con el reactivo orto-dianisidina catalizada por la enzima peroxidasa (figura 10), y posterior medición de la absorbancia.

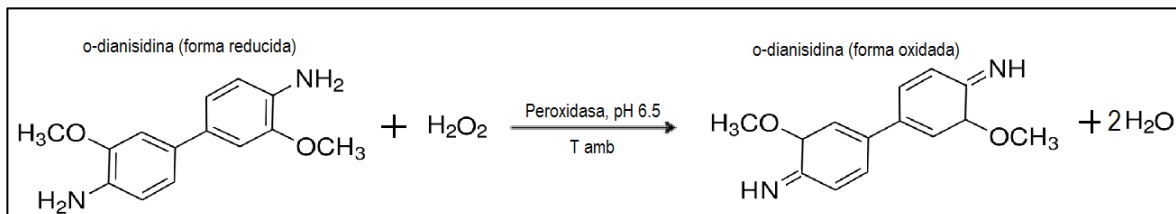


Figura 10. Esquema de reacción entre o-dianisidina y peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima peroxidasa.

Los patrones se prepararon con peróxido de hidrógeno 30% v/v y sus concentraciones fueron expresadas en μg del compuesto por cada g de miel por hora (0,45 a 3,63 μg , de acuerdo a las condiciones de la preparación de las muestras indicadas en la sección 5.2.2.). La curva de calibración obtenida para el máximo de absorbancia (444 nm) se presenta en la figura 11.

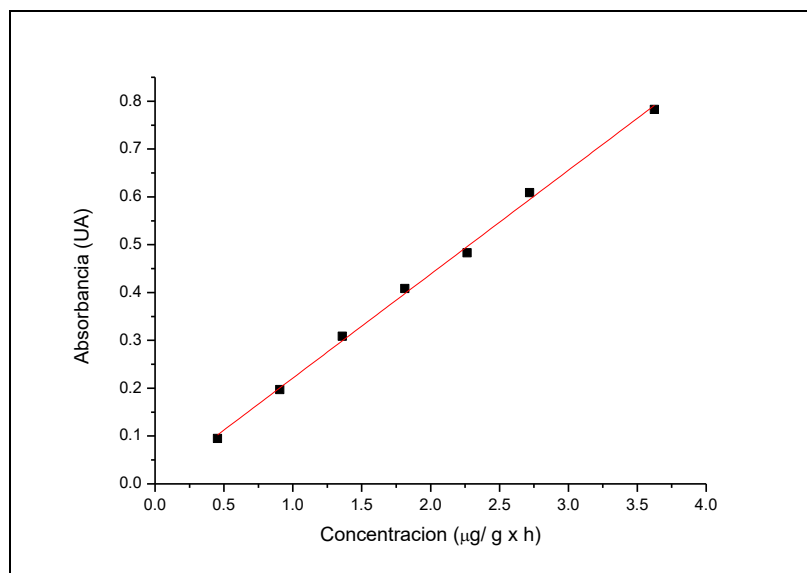


Figura 11. Curva de calibrado obtenida para la acumulación de peróxido de hidrógeno en miel.

A partir del calibrado se obtuvieron parámetros de calidad como el coeficiente de determinación, sensibilidad, $(SA)^{-1}$, REC, LOD y LOQ, los que se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Parámetros de calidad del calibrado para la determinación de peróxido de hidrógeno.

Parámetros de calidad del Calibrado de orden cero	
R ² (%)	99,8
sensibilidad	0,22
REC %	2,6
$(SA)^{-1}$ ug/g×h	0,06
LOD ug/g×h	0,18
LOQ ug/g×h	0,55

La curva de calibración obtenida ($Abs = 0,22 [H_2O_2] + 0,004$) presentó un coeficiente de determinación R² de 99,8%, lo cual da cuenta de la linealidad del modelo y de la alta variabilidad explicada por este. Las $(SA)^{-1}$, LOD y el LOQ obtenidos por medio del error estándar de predicción en las muestras de calibrado fueron 0,055; 0,183 y 0,553 $\mu g/ g \times hora$, respectivamente.

Se determinó la acumulación de peróxido de hidrógeno en las 31 mieles de la VI Región, las 4 mieles de la X Región y la miel del LBFM-UDD. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Acumulación de peróxido de hidrógeno en las muestras de miel ($\mu\text{g}/\text{g} \times \text{hora}$) y presencia de nosemosis en las colmenas respectivas.

Muestra	H ₂ O ₂	Nosemosis	Muestra	H ₂ O ₂	Nosemosis
CLC1	<0,18	-	PQPB	2,70	- (**)
CLC2	<0,55	-	PQPC	1,06	+ (**)
CLC3	<0,18	-	RNC1	<0,18	-
CLC4	<0,18	-	RNC2	<0,55	-
CLC5	<0,18	-	RNC3	<0,18	-
CLV1	<0,18	-	RNC4	0,96	-
CLV2	<0,18	-	RNE1	<0,18	-
CLV3	<0,55	+	RNE2	<0,55	-
CPF1	<0,18	-	RNE4	<0,18	-
CPF2	<0,18	-	RNV1	<0,55	-
CPT1	<0,18	+	RNV2	<0,55	-
CPT2	<0,55	-	RNV3	0,64	-
PQG2	<0,18	- (**)	RNV4	<0,55	-
PQGA	2,34	- (**)	XR1	0,62	-
PQGB	3,81	- (**)	XR2	1,07	-
PQGC	1,14	- (**)	XR3	0,56	-
PQP3	3,21	- (**)	XR4	<0,18	-
PQPA	<0,18	+ (**)	XR5	1,27	-

(**) Los productores declararon presencia de nosemosis en sus colmenas en agosto de 2015.

La mayoría de las muestras de Rengo, Chimbarongo y Codegua presentaron una muy baja acumulación de peróxido de hidrógeno, con valores que estuvieron bajo el LOD (<0,18 $\mu\text{g}/\text{g} \times \text{hora}$) o entre el LOD y LOQ (<0,55 $\mu\text{g}/\text{g} \times \text{hora}$). Sólo las muestras del sector de Peumo y las de la X Región mostraron valores cuantificables, con un máximo de 3,81 $\mu\text{g}/\text{g} \times \text{hora}$. Las muestras se encuentran por debajo del valor de acumulación de peróxido de hidrógeno reportado en bibliografía. Sin embargo, lo que se reporta en bibliografía presenta distintas diluciones, por lo que se vuelve difícil comparar (por sobre 100 mg/L de peróxido para diluciones de 30 y 50% m/v) (Belitz y col., 2009; Bang y col., 2003; Kwakman y col., 2011). Cabe mencionar que la acumulación de peróxido de

hidrógeno se puede considerar como reflejo de la actividad de la enzima GOX, por lo que esta fue apreciable sólo en estas últimas muestras. Además se han reportado mieles cuya acumulación de peróxido de hidrógeno es muy baja o nula (Kwakman y Zaat, 2012; Mahmoud y Owayss, 2006), lo que indica que lo observado para las muestras de la VI Región no es un hecho anómalo.

Por otra parte, se observó que la mayor acumulación de peróxido de hidrógeno se produjo en mieles recolectadas desde colmenas en las que efectivamente se comprobó la presencia de *N. ceranae* (PQPC) y en las que los propios productores declararon presencia de nosemosis, dos meses antes de la recolección de las muestras. Ello indica que la infección incrementaría la producción y/o actividad de GOX en las abejas y consecuentemente en la miel que estas producen. Sin embargo, la fuente de alimentación de las abejas podría ser un factor que influye igualmente sobre la actividad de la enzima. Por ello se requiere de un mayor número de muestras para corroborar este hecho.

6.3 Análisis de matrices de excitación-emisión de mieles por MCR-ALS

6.3.1 Mieles de la VI Región

Se obtuvieron los perfiles de fluorescencia de las soluciones de las 31 mieles provenientes de la VI Región al 10 y 20% m/v. El análisis mediante MCR extrajo 4 componentes como los relevantes según su *eigenvalue*, por lo que los perfiles de fluorescencia de las mieles son bien descritos por un modelo de 4 componentes. Los cuatro componentes determinados se observan en la figura 12. El primero de éstos (azul) presenta una longitud de onda máxima de excitación de 288 nm y un máximo de emisión de 348 nm, y se puede relacionar con aminoácidos aromáticos presentes en la miel, particularmente triptófano, el que presenta longitudes de onda excitación/emisión de intensidad de fluorescencia máxima de 275 y 343 nm (Lenhardt y col., 2015). El segundo componente (verde) correspondería a la riboflavina (vitamina B2), el que presentó máxima excitación y emisión a 433 nm y 516 nm, respectivamente; ya que la riboflavina pura muestra un par de excitación/emisión de 450/525 nm (Yang y col., 2015). El tercer componente (rojo) presenta un máximo de excitación de 320 nm de y de emisión de 410 nm, y estaría relacionado a los compuestos fenólicos presentes en la miel, los que presentan máximos de excitación y emisión en el rango de 240-360 nm y 260-500 nm respectivamente (Wang y col., 2010). El cuarto y último componente (cian) que tiene máximo de excitación a 342 nm y de emisión a 467 nm correspondería a productos de la reacción de Maillard, contenidos en un único componente, los que presentan un máximo de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm (Birlouez-Aragon y col., 1998). Entre los principales producto de la reacción de Maillard están el hidroximetilfurfural (HMF), producido por deshidratación de las hexosas catalizada en medio ácido, y la

furosina que resulta de la hidrólisis ácida de compuestos de Amadori formados por reacción entre azúcares reductores y lisina (Sanz y col., 2003). Para éstos se han reportado máximos de excitación y emisión de 395 y 473 nm, y 370 y 426 nm, respectivamente (Lenhardt y col., 2015).

