

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Marcadores químicos de la miel asociados al estado metabólico e inmune de colonias de *Apis mellifera*. Efecto del parásito *Nosema ceranae* o la aplicación de una composición biocida basada en un extracto vegetal

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica en el área de especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular por:

CONSTANZA ALICIA LEY HERNÁNDEZ

Director: Dr. Edwar Fuentes Pérez

Codirectora: Dra. Jessica Martínez Arenas

SANTIAGO – CHILE

DICIEMBRE 2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

CONSTANZA ALICIA LEY HERNÁNDEZ

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al
grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Toxicológica y
Diagnóstico Molecular, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Edwar Fuentes P. _____

Codirectora de Tesis:

Dra. Jessica Martínez A. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez A. _____

Dr. Javier Puente P. _____

Dr. Waldo Quiroz V. _____

“There is no knowledge that is not power.”

Ralph Waldo Emerson

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría partir reconociendo la excelente labor mis profesores guía, el Dr. Edwar Fuentes y la Dra. Jessica Martínez. Ambos tuvieron una muy buena disposición, paciencia y comprensión durante el desarrollo de esta tesis. No solo cumplieron un rol fundamental en mi vida profesional, sino que han sido parte importante de mi desarrollo personal. Muchas gracias por todo el tiempo dedicado para sacar adelante este trabajo.

Agradezco también a la Dra. María Estrella Báez y Dra. Jeanette Espinoza por la grata compañía y el cariño que me brindaron, así como por enseñarme todos los trucos del cromatógrafo líquido. Me gustaría destacar igualmente al grupo del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, por enseñarme e integrarme a su equipo de trabajo. Asimismo, no puedo dejar de agradecer a los integrantes del Laboratorio de la Dra. Jessica Martínez de la UDD por la disposición y paciencia al ayudarme con el desarrollo de los experimentos.

Igualmente, estoy muy agradecida de haber podido trabajar con mis compañeros de laboratorio. Ya sea riéndonos, reflexionando o tan solo acompañándonos, mi experiencia con ellos no pudo haber sido más enriquecedora. Espero que sean amistades que perduren por mucho tiempo. También agradezco a mis amigos por darme ese espacio de desahogo y cariño que tanto necesité algunas veces y estar en mis momentos más alegres.

A mi familia le debo todo: aguantarme en mis altibajos, unas veces aconsejándome y otras sólo escuchando, brindando amor y comprensión. A mis padres, Cecilia y Luis, les agradezco por apoyar las decisiones que he tomado y por enseñarme los valores que han formado la profesional y la persona que soy. A mi hermano, Joaquín, por siempre ayudarme con las presentaciones, dándoles su toque especial. A mi pareja, Laurentzi, le agradezco por siempre mostrarme el lado positivo de las cosas y por entender el sacrificio que implicó realizar este Magíster. A sus padres, Ximena y Laurentzi, por hacerme sentir una más de su familia.

Finalmente, agradezco a la Universidad de Chile por darme la oportunidad de realizar este Magíster y a CONICYT por el financiamiento otorgado a través de FONDECYT para el desarrollo del presente trabajo (Proyecto 1140328).

LUGAR DE DESARROLLO

Laboratorio de Química Analítica de Contaminantes Orgánicos y Elementos Traza, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Centro de Medicina Regenerativa, Facultad de Medicina, Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT 1140328

A la fecha, este trabajo ha dado origen a las siguientes comunicaciones científicas:

Presentaciones en congreso

Presentación oral “DETERMINACIÓN DE DEFENSINA-1 EN MIEL DE *APIS MELLIFERA* A TRAVÉS DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASADOS EN FLUORESCENCIA” en XXXII Jornadas Chilenas de Química, Puerto Varas, Chile. Enero 2018.

Presentación oral “HERRAMIENTAS ANALÍTICAS PARA EVALUAR EL EFECTO DE UN EXTRACTO VEGETAL SOBRE MARCADORES DE LA MIEL ASOCIADOS AL ESTADO METABÓLICO E INMUNE DE COLONIAS DE *APIS MELLIFERA*” en XIII Simposio Latino Americano de Química Analítica y Ambiental y XIV Encuentro de Química Analítica y Ambiental, La Serena, Chile. Noviembre 2018.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xxi
INTRODUCCIÓN	1
1. Importancia ecológica y económica de las abejas melíferas	1
2. Síndrome del Colapso de Colonias de abejas	1
3. Efecto de <i>Nosema ceranae</i> sobre el metabolismo e inmunidad de las abejas melíferas	3
4. Estudio de la miel como reflejo del estado metabólico e inmunológico de la colmena	6
5. Efecto de una composición biocida basada en un extracto vegetal sobre el sistema inmune de <i>Apis mellifera</i>	7
6. Herramientas analíticas para caracterizar marcadores de estado metabólico e inmunidad social en la miel	8
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Materiales	12
1. Insumos	12
2. Reactivos	12
3. Solventes	13
4. Instrumentos	14
5. Equipos	14
6. Software	15

Métodos	15
1. Muestras de miel y abejas	15
2. Detección de <i>Nosema ceranae</i> en abejas	17
3. Cuantificación de prolina libre en miel	18
4. Cuantificación de proteínas totales en miel	18
5. Cuantificación del H ₂ O ₂ acumulado en miel como reflejo de la actividad de GOX	19
6. Fluorescencia total de la miel	19
7. Cuantificación de fenoles totales en miel	20
8. Obtención de la fracción de 3 a 10 kDa de la miel	20
9. Cuantificación de defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de la miel	21
9.1 Fluorescencia total	21
9.2 HPLC con detector de fluorescencia	22
10. Actividad antimicrobiana de la miel	22
10.1 Concentración Inhibitoria Mínima de mieles de prueba	22
10.2 Actividad antimicrobiana relativa de la miel	24
11. Actividad antimicrobiana de la fracción de 3 a 10 kDa de la miel	24
11.1 Concentración Inhibitoria Mínima de la fracción de 3 a 10 kDa de mieles de prueba	24
11.2 Actividad antimicrobiana relativa de la fracción de 3 a 10 kDa de la miel	25
12. Test estadísticos y análisis de componentes principales (PCA)	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
1. Muestras de la V Región	27
1.1 Presencia de <i>Nosema ceranae</i> en abejas	27
1.2 Concentración de prolina libre en miel	28
1.3 Concentración de proteínas totales en miel	32
1.4 Concentración de H ₂ O ₂ en miel como reflejo de la actividad de GOX	35
1.5 Fluorescencia total de la miel	39
1.6 Concentración de fenoles totales en miel	43
1.7 Cuantificación de defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de la miel a través de fluorescencia total	48