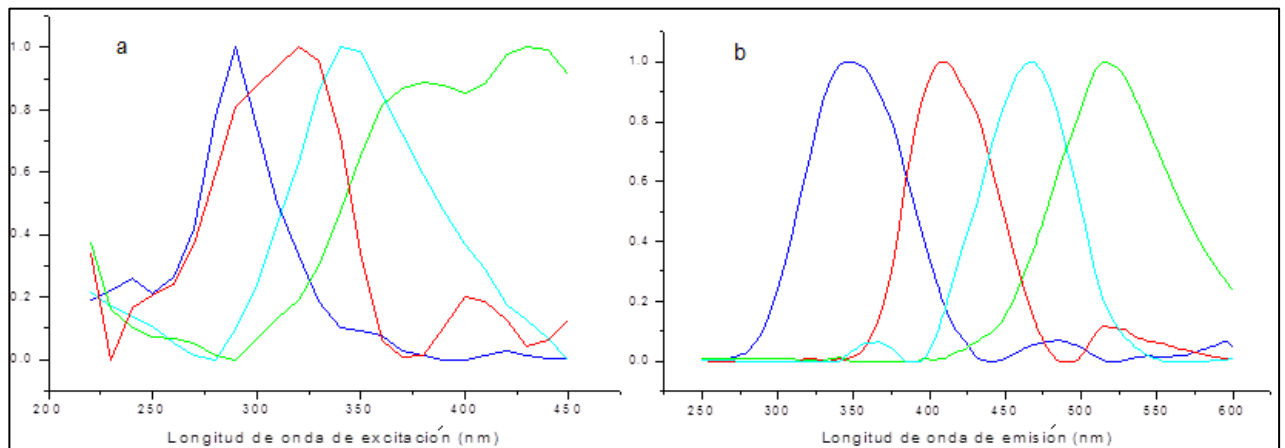


Figura 12. Espectros de excitación (a) y de emisión (b) de los cuatro componentes extraídos por MCR-ALS para las muestras de la VI Región. Aminoácidos fluorescentes (azul), riboflavina (verde), compuestos fenólicos (rojo) y productos de la reacción de Maillard (cian).

Posteriormente, se obtuvo la concentración relativa de los 4 fluoróforos en cada una de las muestras. Para ello se obtiene el área bajo la curva de cada componente y se le asigna arbitrariamente el valor de la unidad a los componentes de la primera muestra (CLC1). En la figura 13 y tabla 11 se observan los espectros de excitación de los cuatro componentes extraídos por MCR para las 31 muestras y los valores de concentración relativa, respectivamente. Se puede observar que en las muestras originarias de Peumo (PQG y PQP) predomina la fluorescencia producida por los aminoácidos aromáticos, lo que podría estar asociado a origen floral de estas mieles (cítricos y peumo). Mientras que para muestras provenientes de Rengo RNV y RNC, y de Chimbarongo CLC y CLV predomina la fluorescencia de la riboflavina y de los

productos de Maillard. Por otra parte, las muestras CLV 1, RNC 2 y RNV 4 contienen cantidades considerablemente menores de los cuatro fluoróforos en comparación al resto de las muestras. En las muestras pertenecientes a Codegua se observa predominancia de la fluorescencia de aminoácidos aromáticos para dos de las muestras CPF 2 y CPT 2, mientras que para CPF 1 es la fluorescencia correspondiente a los productos de Maillard y para CPT 1 predomina ligeramente la que es producida por los compuestos fenólicos.

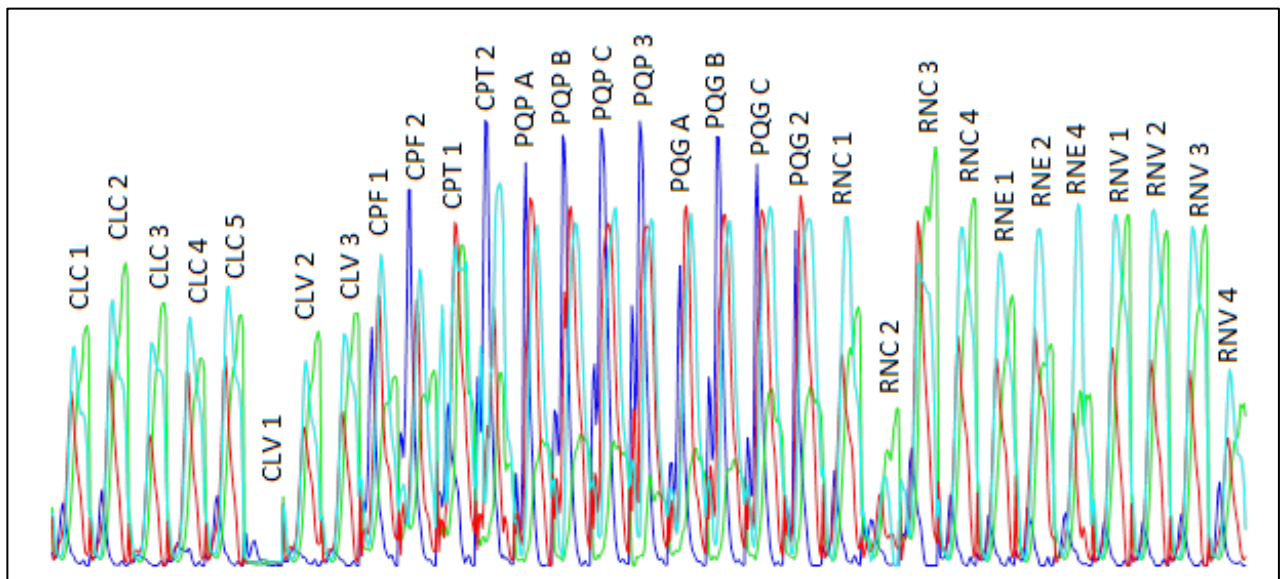


Figura 13. Espectros de excitación de los cuatro componentes extraídos mediante MCR para las muestras de miel de la VI Región.

Tabla 11. Concentración relativa de los componentes extraídos para las mieles de la VI Región.

Muestra	Aminoácidos Fluorescentes	Riboflavina	Compuestos Fenólicos	Furosina e hidroximetilfurfural
CLC1	1,00	1,00	1,00	1,00
CLC2	1,02	1,23	1,06	1,18
CLC3	0,24	1,01	0,71	1,05
CLC4	0,55	0,87	0,99	1,07
CLC5	1,07	1,07	1,08	1,24
CLV1	0,50	0,02	0,06	0,04
CLV2	0,42	0,95	0,89	0,87
CLV3	0,34	1,02	0,85	1,03
CPF1	3,82	0,99	1,60	1,36
CPF2	6,16	1,09	1,40	1,31
CPT1	3,60	1,48	2,19	2,10
CPT2	7,50	0,85	1,42	1,96
PQG2	5,04	0,67	2,15	1,50
PQGA	7,08	0,73	2,57	1,63
PQGB	8,61	0,72	2,59	1,79
PQGC	8,64	0,46	2,62	1,54
PQP3	4,53	0,65	1,94	1,56
PQPA	7,33	0,60	2,48	1,59
PQPB	6,17	0,93	2,36	1,81
PQPC	4,07	0,96	2,39	1,78
RNC1	1,40	1,18	1,39	1,54
RNC2	1,10	0,71	0,48	0,37
RNC3	2,12	2,04	2,01	1,66
RNC4	1,17	1,47	1,40	1,62
RNE1	0,76	1,13	1,23	1,45
RNE2	0,89	1,07	1,58	1,49
RNE4	0,90	0,83	0,70	1,26
RNV1	0,65	1,43	1,14	1,66
RNV2	0,67	1,41	1,19	1,66
RNV3	0,73	1,35	1,03	1,56
RNV4	1,13	0,72	0,72	0,81

6.3.2 Mieles de la X Región y miel del LBFM-UDD

Para las muestras XR1, XR2, XR3, XR4 y XR5 se obtuvieron los perfiles de fluorescencia de las soluciones de miel al 20%. Al igual que en el anterior grupo de mieles, el análisis mediante MCR extrajo 4 componentes como los relevantes según su *eigenvalue*, por lo que los perfiles de fluorescencia de estas mieles también son bien descritos por un modelo de 4 componentes.

El espectro de emisión de los cuatro componentes obtenidos se observa en la figura 14, los que fueron asignados de manera similar a las mieles de la VI Región. Sin embargo, en este caso el orden en que fueron extraídos fue diferente: El primer componente (azul) se asigna a productos de la reacción de Maillard, furosina e hidroximetilfurfural, su par de excitación y emisión es de 332 y 470 nm, respectivamente. Para el segundo componente (verde) se observa una longitud de excitación máxima de 252 nm y de emisión de 350 nm, por lo que este se relaciona a la fluorescencia producida por los aminoácidos aromáticos presentes en miel. El tercer componente (rojo) corresponde a la señal característica de los compuestos fenólicos, que presentan un par excitación/emisión de 281/418 nm. Y el cuarto (cian) es asignado a la fluorescencia de la riboflavina, la cual presenta longitud de excitación máxima de 385 nm y emisión de 513 nm.

En estas mieles los productos de la reacción de Maillard se presentaron como el fluoróforo principal (primer componente extraído), lo que podría estar asociado al mayor tiempo de almacenamiento que tenían al momento del análisis, en comparación a las mieles de la VI Región; ya que se ha descrito que estos compuestos se forman durante almacenamientos prolongados del producto (Sanz y col., 2003).

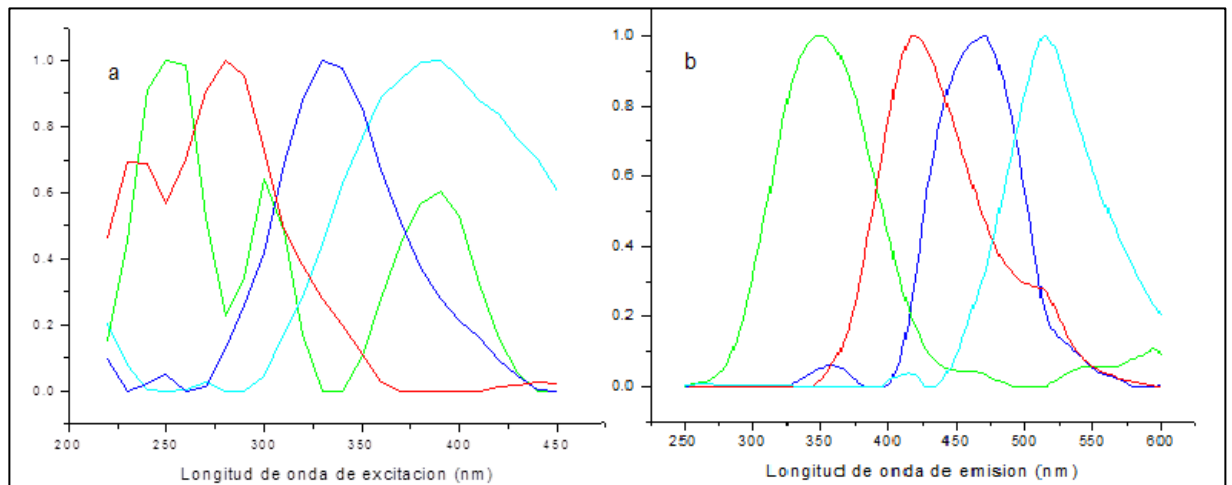


Figura 14. Espectros de excitación (a) y de emisión (b) de los cuatro componentes extraídos por MCR-ALS para las mieles de la X Región y la miel del Laboratorio de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo. Productos de Maillard (azul), Aminoácidos aromáticos (verde), compuestos fenólicos (rojo) y riboflavina (cian).

Posteriormente se obtuvo la concentración relativa de los 4 fluoróforos en cada una de las 5 muestras, asignándole arbitrariamente el valor de la unidad a los componentes de la primera muestra (XR1). En la figura 15 y tabla 12 se observan los espectros de excitación de los cuatro componentes extraídos por MCR para las 5 muestras y los valores de concentración relativa, respectivamente.

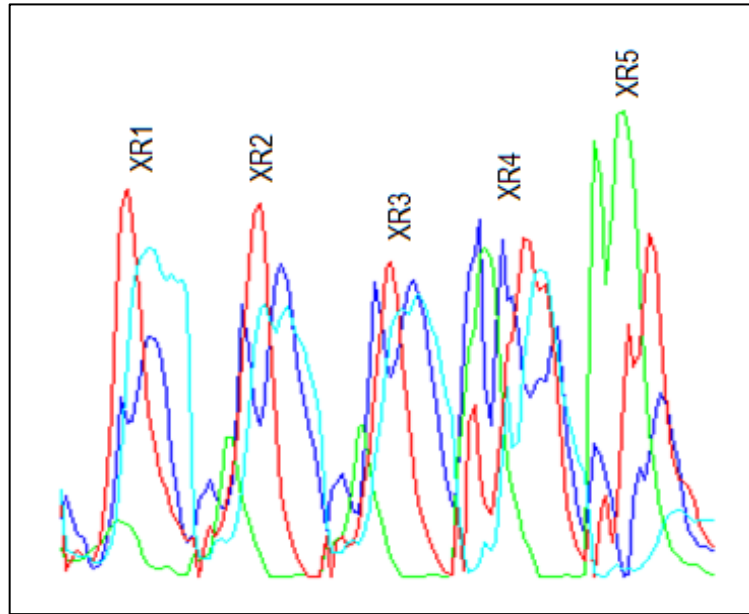


Figura 15. Espectros de excitación de los cuatro componentes extraídos mediante MCR para las muestras de miel de la X Región y la miel LBFM-UDD.

Tabla 12. Concentración relativa de los componentes extraídos para las mieles de la X Región y la miel LBFM- UDD.

Muestra	Furosina e hidroximetilfurfural	Aminoácidos	Compuestos Fenólicos	Riboflavina
XR1	1,00	1,00	1,00	1,00
XR2	1,53	1,40	0,91	0,90
XR3	1,60	1,58	0,81	0,93
XR4	1,94	4,40	1,30	0,84
XR5	0,77	7,85	1,05	0,20

6.4 Detección de péptidos antimicrobianos en la fracción de miel de 3-10 KDa

El péptido antimicrobiano denominado defensina-1 es producido por las abejas en las glándulas hipofaríngeas de su cabeza y depositado en diversos productos fabricados por estas. Una iso-forma de este péptido fue encontrado en jalea real siendo denominado royalisina-F (Ro-F) (Fujiwara y col., 1990). También se ha reportado su presencia en miel, sin especificar la iso-forma (Kwakman y Zaat, 2012). La defensina-1 es un péptido de 51 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 5,5 KDa aproximadamente. Presenta un extremo C-terminal hidrofílico y libre de residuos de cisteína, mientras que el extremo N-terminal es hidrofóbico y posee seis residuos de cisteína con emparejamiento C1-C4, C2-C5, C3-C6; formando tres puentes disulfuro, lo que lo hace muy compacto y resistente a cambios de pH o temperatura en el medio (Bulet y col., 1999; Kwakman y col., 2010). Este péptido presenta actividad antimicrobiana principalmente Gram-positivo siendo un componente antimicrobiano importante en la miel. La secuencia de aminoácidos de las dos iso-formas del péptido, defensina-1 y Ro-F, se muestran en la figura 16. La principal diferencia entre ambos es que Ro-F presenta un residuo de tirosina en lugar de arginina.

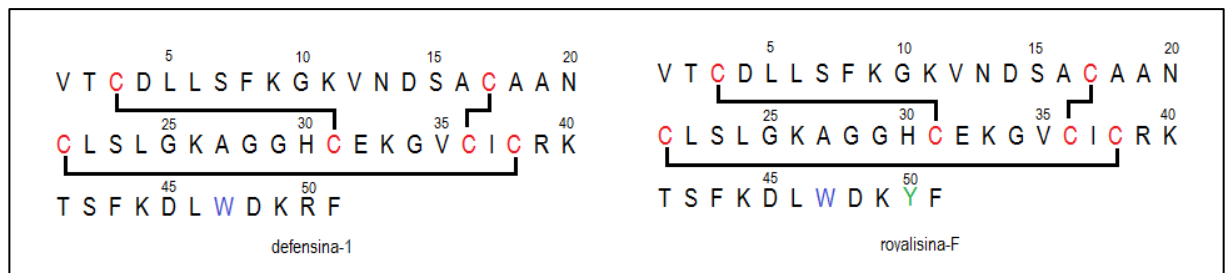


Figura 16. Secuencia de aminoácidos de los péptidos antimicrobianos defensina-1 y royalisina-F, donde C es cisteína, W es triptófano e Y es tirosina.

Considerando el peso molecular de 5,5 kDa descrito para la defensina-1, se aisló la fracción de miel comprendida entre 3 y 10 kDa en la que estaría presente. A esta fracción se le determinó su espectro de excitación-emisión y la presencia de puentes disulfuro en péptidos con el fin de establecer la presencia del péptido. Cabe señalar que este procedimiento sólo se realizó con las mieles de la X Región y la miel LBFM-UDD, ya que para las primeras se contaba con la información sobre su actividad antimicrobiana (ver sección 6.5)

En la figura 17 se muestran los espectros de excitación-emisión de la fracción 3-10 kDa para estas mieles. En éstos se reconocen dos señales correspondientes a los aminoácidos triptófano y tirosina, cuyos espectros para patrones puros se muestran en la figura 18. El péptido defensina-1 presenta en su estructura solo el triptófano como fluoróforo; sin embargo, en todas las mieles fue detectado igualmente tirosina lo que indicaría que en estas se encuentra presente el péptido Ro-F, solo o en mezcla con defensina-1, ambos de peso molecular y estructura similares (Figura 16). El péptido Ro-F como tal sólo ha sido reportado en jalea real (Fujiwara y col., 1990), mientras que defensina-1 también se ha reportado en miel, pero sin especificar la iso-forma encontrada (Kwakman y Zaat, 2012).