1.8 Cuantificación de defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de la miel a través de HPLC con detector de fluorescencia	56
1.9 Actividad antimicrobiana de la miel	61
1.10 Actividad antimicrobiana de la fracción de 3 a 10 kDa de la miel	68
1.11 Análisis de componentes principales de las variables determinadas en miel	70
2. Análisis de miel colectada desde colmenas tratadas con HO21	72
2.1 Concentración de prolina libre en miel	72
2.2 Concentración de proteínas totales en miel	74
2.3 Concentración de H ₂ O ₂ en miel como reflejo de la actividad de GOX	75
2.4 Fluorescencia total de la miel	76
2.5 Concentración de fenoles totales en miel	79
2.6 Cuantificación de defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de la miel a través de fluorescencia total	81
2.7 Cuantificación de defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de la miel a través de HPLC con detector de fluorescencia	82
2.8 Actividad antimicrobiana de la miel	84
2.9 Actividad antimicrobiana de la fracción de 3 a 10 kDa de la miel	86
2.10 Análisis de componentes principales de las variables determinadas en miel	87
CONCLUSIONES	90
REFERENCIAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localidades de la V Región en las que se hizo el muestreo de abejas y mieles.	16
Figura 2. Diseño experimental para evaluar el efecto de HO ₂ .	17
Figura 3. Secuencia de la defensina-1 de a) la hemolinfa y b) su versión recombinante.	22
Figura 4. Espectros de absorbancia (A) y curva de calibración (B) obtenidos a partir de las muestras de calibrado para la determinación de prolina libre en miel.	29
Figura 5. Espectros de absorción de las muestras de miel de la V región obtenidos para la determinación de prolina libre.	30
Figura 6. Concentración promedio de prolina libre en mieles de la V región según A: zona y B: apiarios de cada zona.	32
Figura 7. Curva de calibración obtenida a partir de las muestras de calibrado para la determinación de proteínas totales en miel.	33
Figura 8. Concentración de proteínas totales en mieles de la V región según A: zona y B: apiarios de cada zona.	35
Figura 9. Curva de calibración obtenida a partir de las muestras de calibrado para la determinación de la concentración de H ₂ O ₂ en miel.	36
Figura 10. Diagrama de dispersión de la actividad de GOX a las 3 horas de incubación en mieles de la V región según A: zona y B: apiario por zona.	39
Figura 11. Espectros de excitación (A) y de emisión (B) promedio de los 6 componentes extraídos por MCR-ALS para las muestras de miel de la V Región.	39
Figura 12. Mapa de muestras y variables del PCA aplicado sobre la concentración relativa de los componentes fluorescentes extraídos para las mieles de la V Región.	43
Figura 13. Matrices de excitación/emisión del ácido gálico y de las muestras de miel de la V Región.	44
Figura 14. Espectros de emisión (Arriba) y de excitación (Abajo) de los componentes extraídos por MCR-ALS para la cuantificación de fenoles totales.	45
Figura 15. Curva de calibración pseudo-univariada de ácido gálico para la cuantificación de los fenoles totales en las muestras de miel.	46

Figura 16. Distribución del contenido de fenoles totales en mieles de la V región según A: zona y B: apiarios de una misma zona.	48
Figura 17. Matrices de excitación/emisión de la defensina-1 recombinante y de las fracciones de 3 a 10 kDa de las muestras de miel de la V Región.	49
Figura 18. Esquema de la reacción de Maillard basada en Hodge (1953).	51
Figura 19. Espectros de emisión (arriba) y de excitación (abajo) de los componentes extraídos por MCR-ALS para la cuantificación de defensina-1.	52
Figura 20. Curva de calibración pseudo-univariada de la defensina-1 recombinante para cuantificar la defensina-1 en las fracciones de 3 a 10 kDa.	53
Figura 21. Distribución del porcentaje de defensina-1 a partir del método de calibración de orden 2 (FT/MCR-ALS) en mieles de la V región según A: zona y B: apiarios por zona.	56
Figura 22. Cromatogramas de las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles de la V Región, registrados a 280 nm de excitación y 340 nm de emisión.	57
Figura 23. Espectro de emisión de la señal cromatográfica obtenida a 4,68 minutos asociada a la defensina-1.	58
Figura 24. Distribución del porcentaje de defensina-1 a partir del método cromatográfico en mieles de la V región según A: zona y B: apiarios de la misma zona.	58
Figura 25. Curva de calibrado de orden cero de defensina-1 recombinante obtenida por cromatografía.	61
Figura 26. Distribución de la actividad antimicrobiana relativa frente a <i>P. aeruginosa</i> en mieles de la V región según A. zona y B. apiario de una misma zona.	67
Figura 27. Distribución de la actividad antimicrobiana relativa frente a <i>S. aureus</i> en mieles de la V región según A. zona y B. apiario de una misma zona.	67
Figura 28. Mapa de las muestras de miel de la V Región y las variables medidas.	71
Figura 29. Mapa de las muestras de miel de la V Región y las variables asociadas a origen geográfico.	72
Figura 30. Concentración de prolina libre en mieles de colmenas tratadas con HO21.	73
Figura 31. Concentración de proteínas totales en mieles de colmenas tratadas con HO21.	75