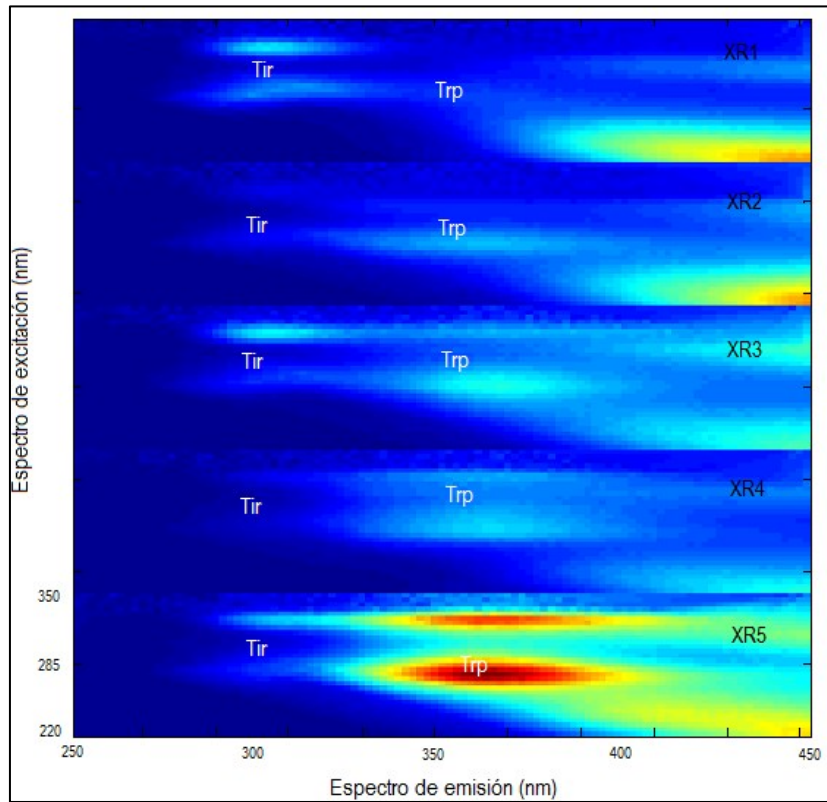


Figura 17. Matrices de excitación/emisión de las fracciones 3-10 KDa de las mieles de la X Región y la muestra del Laboratorio de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo, obtenidas por fluorescencia total.

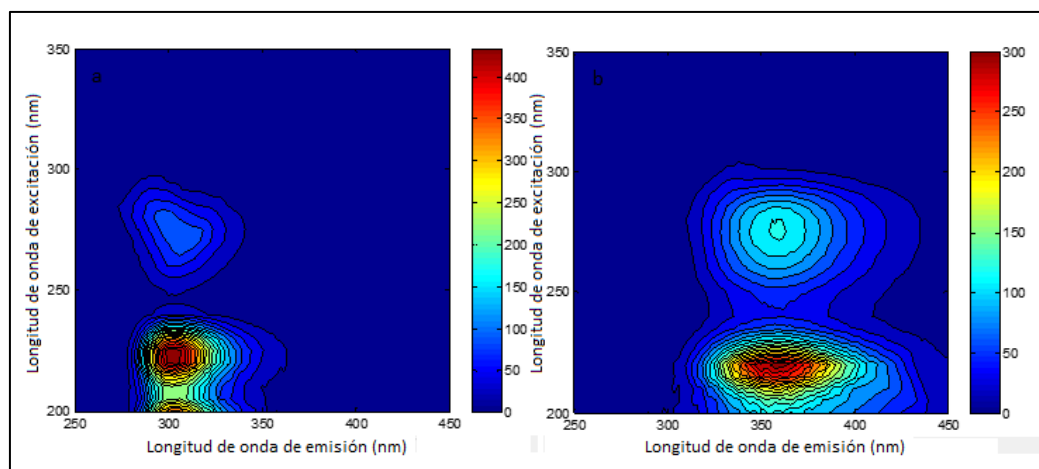


Figura 18. Matrices de excitación/emisión para patrones de tirosina (a) y triptófano (b), obtenidos por fluorescencia total

La detección de los puentes disulfuro en la fracción 3-10 kDa se realizó mediante su reducción con NaBH₄ en medio básico y posterior reacción del tiol con 4-DTDP para formar un cromóforo analizado por espectrometría UV-Vis (figura 19).

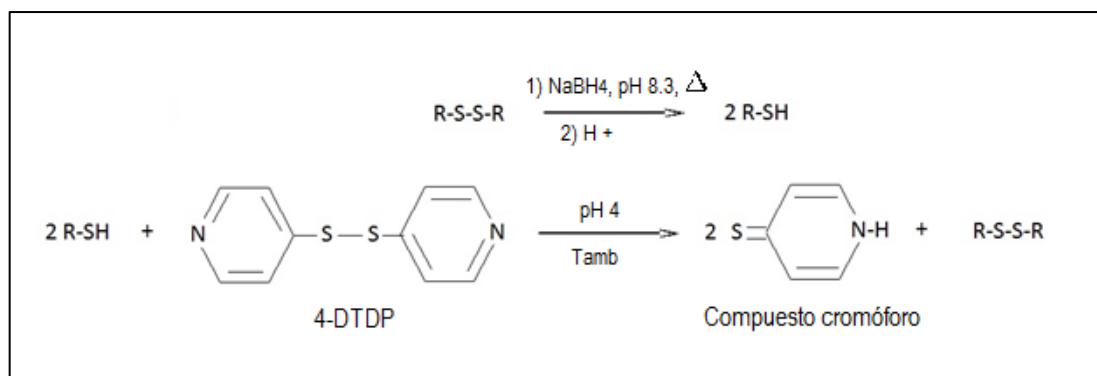


Figura 19. Esquema para la reacción de reducción de puentes disulfuro, y formación de cromóforo por la reacción entre los tioles y 4-DTDP.

Para la cuantificación de los tioles formados se utilizó una curva de calibrado preparada con soluciones estándar de cisteína de entre 5 a 85 mg/L, y su reacción directa con 4-DTDP. Los espectros de absorbancia obtenidos se muestran en la figura 20a, cuyo máximo de absorbancia se observó a los 324 nm. Se construyó un modelo de calibrado de orden cero considerando la absorbancia registrada a 324 nm y la curva obtenida se observa en la figura 20b.

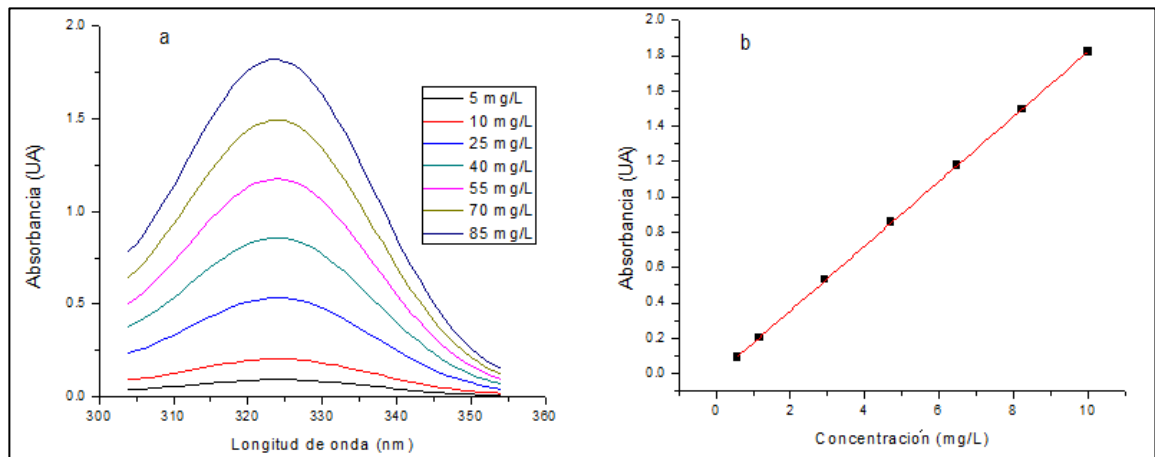


Figura 20. Gráfico de los espectros de absorbancia obtenidos a partir de las muestras de calibrado (a) y curva de calibración construida (b) para la determinación de péptidos antimicrobianos por medio de sus puentes disulfuro.

Posteriormente, se construyó un modelo de calibrado de orden uno mediante PLS. El intervalo espectral utilizado (304 y 354 nm; Figura 20a) se determinó intentando obtener el menor valor posible de REC y bajo LOD.

Con el fin de poder comparar los modelos de calibrado de orden cero y primer orden se obtuvieron diferentes parámetros de calidad como el coeficiente de determinación, la sensibilidad, $(SA)^{-1}$, LOD, LOQ y el REC. Además a partir del análisis de las muestras con el calibrado de orden 1, se obtuvieron igualmente $(SA)^{-1}$, LOD y LOQ; siendo estos últimos parámetros una aproximación más cercana para condiciones reales de trabajo. Los parámetros obtenidos para ambos modelos se resumen en la tabla 13.

Para la determinación de defensina-1 en miel por medio de sus puentes disulfuro, los coeficientes de determinación para el calibrado de orden cero ($Abs = 0,022 [Cis] - 0,009$) y de primer orden fueron 99,995% y 99,996%, respectivamente, lo cual indica una alta correlación lineal entre las variables y una gran variabilidad de la respuesta explicada mediante ambos calibrados.

Tabla 13. Parámetros de calidad de los calibrados de orden cero y uno obtenidos para la determinación de péptidos antimicrobianos por medio de sus puentes disulfuro.

Parámetros de calidad para modelos de calibrado			
	Orden cero	Orden uno (auto-predicción)	Orden uno (muestras reales)
R ² (%)	99,995	99,996	-
Sensibilidad	0,022	0,105	0,105
(SA) ⁻¹ (mg/L)	0,24	0,02	0,40
REC (%)	0,5%	0,005%	-
LOD (mg/L)	0,78	0,06	1,32
LOQ (mg/L)	2,40	0,18	4,00

Las (SA)⁻¹ de los modelos de calibración fueron 0,24 y 0,02 mg/L para el calibrado de orden cero y uno, respectivamente. Consecuentemente, el LOD para el calibrado de orden 0 en auto-predicción fue 0,78 mg/L, mientras que para el calibrado de orden 1 fue 0,06 mg/L (13 veces menor). Tal como se destacó previamente, esto demuestra la ventaja que tiene el modelo de calibrado de orden 1 ya que logra una mayor sensibilidad y disminuyó los LOD y LOQ en un orden de magnitud en comparación con el calibrado clásico de orden cero. Sin embargo, se observó que el LOD del calibrado de primer orden considerando muestras reales (1,32 mg/L) fue mayor que el del calibrado de orden cero (0,78 mg/L). Esto se debe al mayor ruido registrado en las muestras reales de miel (figura 21b) el que sería producido por la matriz que no se logra eliminar en la ultracentrifugación. Por ello el valor de 1,32 mg/L es más adecuado como LOD del método.

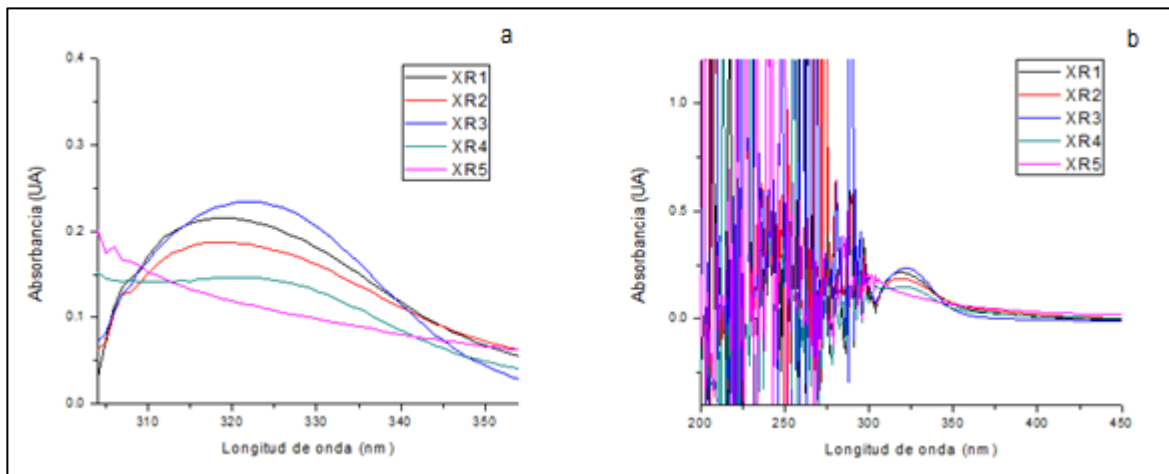


Figura 21. Región espectral utilizada para la determinación de péptidos antimicrobianos de la fracción de miel entre los 3 y 10 KDa (a) y región espectral observada entre 200 y 450 nm (b).

Con el fin de evaluar el método este fue aplicado en la cuantificación de tioles en tres muestras de insulina comercial como péptido modelo, ya que éste tiene varias similitudes con la defensina-1: Tiene 51 residuos de aminoácidos, un peso molecular de 5,8 KDa y presenta en su estructura 6 residuos de cisteína formando tres puentes disulfuro. Se prepararon soluciones de insulina equivalentes a 34,8 mg de cisteína/L, las que posteriormente fueron sometidas a la reducción y reacción con 4-DTDP. Los espectros de absorción de las tres muestras analizadas en triplicado se observan en la figura 22.

Se determinó la cantidad de tioles generados expresados como mg de cisteína/L utilizando ambos modelos de calibrado. Los valores predichos se resumen en la tabla 14.

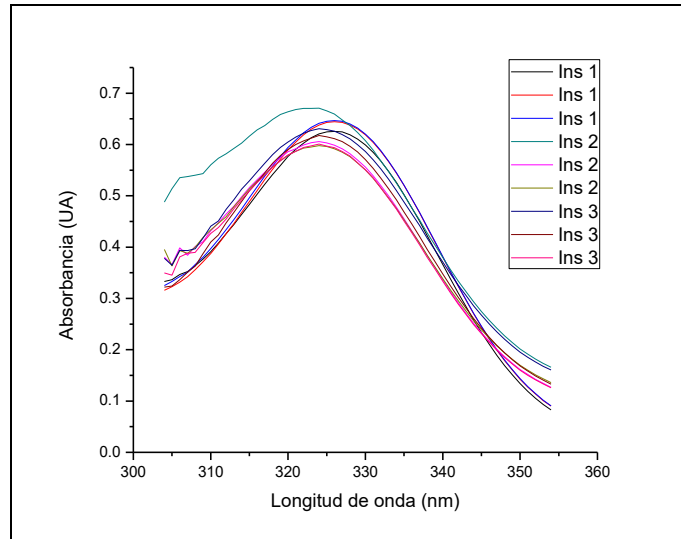


Figura 22. Espectros de absorbancia obtenidos para las tres muestras de insulina analizadas en triplicado.

Tabla 14. Concentración de tioles expresados en mg de cisteína/L, determinados en las muestras de insulina comercial predichos con los calibrados de orden cero y uno (valor nominal 34,8 mg de cisteína/L).

	Calibrado de orden cero		Calibrado de orden uno	
	Concentración	Promedio (Rec.)	Concentración	Promedio (Rec)
ins1	29,3		30,6	
ins1	30,1	29,9 (85,9%)	31,2	31.1 (89.4%)
ins1	30,2		31,5	
ins2	31,6		34,8	
ins2	28,6	29,5 (84,8%)	30,3	31.7 (91.2%)
ins2	28,2		30,1	
ins3	29,7		31,7	
ins3	29,1	29,0 (83,3%)	30,4	30.7 (88.1%)
ins3	28,3		29,9	

Se observa que la recuperación fue cercana al 90% para tres muestras distintas, siendo la concentración predicha con el calibrado de orden uno más

confiable dado que presenta mejores parámetros de calidad. Esto demuestra la efectividad en la reducción de los puentes disulfuro y posterior determinación de los tioles formados en un péptido de similares características que la defensina-1.

Se determinó la presencia de puentes disulfuro en la fracción 3-10 kDa de las cuatro mieles de la X Región y en la miel del LBFM-UDD. Los espectros de absorbancia obtenidos y la cantidad del péptido antimicrobiano presente, expresado como mg de cisteína/L y como mg de defensina-1/Kg de miel, se presentan en la figura 21 y tabla 15, respectivamente.

Tabla 15. Valores de concentración de péptidos antimicrobianos en la fracción 3-10 KDa de mieles de la X Región y LBFM-UDD, predichos con los calibrados de orden cero y uno.

	Calibrado orden cero		Calibrado orden uno	
	Concentración (mg/L) expresado como cisteína	Concentración (mg/Kg de miel) expresado como defensina-1	Concentración (mg/L) expresado como cisteína	Concentración (mg/Kg de miel) expresado como defensina-1
XR1	10,1	22,4	10,9	24,4
XR2	8,9	19,8	9,9	22,0
XR3	11,2	25,1	11,6	25,9
XR4	7,2	16,0	8,3	18,5
XR5	5,6	12,4	7,4	16,6

Los valores de defensina-1 obtenidos por el calibrado de orden 1 fluctúan entre 16,6 y 25,9 mg/Kg de miel. Si bien se ha reportado la presencia de defensina-1 en miel (Kwakman y col., 2010; Kwakman y Zaat 2012) no se mencionan las cantidades encontradas. Por otra parte en jalea real se reporta la presencia de royalisina en cantidades de 300 mg/Kg (Fujiwara y col., 1990) y 6000 mg/Kg (Bilikova y col., 2001), lo que indica que es en este producto donde las abejas depositan preferentemente el péptido.

6.5 Actividad antimicrobiana en miel

Se le determinó la actividad antimicrobiana a las mieles de la X Región. Los resultados en términos del diámetro de halos de inhibición de crecimiento sobre distintos tipos de bacterias se presentan en la tabla 16. Se puede observar que las mieles presentan principalmente actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivo, *Staphylococcus Aureus* y *Staphylococcus Epidermidis*, y en menor medida contra bacterias Gram negativo, *Pseudomona Aeruginosa* y *Escherichia Coli*, a excepción de la miel XR4, para la cual solo se observó actividad antimicrobiana sobre la bacteria Gram positivo *Staphylococcus Aureus*.

Tabla 16. Actividad antimicrobiana de mieles de la X Región. Se presentan la media de los halos de inhibición en mm *.

Muestra	Origen floral	<i>Staphylococcus Aureus</i> n=2	<i>Staphylococcus Epidermidis</i> n=2	<i>Pseudomona Aeruginosa</i> n=2	<i>Escherichia Coli</i> n=2	∑ de halos de inhibición
XR 1	Ulmo	31,5 ± 2,1	17 ± 1,4	10	10,5 ± 0,7	69
XR 2	Tineo	29,5 ± 0,7	15,5 ± 0,7	9,5 ± 0,7	9,5 ± 2,1	64
XR 3	Tiaca	29 ± 1,4	14 ± 1,4	9	10	62
XR 4	Alfalfa chilota	20,5 ± 2,1	-	-	-	21

* Se agregaron 130 µL de una solución de miel al 82% m/v en cada "spot" de 8 mm

Al comparar la actividad antimicrobiana de las mieles sobre las bacterias Gram positiva, particularmente *S. aureus*, con el contenido de defensina-1 encontrado en aquellas se observa una relación directa entre ambos. Se ha descrito que la defensina-1 presenta actividad principalmente contra bacterias Gram positiva (Fujiwara y col., 1990) y especialmente contra la bacteria *Paenibacillus larvae* causante de la "loque americana" en las abejas (Bilikova y

col., 2001). Esto demuestra el aporte significativo que hace el péptido a esta propiedad de la miel.