Figura 32. Actividad de GOX en mieles de colmenas tratadas con HO21.	76
Figura 33. Espectros de excitación (A) y de emisión (B) promedio de los 4 componentes extraídos por MCR-ALS para las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21.	77
Figura 34. Concentración relativa de compuestos fluorescentes en mieles de colmenas tratadas con HO21.	78
Figura 35. Mapa de las muestras y variables del PCA aplicado sobre la concentración relativa de los componentes fluorescentes extraídos para las mieles de colmenas tratadas con HO21.	79
Figura 36. Concentración de fenoles totales en mieles de colmenas tratadas con HO21.	80
Figura 37. Concentración de defensina-1 a través de fluorescencia total asociada a MCR-ALS en mieles de colmenas tratadas con HO21.	82
Figura 38. Concentración de defensina-1 a través de HPLC en fase reversa acoplado a un detector de fluorescencia en mieles de colmenas tratadas con HO21.	84
Figura 39. Actividad antimicrobiana relativa frente a <i>P. aeruginosa</i> de mieles obtenidas de colmenas tratadas con HO21.	86
Figura 40. Actividad antimicrobiana relativa frente a <i>S. aureus</i> de mieles obtenidas de colmenas tratadas con HO21.	86
Figura 41. Mapa de las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21 y las variables medidas.	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales factores que afectan la salud de las abejas y que podrían estar implicados en el CCD	2
Tabla 2. Grupos de muestras de la V Región	16
Tabla 3. Códigos de las muestras de miel obtenidas de colmenas tratadas con HO21	17
Tabla 4. Infección por <i>Nosema spp.</i> en abejas de colmenas de la V región	27
Tabla 5. Parámetros de calidad del calibrado de orden cero y uno obtenidos para la determinación de prolina libre en miel	29
Tabla 6. Concentración de prolina libre en las muestras de miel de la V región predichas con el calibrado de orden uno	31
Tabla 7. Parámetros de calidad del calibrado de orden cero obtenido para la determinación de proteínas totales en miel	33
Tabla 8. Concentración de proteínas totales en las muestras de miel de la V región	34
Tabla 9. Parámetros de calidad del calibrado de orden cero obtenido para la determinación de la concentración de H ₂ O ₂ en miel	36
Tabla 10. Actividad de GOX en las muestras de miel de la V Región	37
Tabla 11. Concentración relativa de los componentes fluorescentes extraídos para las mieles de la V Región	41
Tabla 12. Parámetros de calidad del calibrado de orden 2 para cuantificar fenoles totales en miel	46
Tabla 13. Contenido de fenoles totales en las muestras de miel de la V Región predicho con el calibrado de orden dos	47
Tabla 14. Parámetros de calidad del calibrado de orden 2 para cuantificar defensina-1 en las fracciones de 3 a 10 kDa de miel	53
Tabla 15. Contenido de defensina-1 en las muestras de miel de la V Región calculado a partir de la calibración de orden 2 utilizando defensina-1 recombinante	55
Tabla 16. Parámetros de calidad de la cuantificación de defensina-1 a través de HPLC	59
Tabla 17. Contenido de defensina-1 en las muestras de miel de la V Región calculado con el método cromatográfico	59

Tabla 18. Porcentajes de inhibición de mieles de prueba frente a las cepas bacterianas seleccionadas	62
Tabla 19. CIM de las mieles de prueba frente a las cepas bacterianas seleccionadas	63
Tabla 20. Porcentajes de inhibición de mieles de la V Región frente a las bacterias seleccionadas	64
Tabla 21. Actividad antimicrobiana relativa de mieles de la V Región frente a <i>P. aeruginosa</i>	65
Tabla 22. Actividad antimicrobiana relativa de mieles de la V Región frente a <i>S. aureus</i>	66
Tabla 23. Porcentaje de inhibición frente a las bacterias seleccionadas de las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles de prueba y concentración de defensina-1 determinada por FT/MCR y HPLC	68
Tabla 24. Porcentaje de inhibición frente a las bacterias seleccionadas de las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles de la V Región y concentración de defensina-1 determinada por FT/MCR y HPLC	69
Tabla 25. Concentración de prolina libre en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21	72
Tabla 26. Concentración de proteínas totales en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21	74
Tabla 27. Actividad de GOX en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21	75
Tabla 28. Concentración relativa de los compuestos fluorescentes extraídos de las mieles de colmenas tratadas con HO21	78
Tabla 29. Concentración de fenoles totales en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21	80
Tabla 30. Concentración de defensina-1 en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21 a través de fluorescencia total asociada a MCR-ALS	81
Tabla 31. Concentración de defensina-1 en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21 a través de HPLC con detector de fluorescencia	83
Tabla 32. Porcentaje de inhibición de las mieles de colmenas tratadas con HO21 frente a <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>	84

Tabla 33. Actividad antimicrobiana relativa de las mieles obtenidas de colmenas tratadas con HO21 frente a las bacterias seleccionadas 85

Tabla 34. Porcentaje de inhibición frente a las bacterias seleccionadas de las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles de colmenas tratadas con HO21 y concentración de defensina-1 determinada por FT/MCR y HPLC 87

ABREVIATURAS

% m/v	Porcentaje masa volumen
% v/v	Porcentaje volumen volumen
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
C18	Octadecilsililo
CCD	Síndrome de colapso de colonias
CIM	Concentración inhibitoria mínima
DO	Densidad óptica
EEM	Matriz de excitación-emisión
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida ligado a enzimas
g	Gramo
GOX	Glucosa oxidasa
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
kDa	KiloDalton
Kg	Kilogramo
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m	Metro
M	Molar
MCR-ALS	Resolución multivariada de curvas-mínimos cuadrados alternantes
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro

PARAFAC	Análisis de factor paralelo
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLS	Mínimos cuadrados parciales
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PMSF	Fluoruro de metilfenilsulfonilo
r	Coefficiente de correlación
rcf	Fuerza centrífuga relativa
$S_{y/x}$	Sensibilidad analítica
TFA	Ácido trifluoroacético
UV	Ultravioleta
λ	Longitud de onda

RESUMEN

La abeja melífera (*Apis mellifera*) es uno de los insectos polinizadores más importantes, ya que tiene un rol ecológico y económico al polinizar el 16% de las 260.000 especies de angiospermas y el 70% de las especies abastecedoras de alimentos. Actualmente se ha registrado una desaparición rápida de las abejas obreras de las colmenas, lo que se denomina Síndrome de Colapso de Colonias. Una de sus causas probables es el microsporidio *Nosema ceranae*, el cual a nivel individual induce estrés energético en las abejas, afectando la movilización de reservas de energía, lo que se refleja en la disminución de la prolina en la hemolinfa. Asimismo, disminuye el contenido de proteínas en las glándulas hipofaríngeas, órganos que sintetizan las enzimas que transforman el néctar y polen en miel. Este parásito también afectaría la inmunidad individual, ya que algunos trabajos indican que provoca inmunosupresión en condiciones de laboratorio, mientras que otros reportan una respuesta inmune en colmenas infectadas naturalmente. A nivel social, la colmena es capaz de responder a la infección, ya sea iniciando tempranamente las actividades de recolección de néctar y polen (forrajeo), como sustituyendo a las abejas infectadas. Sin embargo, se desconoce el efecto a nivel social de este parásito en el metabolismo y la inmunidad, los cuales se relacionan con la secreción de prolina y proteínas, así como con el péptido antimicrobiano defensina-1 y la enzima glucosa oxidasa (GOX) en los alimentos de la colmena (jalea real y miel).