6.6 Análisis de componentes principales

6.6.1 PCA sobre parámetros registrados para las mieles de la VI Región

Con el fin de evaluar las relaciones existentes entre los parámetros estudiados en las mieles y establecer si existen cambios significativos de alguno de éstos asociados a la presencia de nosemosis en las abejas, se realizó un análisis de componentes principales PCA con los datos obtenidos para las 31 mieles de la VI Región. La matriz analizada contiene en sus columnas la concentración de prolina, la cantidad de peróxido de hidrógeno acumulado, las áreas relativas de aminoácidos fluorescentes, flavonoides, compuestos fenólicos y productos de Maillard, además de la presencia de la infección por *N. ceranae* en las abejas. Para igualar la influencia de todas las variables descriptoras sobre el PCA, éste se realizó sobre la matriz de correlación (centrado y división por la desviación estándar observada para cada columna). La selección del número de componentes relevantes se realizó mediante validación cruzada (Breerton, 2003).

En la figura 23 se observa el gráfico de los coeficientes (loadings) para los dos primeros componentes extraídos, los que explican un 77% de la variabilidad de los datos. En este gráfico se evidencia la existencia de relaciones entre las variables que se estudiaron en las mieles y abejas, observar el aporte de cada variable a la información contenida en los componentes principales y determinar si hay relación entre alguna de las variables medidas en miel y la presencia de la infección por *N. ceranae* en la abeja.

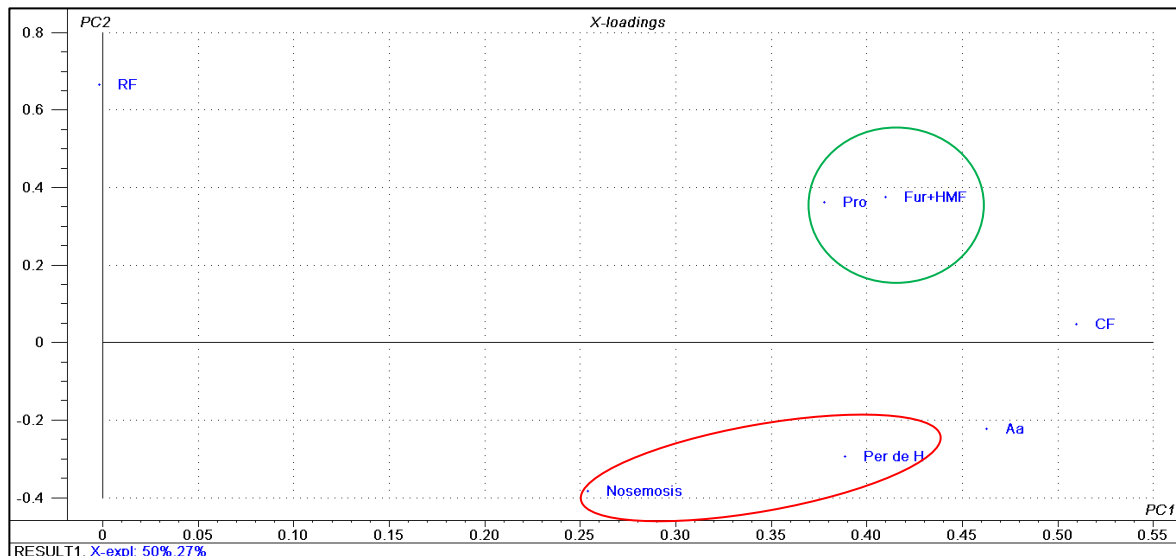


Figura 23. Gráfico de coeficientes para PCA realizado sobre los parámetros obtenidos para las muestras de miel de la VI Región. RF: riboflavina, Pro: prolina, Fur+HMF: furosina + hidroximetilfurfural, CF: compuestos fenólicos, Aa: aminoácidos aromáticos (tripófano), Per de H: acumulación H_2O_2 .

Como se observa en el gráfico de coeficientes (figura 23) se presentó una relación directa entre la efectiva presencia de *N. ceranae* en abejas y la acumulación de peróxido. Como ya se había indicado previamente, la mayor acumulación de peróxido de hidrógeno se produjo en mieles recolectadas desde colmenas efectivamente infectadas con *N. ceranae* y en las que los propios productores declararon presencia de nosemosis. Ello indica que la infección incrementaría la producción y/o actividad de GOX en las abejas. Sin embargo, cabe mencionar que de las 31 muestras estudiadas sólo cuatro presentaron la infección por *N. ceranae* (tres colmenas de la comuna de Peumo y una de la comuna de Chimbarongo) por lo que la representatividad es limitada y la relación observada debería ser confirmada con un número mayor de muestras. No se observó relación entre la presencia de nosemosis y los otros parámetros medidos en miel ya que éstos varían principalmente con el origen botánico y/o geográfico

de la miel, por lo que no se establece una relación evidente entre ellos y la infección.

Por otra parte, existe una correlación significativa entre prolina y los productos de la reacción de Maillard, furosina e hidroximetilfurfural. Esta relación se explica debido a que esta reacción, que se produce principalmente entre un azúcar reductor y la lisina (cuyo producto es 2-furoilmetil-lisina o furosina), también ha sido reportada con prolina generando como producto 2-furoilmetil-prolina. Por ello, la relación entre los dos parámetros indica que esta reacción se está produciendo y es dependiente de la concentración de prolina en las mieles, lo cual es congruente con lo observado en la literatura (Sanz y col., 2003).

En un estudio realizado por Jabali y col., 2012, se observó diferencias en el perfil metabólico de la hemolinfa de abejas infectadas con nosemosis y abejas sanas. Entre éstos se describe la disminución significativa de prolina en abejas infectadas. Sin embargo, los cambios que producirían las abejas a través de su metabolismo sobre la cantidad de estos metabolitos en miel resultan poco significativos en comparación a los que se observan por las diferencias de procedencia del néctar, del polen y diferencias en el entorno en el que se desenvuelven las abejas. Tal fue lo observado en las muestras de miel originarias de la VI Región, donde la cantidad de prolina presentó grandes variaciones dependiendo del sector donde fueron recolectadas. Incluso dentro de un mismo grupo de muestras de similar origen floral y geográfico, los coeficientes de variación se encuentran entre 8-26%, esto es consistente con lo observado en la literatura científica donde se pueden observar diferencias en las cantidades de prolina según procedencia botánica y floral (Czipa y col., 2012; Truzzi y col., 2014). Cabe mencionar que el perfil de amino-ácidos en mieles (entre los que se encuentran prolina, tirosina y triptófano) ha sido utilizado para su clasificación de acuerdo a origen floral mediante PCA o análisis discriminante (Hermosín y col., 2003; Nozal y col, 2004).

En relación a los compuestos fenólicos presentes en la miel, se han reportado diferencias en su actividad antimicrobiana y antioxidante atribuible a la presencia de estos compuestos, lo que a su vez depende del origen botánico y geográfico de las mieles (Boukraâ y col., 2012). Al igual que los aminoácidos, el perfil de compuestos fenólicos en mieles también se ha empleado para clasificarlas por origen floral a través de PCA (Kečkeš y col., 2013).

Con respecto a la actividad de GOX en miel se ha demostrado que una dieta más diversa en las abejas aumenta la actividad de GOX en miel (Alaux y col., 2010a). Otros estudios reportan que una dieta deficiente en tiamina y riboflavina, compuestos obtenidos básicamente del polen, tiene un efecto negativo sobre el desarrollo de la glándula hipofaríngea en la abeja, que es la encargada de producir la enzima GOX (Herbert y Shimanuki, 1978). Por otra parte el H₂O₂ acumulado en la miel puede sufrir degradación por acción de la catalasa procedente del polen, néctar o microorganismos (Huidobro y col., 2005).

Los perfiles de fluorescencia de mieles de diversos orígenes florales han sido analizados mediante análisis paralelo de factores (PARAFAC), una herramienta similar a MCR (Lenhard y col., 2015). Los autores reportan seis componentes fluorescentes asignados a aminoácidos aromáticos, furosina, hidroximetilfurfural, riboflavina y dos grupos distintos de compuestos fenólicos. Los valores de estos componentes se utilizaron para construir dos modelos de clasificación por medio de PLS discriminante, permitiendo identificar mieles adulteradas (modelo para autenticidad) y clasificar mieles de acuerdo a su origen botánico

Dado que la variabilidad en muchos de los parámetros analizados depende en gran parte del tipo de alimentación o el entorno en el que la abeja se desenvuelve, éstos pueden ser potenciales marcadores del origen floral y geográfico de las mieles permitiendo su agrupamiento y clasificación cuando la presencia de aquellos es común en un grupo de muestras. En la figura 24 se

muestra el gráfico de puntuaciones (asociadas a las muestras) y coeficientes obtenidos en el PCA. En esta gráfica se observan dos grupos de muestras; el primero con mieles de Rengo y Chimbarongo (RN y CL) y el segundo con mieles de Codegua (CP) y Peumo (PQ), además de un par de muestras aisladas. Se observa asimismo que el grupo Codegua-Peumo presenta los mayores niveles de triptófano, compuestos fenólicos y acumulación de peróxido, particularmente las muestras de Peumo. En el caso de estas últimas mieles, los productores indicaron a cítricos y peumo como el origen del néctar, lo que podría ser la causa de estos mayores contenidos de los parámetros diferenciadores. Consecuentemente, los parámetros medidos pueden potencialmente ser utilizados para caracterizar y clasificar mieles por origen floral y/o geográfico.