Por otro lado, puesto que el funcionamiento apropiado del sistema inmune de *A. mellifera* es clave en la prevención de enfermedades, se han investigado los posibles efectos de HO21, una composición biocida basada en un extracto vegetal, sobre la respuesta inmune de colmenas de *A. mellifera*. HO21 ha mostrado aumentar la actividad de la colmena, lo que puede atribuirse a ciertos compuestos fenólicos que contiene, los cuales estimulan el sistema metabólico e inmune de las abejas. Dado que la miel contiene azúcares, proteínas, aminoácidos, compuestos fluorescentes, entre otros, que provienen tanto de las sustancias que las abejas recolectan (néctar y polen de flores cercanas a las colmenas, los cuales varían según el origen geográfico), como de las abejas mismas, y gran parte de la colonia participa en su elaboración, se la puede considerar como un componente que refleja el estado metabólico e inmunitario de la colmena que la produce. Por lo tanto, esta tesis plantea que

tanto la infección con *N. ceranae* en las abejas como la aplicación de HO21 estimularán el metabolismo y la inmunidad social, lo que provocará un aumento de marcadores químicos relevantes de la miel, como la concentración de prolina, proteínas totales, fenoles totales, defensina-1, la actividad de GOX y la actividad antimicrobiana.

Se analizaron muestras de abejas y miel de 36 colmenas de distintas zonas de la V Región. Además, se analizaron 12 muestras de miel provenientes de 2 colmenas sanas del apiario de la Universidad del Desarrollo de la Región Metropolitana, las que corresponden a muestras obtenidas antes y después de la aplicación de HO21 a estas colmenas. En relación con las muestras de abejas de la V Región, solo una colmena estaba infectada con *N. ceranae*, por lo que con este número reducido de muestras positivas para este parásito no se pudo determinar su efecto en las variables a analizar en la miel. Sin embargo, en sus muestras de miel correspondientes se evaluaron igualmente los marcadores químicos que reflejan el entorno donde se desarrolla la colmena u origen geográfico (componente externo) y las características propias de los insectos que la componen (componente interno). Se observaron diferencias significativas en el contenido de prolina libre, proteínas totales y fenoles totales entre las distintas áreas geográficas, pero no entre apiarios de una misma zona (salvo algunas excepciones), lo que demuestra el efecto de la flora circundante en la composición de la miel y que aquellos marcadores dan cuenta del componente externo. El análisis de componentes principales (PCA) corroboró esta variabilidad dada por el origen geográfico.

En contraste, si bien hubo una variabilidad apreciable en el contenido de defensina-1 y actividad de GOX en las muestras de miel de la V Región, particularmente entre distintas áreas geográficas, las diferencias no fueron significativas para este factor ni entre apiarios de una misma zona. Esto indicaría que la variación de estos marcadores estaría explicada por otros factores, entre los cuales se encontrarían factores genéticos/epigenéticos asociados a la expresión de los genes que codifican para GOX y defensina-1 en las abejas, como lo han documentado otros autores. Por lo tanto, estos marcadores estarían relacionados con el componente interno, ya que sus niveles estarían determinados por la diversidad genética de las abejas.

En el caso particular de la defensina-1, dada su masa molecular de 5,5 kDa y la presencia de un residuo de triptófano en su estructura, ésta se cuantificó en la fracción de 3 a 10 kDa de las mieles de la V Región mediante fluorescencia total asociada a MCR-ALS,

empleando una versión recombinante como patrón. El porcentaje de defensina-1, con respecto al contenido de proteínas en la miel total, estuvo comprendido entre no detectado y 4,7%. Adicionalmente, el péptido fue determinado mediante HPLC con detector de fluorescencia, obteniéndose valores entre no detectado y $7,2 \times 10^{-4}\%$. La diferencia de magnitudes de los valores de la defensina-1 entre los dos métodos se atribuye a que por HPLC se cuantificaría la forma sin modificar de este péptido, mientras que por fluorescencia total se abarcarían otros compuestos, como por ejemplo, otras formas de la defensina-1, entre las que se encontraría su versión glicada y/o fructada dado el gran contenido de glucosa y fructosa en la miel, conjetura que se está investigando.

Con relación a la actividad antimicrobiana de las muestras de miel de la V Región, el 83% de las muestras fue capaz de inhibir por completo el crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las distintas zonas geográficas ni entre apiarios de una misma zona, por lo que esta variable podría estar asociada a otros parámetros no determinados en este trabajo, como el pH y el contenido de azúcares en la miel. Por otro lado, las fracciones de 3 a 10 kDa evaluadas sólo inhibieron el crecimiento de *S. aureus*. No obstante, el contenido de defensina-1 en éstas no mostró correlación con la actividad antimicrobiana determinada, por lo que esta variable se asociaría a otros factores y no a la presencia de defensina-1 en la fracción. En este sentido, determinar la actividad antimicrobiana de la defensina-1 recombinante corroboraría esta conjetura.

Con respecto a las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21, si bien se observó un incremento de prolina libre, proteínas totales, fenoles totales y actividad de GOX, ya sea durante o después de la aplicación repetida de HO21, no se presentó una tendencia clara con los otros marcadores. Además, se observó una variabilidad significativa entre las dos colmenas empleadas en el estudio, indicando que hay factores propios de cada colmena que influyen en la respuesta frente a este estímulo. Por último, tampoco se descarta que los resultados obtenidos den cuenta del proceso de maduración propio de la miel en cada colmena. Por ello no se puede asegurar de forma concluyente que la HO21 estimule el metabolismo y/o la inmunidad social.

ABSTRACT

The honey bee (*Apis mellifera*) is one of the most important pollinating insects, since it has an ecological and economic role by pollinating 16% of the 260,000 species of angiosperms and 70% of the food supplying species. Currently there has been a rapid disappearance of the worker bees from the hives, which is called Colony Collapse Syndrome. One of its probable causes is the microsporidium *Nosema ceranae*, which at an individual level induces energy stress in bees, affecting the mobilization of energy reserves, which is reflected in the decrease of proline in the hemolymph. Also, it diminishes the content of proteins in the hypopharyngeal glands, organs that synthesize the enzymes that transform the nectar and pollen into honey. This parasite would also affect individual immunity, since some studies indicate that it causes immunosuppression in laboratory conditions, while others report an immune response in naturally infected hives. At a social level, the hive is capable of responding to infection, either by initiating early nectar and pollen activities (foraging), or by replacing infected bees. However, the effect at the social level of this parasite on metabolism and immunity, which are related to the secretion of proline and proteins, as well as the antimicrobial peptide defensin-1 and the enzyme glucose oxidase (GOX) into the food of the hive (royal jelly and honey), is unknown.

On the other hand, since the proper functioning of the immune system of *A. mellifera* is key in the prevention of diseases, the possible effects of HO21, a biocidal composition based on a plant extract, on the immune response of hives have been investigated. HO21 has been shown to increase the activity of the hive, which can be attributed to certain phenolic compounds it contains, which stimulate the metabolic and immune system of bees. Since honey contains sugars, proteins, amino acids, fluorescent compounds, among others, that come both from the substances that the bees collect (nectar and pollen from flowers near the hives, which vary according to the geographical origin), and from the bees themselves, and a large part of the colony participates in its elaboration, it can be considered as a component that reflects the metabolic and immune state of the hive that produces it. Therefore, this thesis suggests that both the infection with *N. ceranae* in bees and the application of HO21 will stimulate metabolism and social immunity, which will cause an increase in relevant chemical

markers of honey, such as the concentration of proline, total proteins, total phenols, defensin-1, GOX activity and antimicrobial activity.

Bees and honey samples from 36 beehives from different zones of the V Region were analyzed. In addition, 12 samples of honey from 2 healthy hives from the apiary of the Universidad del Desarrollo of the Metropolitan Region were analyzed, which correspond to samples obtained before and after the application of HO21 to these hives. In relation to the samples of bees of the V Region, only one hive was infected with *N. ceranae*, so with this reduced number of positive samples for this parasite, its effect on the variables to be analyzed in honey could not be determined. However, in their corresponding honey samples, chemical markers that reflect the environment where the hive or geographic origin (external component) is developed and the characteristics of the insects that compose it (internal component) were also evaluated. Significant differences were observed in the content of free proline, total proteins and total phenols between the different geographical areas, but not between apiaries of the same area (with some exceptions), which demonstrates the effect of the surrounding flora on the composition of the honey and that those markers account for the external component. Principal component analysis (PCA) corroborated this variability given by geographic origin.

In contrast, although there was an appreciable variability in the content of defensin-1 and GOX activity in honey samples from the V Region, particularly between different geographical areas, the differences were not significant for this factor or between apiaries of the same zone. This would indicate that the variation of these markers would be explained by other factors, among which would be genetic/epigenetic factors associated with the expression of genes that code for GOX and defensin-1 in bees, as documented by other authors. Therefore, these markers would be related to the internal component, since their levels would be determined by the genetic diversity of the bees.

In the particular case of defensin-1, given its molecular mass of 5.5 kDa and the presence of a tryptophan residue in its structure, it was quantified in the 3 to 10 kDa fraction of the honeys of the V Region through total fluorescence associated to MCR-ALS, using a recombinant version as standard. The percentage of defensin-1, with respect to the protein content in total honey, ranged between undetected and 4.7%. Additionally, the peptide was determined by HPLC with fluorescence detector, obtaining values between not detected and

$7.2 \times 10^{-4}\%$. The difference in magnitudes of the values of defensin-1 between the two methods is attributed to the fact that by HPLC the unmodified form of this peptide would be quantified, while by total fluorescence other compounds would be included, such as, for example, other forms of defensin-1, among which would be its glycated and/or fructated version given the high content of glucose and fructose in honey, conjecture that is being investigated.

Regarding the antimicrobial activity of honey samples from the V Region, 83% of the samples were able to completely inhibit the growth of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. However, no significant differences were observed between the different geographical areas or between apiaries of the same area, so this variable could be associated with other parameters not determined in this work, such as honey pH and sugar content. On the other hand, the evaluated fractions of 3 to 10 kDa only inhibited the growth of *S. aureus*. Nevertheless, the content of defensin-1 in these showed no correlation with the determined antimicrobial activity, so this variable would be associated with other factors and not with the presence of defensin-1 in the fraction. In this sense, determining the antimicrobial activity of recombinant defensin-1 would corroborate this conjecture.

With respect to honey samples from beehives treated with HO21, although there was an increase in free proline, total proteins, total phenols and GOX activity with the repeated application of HO21 and after a certain time of maturation of honey, there was no clear trend with the other markers. In addition, significant variability was observed between the two hives used in the study, indicating that there are factors specific to each hive that influence the response to this stimulus. Finally, it is not ruled out that the obtained results account for the own maturation process of honey in each hive. Therefore, it cannot be conclusively confirmed that HO21 stimulates metabolism and/or social immunity.

INTRODUCCIÓN

1. Importancia ecológica y económica de las abejas melíferas

Más del 88% de las 260.000 especies de angiospermas (plantas con flores) dependen de animales para la polinización (Ollerton, 2011). A su vez, aproximadamente 300.000 especies animales visitan las flores por el polen y el néctar como recompensa (Kearns, 1998). Puesto que a los animales se les adhiere el polen cuando visitan una flor, éste es transferido cuando se posan en otra flor (Eardley y cols., 2006). Además del papel crítico de este mutualismo entre angiospermas y polinizadores para el mantenimiento de la biodiversidad, la polinización mediada por animales también proporciona un servicio ecosistémico clave a la sociedad, ya que el 70% de las especies de cultivos en todo el mundo depende, al menos parcialmente, de la polinización animal (Klein, 2007).