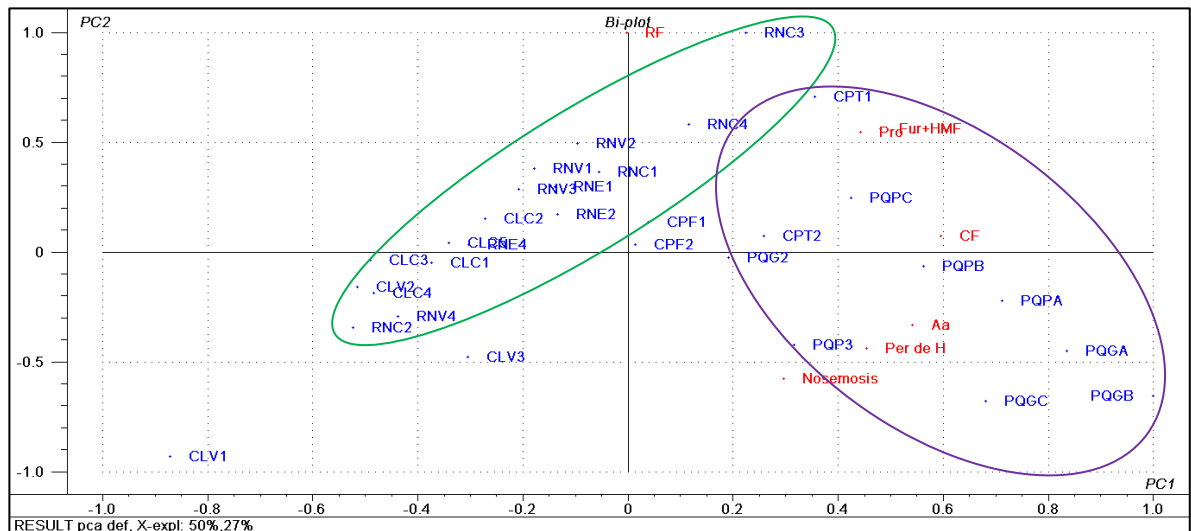


Figura 24. Gráfico de puntuaciones y coeficientes para PCA realizados sobre parámetros obtenidos para las muestras de miel de la VI Región. RF: riboflavina, Pro: prolina, Fur+HMF: furosina + hidroximetilfurfural, CF: compuestos fenólicos, Aa: aminoácidos aromáticos (triptófano), Per de H: acumulación H_2O_2 .

6.6.2 PCA sobre parámetros registrados para las mieles de la X Región

En este análisis sólo se incluyeron las cuatro muestras de miel de la X Región ya que únicamente a estas se les determinó la actividad antimicrobiana. Se realizó el PCA sobre la matriz de correlación (centrado y división por la desviación estándar observada para cada columna) y extracción de dos componentes debido al limitado número de muestras. En este caso la información contenida por la matriz a analizar fue la concentración de prolina, acumulación de peróxido de hidrógeno, aminoácidos aromáticos, productos de la reacción de Maillard, compuestos fenólicos, riboflavina, concentración de defensina-1 en fracción 3-10 kDa y la sumatoria de los halos de inhibición como reflejo de la actividad antimicrobiana. En la figura 25 se presenta el gráfico de coeficientes.

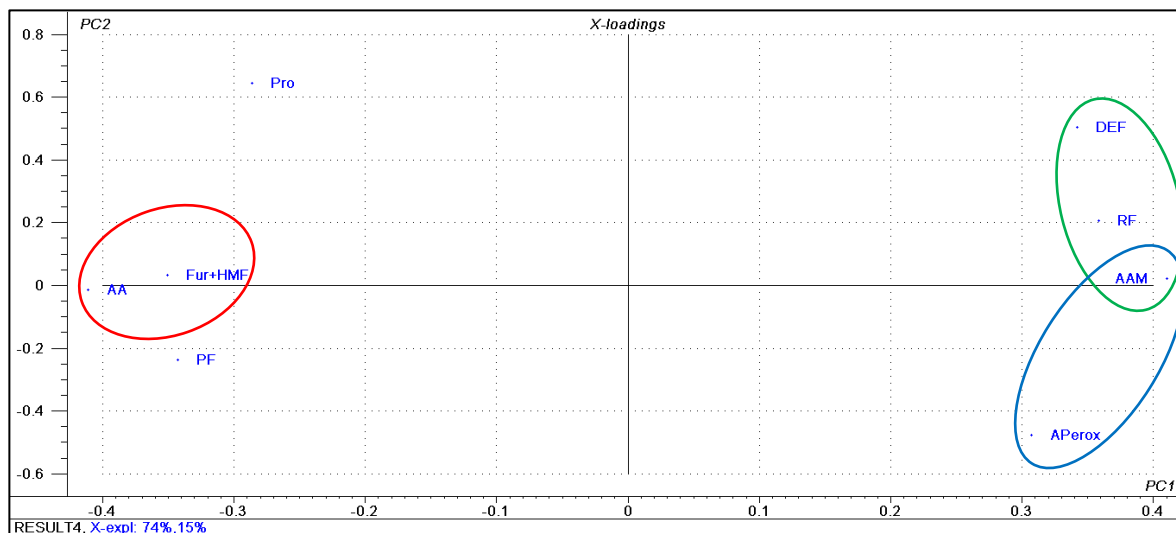


Figura 25. Gráfico de coeficientes para PCA realizado sobre los parámetros obtenidos para las muestras de miel de la X Región. RF: riboflavina, Pro: prolina, Fur+HMF: furosina + hidroximetilfurfural, CF: compuestos fenólicos, Aa: aminoácidos aromáticos (tripófano), Ac H₂O₂: acumulación H₂O₂, Def-1: Defensina-1, AAM: Actividad antimicrobiana.

En el gráfico se observa una concordancia entre la cantidad de aminoácidos aromáticos y los productos de la reacción de Maillard, lo cual puede explicarse debido a que los primeros se relacionan con el contenido total de amino ácidos y éstos a su vez están involucrados en la reacción de Maillard (Belitz y col., 2009). Por otra parte y lo que es más relevante, se observa una relación directa entre la actividad antimicrobiana, la cantidad de defensina-1 y la acumulación de peróxido de hidrógeno en la miel; lo que indica que ambos factores contribuyen de manera significativa y complementaria a su actividad antimicrobiana. Además se presentó una relación entre las cantidades del péptido y riboflavina. Al respecto cabe señalar que se he demostrado la importancia que tiene la riboflavina en la longevidad de las abejas y desarrollo de sus glándulas hipofaríngeas, que es donde se produce la defensina-1, observándose que en abejas alimentadas con una dieta deficiente en riboflavina las glándulas no lograron desarrollarse más allá de la etapa en la que se encuentran en los insectos emergentes (Herbert y Shimanuki, 1978). En este sentido la riboflavina sería un factor importante en la producción del péptido.

El gráfico de puntuaciones y coeficientes, Figura 26, muestra que las mieles XR1, XR2 y XR3 se agrupan y presentan similar cantidad de péptido antimicrobiano, acumulación de peróxido y actividad antimicrobiana (valores altos para PC1); mientras que la miel XR4 aparece aislada con valores más bajos para estos parámetros (valores bajos de la PC1). Efectivamente en esta miel no se detectó acumulación de peróxido de hidrógeno (Tabla 10), tuvo la concentración de péptido más baja entre las muestras de la X Región (Tabla 15) y presentó actividad antimicrobiana sólo sobre la bacteria Gram positivo *S. Aureus*. Esto evidencia que el péptido y el H₂O₂ aportan de forma complementaria a la actividad antimicrobiana de la miel, donde el primero tiene acción sobre bacterias Gram positiva con efectividad variable, mientras que el H₂O₂ es de “amplio espectro” sobre otras bacterias (Tabla 16). Este hecho ha sido reportado al estudiar la actividad antibacteriana de la miel, identificando a la defensina-1, H₂O₂ y

metilglioxal (este último para mieles de manuka procedentes de Nueva Zelanda) como los factores que contribuyen de manera diferenciada a la actividad de la miel contra bacterias específicas, siendo necesaria su presencia combinada para una actividad de amplio espectro (Kwakman y Zaat, 2012).

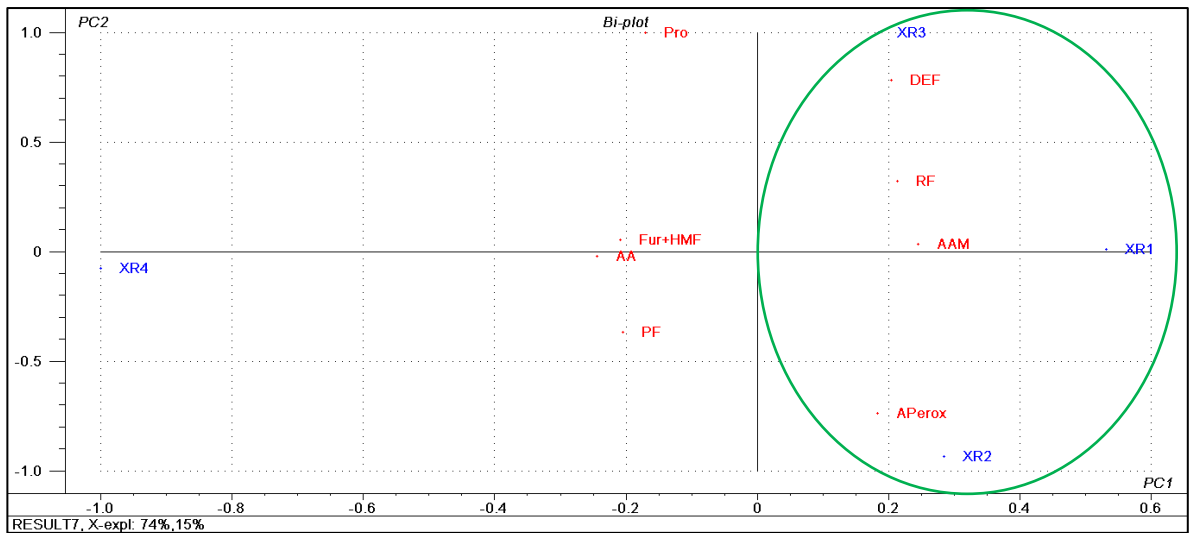


Figura 26. Gráfico de puntuaciones y coeficientes para PCA realizados sobre parámetros obtenidos para las muestras de miel de la X Región y la miel del Laboratorio de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo.