La mayoría de los polinizadores animales son insectos (Eardley y cols., 2006). De estos, las abejas polinizan el 16% de las especies de angiospermas y el 70% de las especies de plantas suministradoras de alimentos, siendo los polinizadores principales del 48% de éstas (Thakur, 2012). La abeja doméstica productora de miel, principalmente la especie *Apis mellifera*, es el polinizador más valioso para los monocultivos alrededor del mundo y es usualmente la única solución para que los granjeros puedan asegurar la polinización de sus cultivos cuando las abejas silvestres no los visitan (Klein, 2007).

En Chile existen alrededor de 10.000 explotaciones apícolas (apiarios), las cuales generan distintos productos. El 90% de la producción de miel es exportada, siendo el principal producto pecuario primario exportado por Chile. Otras materias primas apícolas corresponden a propóleos, cera y material biológico, así como la prestación de servicios de polinización (Consortio de Desarrollo Tecnológico Apícola, 2014).

2. Síndrome del Colapso de Colonias de abejas

Durante el invierno del 2006 se registraron pérdidas a gran escala de colonias de *A. mellifera* en los Estados Unidos. Estas pérdidas fueron seguidas de informes similares en Europa (1,8%-53%), Medio Oriente (10-85%) y Japón (25%) (Neumann y Carreck, 2010).

Cabe mencionar que las pérdidas en el rango del 20 al 30% son bastante comunes e incluso se han contabilizado localmente tasas mucho más altas (vanEngelsdorp y cols., 2009 y 2012). Sin embargo, durante las pérdidas del 2006 en los Estados Unidos las colonias muertas y moribundas presentaron el siguiente conjunto de síntomas no consignados anteriormente: 1) la pérdida rápida de abejas obreras adultas, puesto que había colonias con un exceso de crías, 2) la ausencia de abejas muertas dentro y alrededor de las colmenas afectadas y 3) la invasión tardía de plagas de colmenas y cleptoparasitismo de colonias de abejas vecinas (Cox-Foster y cols., 2007). Posteriormente, este conjunto de síntomas se denominó Síndrome del Colapso de Colonias de abejas o CCD por sus siglas en inglés (vanEngelsdorp y cols., 2009). La hipótesis del CCD postula que la disminución de las colonias de abejas melíferas y su eventual colapso pueden ser inducidas por una variedad de factores de estrés, mostrando frecuentemente interacciones sinérgicas (Nazzi y Pennacchio, 2014 y Goulson y cols., 2015), los cuales se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales factores que afectan la salud de las abejas y que podrían estar implicados en el CCD

Factor	Detalles	Impacto en las abejas melíferas
Virus de Alas Deformadas (DWV; Picornavirales, Iflaviridae)	Virus de ARN de cadena sencilla	Reduce la supervivencia de las abejas
<i>Varroa destructor</i> (Acari, Varroidae)	Parásito succionador de hemolinfa	Causa daño directo, vectorizando/activando virus de las abejas
<i>Nosema ceranae</i> (Microsporidia, Nosematidae)	Parásito unicelular formador de esporas	Infecta el intestino medio de las abejas adultas
Agroquímicos	Varios plaguicidas incluyendo neonicotinoides y acaricidas	Inducen efectos letales y subletales que pueden afectar la tolerancia y la susceptibilidad a enfermedades
Fragmentación y deterioro del paisaje	Pérdida de vegetación espontánea y difusión de monocultivos	Afectan el suministro adecuado y continuo de fuentes alimentarias, lo que compromete la inmunidad

Modificado de Nazzi y Pennacchio, 2014 y Goulson y cols., 2015.

En Chile aún no se tiene un catastro detallado respecto a este fenómeno, pero sí se ha reportado que las abejas melíferas se ven expuestas a una amplia gama de insecticidas usados en frutales, hortalizas y cultivos. Por otro lado, se han registrado plagas emergentes de parásitos como *Varroa destructor* y *Nosema spp.* (Estay, 2013), así como la presencia de enfermedades causadas por virus (Rodríguez y cols., 2013; Barriga y cols., 2012). En Chile, la nosemosis había sido descrita como una enfermedad endémica causada por *N. apis* (también endémica de Sudamérica) en la VI Región (Hinojosa y González, 2004) y en la XV región (Huaiquil y cols., 2009). Sin embargo, un estudio en la VIII Región determinó que el 49% de las muestras fueron positivas para *N. ceranae*, mientras que no se pudo detectar *N. apis*, lo que sugiere que *N. ceranae* es un patógeno emergente que lo ha ido desplazando (Martínez y cols., 2012).

3. Efecto de *Nosema ceranae* sobre el metabolismo e inmunidad de las abejas melíferas

Los parásitos modifican el metabolismo y el sistema inmunológico del hospedero para facilitar su desarrollo y reproducción (Bruchhaus y cols., 2007), siendo particularmente evidente en los microsporidios, un grupo diverso de parásitos intracelulares obligados que pertenece al reino Fungi (Keeling, 2009). *Nosema ceranae* es un microsporidio que infectaba a la *Apis cerana*, pero recientemente se ha encontrado que infecta a *A. mellifera* y otras especies de abejas en todo el mundo (Higes y cols., 2013, Kurze y cols., 2016b). *N. ceranae* se transmite principalmente a través de la vía fecal-oral e invade las células epiteliales del intestino medio de abejas adultas (Fries, 2010), provocando desnutrición y acortando la vida de las abejas (Calderón y cols., 2008). Se ha informado que a nivel individual, es decir, en la abeja, *N. ceranae* induce otras modificaciones, tales como disminución de las habilidades de localización (Dussaubat y cols., 2013, Kralj y Fuchs, 2010, Wolf y cols., 2014), inmunosupresión (Antúnez y cols., 2009; Aufauvre y cols., 2014, Chaimanee y cols., 2012, Holt y cols., 2013) y estrés energético (Kurze y cols., 2016a, Mayack y Naug, 2009). A nivel de la colonia disminuye la población de abejas adultas y la producción de miel (Botías y cols., 2013). El gran inconveniente de este patógeno es que es altamente contagioso, por lo que se distribuye globalmente (Eiri y cols., 2015) y su diagnóstico es tardío, ya que la colmena no presenta síntomas aparentes hasta su colapso (Ivgin Tunca y cols., 2016).