7. CONCLUSIONES

Los métodos para determinar la concentración de prolina libre y actividad de GOX por acumulación de peróxido de hidrógeno en miel fueron aplicados satisfactoriamente en el análisis de muestras de la VI y X regiones. Aquellos basados en calibración de orden uno presentaron mayor sensibilidad y menor LOQ que los de orden cero.

El análisis de los espectros de excitación-emisión de las mieles mediante MCR-ALS permitió identificar cuatro componentes fluorescentes asignados al triptófano, compuestos fenólicos, productos de la reacción de Maillard (furosina e HMF) y compuestos fenólicos.

La infección con *Nosema* spp (*N. ceranae* y/o *N. apis*) incrementaría la actividad de GOX en las abejas y consecuentemente en la miel que estas producen. Sin embargo, no se descarta la fuente de alimentación de las abejas como un factor influyente sobre la actividad de la GOX. Se requiere de un mayor número de muestras para corroborar la relación.

La presencia de *N. ceranae* en abejas no presentó relación con el contenido de prolina libre en miel ya que éste depende principalmente de las fuentes de alimentación disponibles en el entorno donde las abejas se desarrollan.

Las mieles analizadas pueden ser diferenciadas por origen geográfico en base a su contenido de prolina libre, actividad de GOX y los cuatro componentes fluorescentes identificados mediante MCR-ALS.

El péptido antimicrobiano del tipo defensina-1 (defensina-1 y/o royalisina) fue determinado en la fracción 3-10 kDa en mieles de la X Región, basándose

en la identificación de sus puentes disulfuro y presencia de aminoácidos aromáticos.

El péptido antimicrobiano del tipo defensina-1 y el peróxido de hidrógeno contribuyen a la actividad de la miel contra bacterias específicas y se requiere su presencia combinada para lograr una actividad de amplio espectro.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Alaux C., Ducloz F., Crauser D., Le Conte Y. (2010a). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.*, 6 (4), 562-565.
- ❖ Alaux C., Brunet J., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M., Brillard J., Baldy A., Belzunces L., Le conte Y. (2010b). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.*, 12 (3), 774-782.
- ❖ Bang L., Bunting C., Molan P. (2003). The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *J. Altern. Complement. Med.*, 9 (2), 267-273.
- ❖ Belitz H.-D., Grosch W., Shieberte P. (2009). *Food Chemistry*. 4ª edición, Berlin Heidelberg, Springer, 883-891.
- ❖ Bernal J., Nozal J., Toribio L., Diego J., Ruiz A. (2005). A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. *J. Sep. Sci.*, 28, 1039-1047.
- ❖ Biesmeijer J., Roberts S., Reemer M., Ohlemüller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A., Potts S., Kleukers R., Thomas C., Settele J., Kunin W. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313, 351-345.
- ❖ Bilikova K., Wu G., Simuth j. (2001). Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as potential antifoulbrood factor. *Apidologie*, 32, 275-283.
- ❖ Birlouez-Aragon I., Nicolas M., Metais A., Marchond N., Grenier J., Calvo D. (1998). A rapid fluorimetric method to estimate the heat treatment of liquid milk. *Int. Dairy J.*, 8(9), 771-777.
- ❖ Boukraâ L., Alzahrani H., Alsabehi R., Abdellah F., Bellik Y., Bakhotmah B. (2012). Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules*, 17, 10540-10549.
- ❖ Brereton R. (2000). Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analist*, 125, 2125-2154.
- ❖ Bulet P., Hetru C., Dimarcq J., Hoffmann D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23, 329-344.
- ❖ *Codex Alimentarius* commission (2001). Report of the seventh session of the codex committee on sugars, 9-11 february 2000. ALINORM 01/25, 16-26.

- ❖ Consejo de la UE (2002). Directiva 2001/110/CE del consejo del 20 de diciembre de 2001 relativa a la miel. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L 10, 47-52.
- ❖ Czipa N., Borbély M., Györi Z. (2012). Proline content of different honey types. *Acta Aliment. Hung.*, 41(1), 26-32.
- ❖ Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. *J. Biol. Chem.*, 265(19), 11333-11337.
- ❖ Hansen R., Østergaard H., Nørgaard P., Winther J. (2007). Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Biochem.* 363, 77-82.
- ❖ Herbert E., Shimanuki H. (1978). Effects of thiamine- or riboflavin-deficient diet fed to new emerged honey bees, *Apis Mellifera L.* *Apidologie*, 9(4), 341-348.
- ❖ Hermosín I., Chicón R., Cabezudo M. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chem.*, 83, 263-268.
- ❖ Higes M., Antúnez K., Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A., Zunino P. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (microsporidia). *Environ. Microbiol.*, 11(9), 2284-2290.
- ❖ Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Barrios L., Martínez-Salvador A., Meana A., Mayack C. (2011). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol Res.*, 109, 605-612.
- ❖ Huidobro J., Sánchez M., Muniategui S., Sancho M. (2005). Precise method for measurement of catalase activity in honey. *J. AOAC Int.*, 88(3), 800-804.
- ❖ Ilsayov R., Gaifullina L., Saltykova E., Poskryakov A., Nikolenko A. (2012). Review of the expression of antimicrobial peptide defensin in honey bees *Apis Mellifera L.* *J. Apic. Sci.*, 56 (1), 115-124.
- ❖ Ilyasov R., Gaifullina L., Saltykova E., Poskryakov A., Nikolaenko A. (2013). Defensins in the honeybee antiinfectious protection. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 49 (1), 1-9.
- ❖ Jabali S., Aliferis K., Copley T. (2012). Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera L.*) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *J. Insect Physiol.*, 58, 1349-1359.
- ❖ Kečkeš S., Gašić U., Ćirković T., Milojković-Opsenica D., Natić M., Tešić Ž. (2013). The determination of phenolic profiles of serbian unifloral honeys using ultra-high-

performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chem.*, 138, 32-40.

- ❖ Klauđiny J., Albert Š., Bachanová K., Kopernický J., Šimúth J. (2005). Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis Mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35, 11-22.
- ❖ Klein A., Vaissière B., Cane J., Dewenter I., Cunningham S., Kremen C., Tscharntke T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for word crops. *Proc. R. Soc.*, 274, 303-313.
- ❖ Kwakman P., Velde A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Graus C., Zaat S. (2010). How honeys kills bacteria. *FASEB J.*, 24, 2576-2582.
- ❖ Kwakman P., de Boer L., Ruyter-Spira C., Creemers-Molenaar T., Helsper J., Vandenbroucke-Grauls C., Zaat S., te Velde A. (2011). Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 251-257.
- ❖ Kwakman P., Zaat S. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*, 64(1), 48-55.
- ❖ Lenhardt L., Bro R., Zeković I., Dramićanin T., Dramićanin M. (2015). Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey. *Food Chem.*, 175, 284-291.
- ❖ Nozal M., Bernal J., Toribio M., Diego J., Ruiz A. (2004). Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 1047, 137-146.
- ❖ Mahmoud A., Owayss A. (2006). A modified method to determine hydrogen peroxide activity as a criterion for bee honey quality. *Annals of Sci. Moshtohor*, 44(4), 1629-1639.
- ❖ Ough C. (1969). Rapid determination of proline in grapes and wines. *J. Food Sci.*, 34, 228-230.
- ❖ Pettis J., Delaplane K. (2010). Coordinated responses to honey bee decline in the USA. *Apidologie*, 41(3), 256-263.
- ❖ Pettis J., vanEngelsdorp D., Johnson J., Dively G. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99, 153-158.
- ❖ Riener C., Kada G., Gruber H. (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls whit Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, 266-276.

- ❖ Roubik D. (1995). Pollination of cultivated plants in the tropics. FAO Agricultural Services Bulletin 118, Roma.
- ❖ Sanz M., Corzo N., del Castillo M., Olando A. (2003). 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. J. Agrc. Food Chem., 51, 4278-4283.
- ❖ Sheppard W., Wu J., Smart M., Anelli C. (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (microsporidia) infection. J. Invertebr. Pathol., 109, 326-329.
- ❖ Truzzi C., Annibaldi A., Illuminati S., Finale C., Scarponi G. (2014). Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. Food Chem., 150, 477-481.
- ❖ Wang H., Zhang Y., Xiao X., Jin D., Zhao N., Yin G., Guo L., Liu W. (2010). Excitation-emission fluorescence characterization study of the three phenolic compounds. Guang Pu., 30(5), 1271-1274.
- ❖ White J., Subers M., Schepartz A. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. Biochim. Biophys. Acta, 73, 57-70.
- ❖ Williams I. (1994). The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. Agric. Zool. Rev., 6, 229-257.
- ❖ Yang H., Xiao X., Zhao X., Hu L., Zong J., Xue X. (2015). Study on fluorescence spectra of thiamine and riboflavin. IC3ME 2015, 1458-1466.