Con respecto al efecto de *N. ceranae* en el estado metabólico de las abejas, Aliferis y cols., 2012, demostraron que afecta los mecanismos que controlan la movilización de reservas de energía, lo que se reflejó en una disminución de la mayoría de los carbohidratos y aminoácidos en la hemolinfa, como la fructosa y la L-prolina, los que están implicados en diversas rutas bioquímicas. L-prolina es el aminoácido más abundante de la hemolinfa, ya que se utiliza como fuente de energía para el vuelo de las forrajeras en la fase de elevación (Auerswald y cols., 1998, Candy y cols., 1997, Micheu y cols., 2000). Este parásito también disminuye el contenido de proteínas en las glándulas hipofaríngeas de las abejas (Jack y cols., 2016), ya que interrumpe la digestión y el metabolismo proteico (Vidau y cols., 2014). En las abejas melíferas, las glándulas hipofaríngeas secretan los componentes principales de la jalea real y la comida de las larvas (Patel y cols., 1960). También sintetizan las enzimas implicadas en la producción de miel (White y cols., 1963a, Ohasi y cols., 1999)

La inmunidad de los insectos sociales como las abejas puede clasificarse en individual y social. En la primera, la abeja es la principal beneficiaria, ya que las respuestas inmunes son internas. Ejemplos de estos mecanismos son la producción de péptidos antimicrobianos y enzimas que atacan a los microorganismos, conocida como inmunidad humoral. Por otro lado, las células sanguíneas (hemocitos) eliminan parásitos de mayor tamaño, lo que corresponde a la inmunidad celular (Cotter y Kilner, 2010). La inmunidad social comprende, por una parte, comportamientos individuales de los miembros para reducir la transmisión de enfermedades a nivel de la colonia (Cremer y cols., 2007; Simone-Finstrom y Spivak, 2010; Starks y cols., 2000) y, por otra, la adición de componentes antimicrobianos, como el péptido defensina-1 y la glucosa oxidasa (GOX), provenientes de las glándulas hipofaríngeas, a los alimentos de la colmena como la miel y la jalea real, lo que contribuye a su esterilización y, por lo tanto, a la prevención de enfermedades (Couquet y cols., 2013).

La inmunidad innata de los insectos constituye una estrategia de defensa conservada evolutiva que proporciona respuestas inmediatas contra los patógenos invasores. Consiste en tres niveles de resistencia: las barreras físicas como primera línea de defensa, la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral sin células, una red compleja de vías de señalización intracelular que conducen a la activación de una variedad de factores humorales. Entre ellos, los péptidos antimicrobianos se reconocen como componentes clave de la inmunidad humoral en muchos tipos de organismos, los cuales tienen dos mecanismos de

acción: a) la rotura en las membranas procariotas y b) la inhibición de la traducción de las proteínas o de su plegamiento en las bacterias (Daníhlík y cols., 2015). Recientemente, cuatro familias de péptidos antimicrobianos (apidaecinas, abaecinas, himenoptaecinas y defensinas) se han descrito en la hemolinfa de las abejas melíferas. Particularmente, la defensina-1 contiene 51 aminoácidos y 6 residuos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro. En *A. mellifera* se presenta con 3 isoformas: defensina-1 de la hemolinfa y las encontradas en jalea real, denominadas royalisina-F (Fujiwara y cols., 1990) y royalisina-K, similares a la defensina-1, pero con modificaciones: la primera tiene una sustitución de arginina por tirosina en la posición 50 del extremo carboxilo (Casteels, 1998; Casteels-Josson y cols., 1994) y la segunda presenta una inversión en un par de aminoácidos (Klaudiny y cols., 2005). Otros autores han informado la presencia de defensina-1 en miel sin detallar la isoforma (Klaudiny y cols., 2005 y 2012, Kwakman y cols., 2010, Valachová y cols., 2016).

En cuanto a los efectos de *N. ceranae* en la inmunidad individual, Badaoui y cols., 2017 reportaron que en condiciones de laboratorio la expresión de la mayoría de los péptidos antimicrobianos en abejas, entre ellos la defensina-1, disminuyó significativamente a los 5 días después de la infección. Sin embargo, en colmenas infectadas naturalmente la expresión de péptidos antimicrobianos se ve aumentada (Li y cols., 2017). Por otro lado, Alaux y cols., 2010a midieron la actividad de GOX en las glándulas hipofaríngeas, la cual disminuyó significativamente en abejas infectadas con *N. ceranae* a las que se les administró el insecticida imidacloprid. GOX cataliza la oxidación de b-D-glucosa en ácido D-glucónico utilizando oxígeno molecular, lo que también genera H₂O₂, el cual tiene propiedades antisépticas (Kwakman y cols., 2010, Couquet y cols., 2013).

En general, se considera que a nivel individual las abejas toleran a *N. ceranae*, es decir, limitan el daño causado por una carga dada del parásito, mientras que a nivel social la colmena lo resiste limitando la carga del parásito. Se sabe que esta resistencia se basa en ciertos comportamientos, como la sustitución de obreras de mayor edad gracias al rápido crecimiento de la colonia en la primavera, época en la que aumenta la prevalencia de la enfermedad, y el envejecimiento acelerado de las abejas infectadas, las que al volverse forrajeras antes no vuelven a la colmena (Kurze y cols., 2016b). Sin embargo, se desconoce si este parásito afecta el metabolismo y la inmunidad social.

4. Estudio de la miel como reflejo del estado metabólico e inmunológico de la colmena

La miel es producida por las abejas a partir del néctar, la cual es una solución acuosa de azúcares, aminoácidos, compuestos fenólicos, proteínas, vitaminas, etc., cuya composición varía dependiendo de las especies vegetales y las condiciones ambientales (Ball, 2007). Cuando las abejas forrajeras se posan en una planta succionan el néctar, el cual es almacenado en su saco de miel, en donde es enriquecido con enzimas provenientes de las glándulas hipofaríngeas y salivares que lo modifican. También recolectan polen, sustancia que corresponde a aproximadamente a 1/3 de la proteína total de la miel (Nazarian y cols, 2010). Una vez que las forrajeras vuelven a la colmena, el contenido del saco de miel se da a las abejas obreras que la depositan en las celdas del panal (Belitz, 2009). La maduración del néctar en la miel consiste en la conversión de la sacarosa en glucosa y fructosa y la evaporación del exceso de agua. Durante el periodo activo de forrajeo y reproducción aproximadamente el 25 al 30% de la población potencialmente trabaja como abeja forrajera (Van der Steen, 2015), por lo que la miel se considera como un producto que refleja el estado de la colmena, ya que gran parte de su población participa en su producción.

Las abejas también añaden distintas sustancias a la miel, como la prolina, enzimas como la invertasa, la diastasa y la GOX, las cuales actúan sobre los azúcares provenientes del néctar, y el péptido antimicrobiano defensina-1 (Afroz y cols., 2016). La composición de la miel también depende las especies de abejas y el área geográfica. Su producción también se ve afectada por las condiciones meteorológicas (vanEngelsdorp y Meixner, 2010, Switanek y cols., 2017), la disponibilidad de recursos adecuados de forrajeo (Naug, 2009) y la fuerza de las colonias (es decir, la producción de crías, el tamaño de la población de abejas adultas y la productividad individual de las abejas obreras) (Woyke, 1984). Se desconoce si las enfermedades de las abejas alteran la composición de la miel, por lo que cobra importancia determinar estos posibles cambios, ya que podrían dar cuenta de las modificaciones que generan en el estado inmunitario y metabólico de la colmena, así como en ciertas características relevantes de la miel, como su actividad antimicrobiana.

Desde la Antigüedad, la miel ha sido reconocida por sus propiedades antimicrobianas y, actualmente, se ha descrito que esta característica depende tanto de las sustancias que las abejas le añaden a la miel, como los componentes bioactivos presentes en las plantas de las

que las abejas obtienen el néctar y polen (Álvarez-Suárez y cols., 2012, Gidamis y cols., 2004, Yaniv y Rudich, 1997). En particular, esta propiedad se debe a: a) su gran osmolaridad, dada por su gran contenido de azúcares, b) su pH ácido, c) la GOX, ya que el peróxido de hidrógeno que genera es capaz de interactuar con las señales proliferativas de las células bacterianas, y por lo tanto disminuye el crecimiento bacteriano incluso a altas diluciones de la miel (Brudzynski, 2006), d) la defensina-1 y e) compuestos de origen vegetal con actividad antimicrobiana, como el timol y metilglioxal (Couquet y cols., 2013).

5. Efecto de una composición biocida basada en un extracto vegetal sobre el sistema inmune de *Apis mellifera*

El uso de fórmulas de hierbas ha aumentado en los últimos años en la medicina veterinaria. Debido a que contienen una variedad de sustancias biológicamente activas, muestran actividades farmacológicas multifacéticas y, al mismo tiempo, producen menos efectos secundarios que los medicamentos químicos (Pohorecka, 2004). Hasta ahora se han encontrado unas 30 especies de plantas con propiedades inmunoestimulantes (Grela y cols., 1998), las que se basan en sus propiedades vigorizantes, regenerativas y de mejora del metabolismo (Pohorecka, 2004).

En Chile, la Dra. Jessica Martínez ha desarrollado una composición biocida (HO21) que se encuentra bajo solicitud de patente, basada en un extracto vegetal rico en compuestos fenólicos. Investigaciones desarrolladas en su laboratorio han demostrado que el consumo de alimento que contiene HO21 es inocuo para las larvas y abejas adultas. Además, se ha observado en estudios de campo que es capaz de fortalecer las colmenas sanas, lo que se evidencia en un aumento de la población de abejas y en una mejor actividad productiva. Una posible explicación a este hecho es que HO21 esté reforzando el sistema inmune y/o mejorando el estado metabólico en las abejas. Hasta ahora los resultados obtenidos a nivel de laboratorio avalan el hecho de que HO21 favorece la expresión de genes de inmunidad humoral (datos no publicados). Además, existen antecedentes de que ciertos compuestos fenólicos, como la quercetina y el ácido p-cumárico, también presentes en la composición de HO21, son capaces de aumentar la longevidad de las abejas y aumentar la expresión de genes asociados a la inmunidad, entre los que se encuentran aquellos que codifican para los péptidos

antimicrobianos abaecina y defensina-1, y a la detoxificación de xenobióticos, como por ejemplo, ciertos pesticidas piretroides, como el bifentrin y la β -ciflutrina (Mao y cols., 2013 y Liao y cols., 2017).

La administración de extractos vegetales conlleva otros beneficios, como, por ejemplo, el mejoramiento de las propiedades de la miel (Yaniv y Rudich, 1997; Rosenbalt y cols., 1997; Jamróz y cols., 2014). Esto se debe a que los compuestos biológicamente activos de los extractos, como los ácidos fenólicos y flavonoides (Socha y cols., 2009), afectan la composición de la miel, ya sea por su acumulación en esta matriz y/o por los efectos que pudiesen generar a nivel de la expresión de genes asociados a la producción de miel en las abejas. De acuerdo con esto, es posible que la miel de colmenas tratadas con HO21 tenga un contenido de fenoles, proteínas, prolina y defensina-1, así como una actividad de GOX y actividad antimicrobiana mayor a la de la miel obtenida de colonias no expuestas a esta composición biocida. De ser así, cobra importancia determinar si las posibles modificaciones que genera HO21 se mantienen luego de su administración, como lo indican aquellas guías en las que se estudia la distribución de las sustancias aplicadas hacia los productos de las colmenas tratadas, como la miel, la jalea real, etc. (Fussell y cols., 2012, VICH GL49, 2015).

6. Herramientas analíticas para caracterizar marcadores de estado metabólico e inmunidad social en la miel

La composición de la miel podría dar cuenta del estado metabólico e inmunitario de la colmena de la que proviene, en donde uno de los parámetros indicativos del estado metabólico de las abejas es la cantidad de prolina que contiene, la que proviene del néctar recolectado y de las abejas (von der Ohe y cols., 1991) y representa entre el 50 al 85% del contenido de aminoácidos de la miel (Belitz, 2009). Esta sustancia puede cuantificarse a través del método analítico de Ough, 1969. La cantidad de proteínas en la miel también es un parámetro indicativo del estado metabólico de la colmena, ya que las abejas añaden 2/3 del contenido total de proteínas a la miel (Nazarian y cols, 2010), y pueden cuantificarse a través del método de Bradford (Bradford, 1976). Estas cuantificaciones se pueden realizar usando modelos de orden cero, los que relacionan la concentración del analito con único valor de absorbancia, o de primer orden, que usan la información espectral del analito, lo que

permite aumentar la selectividad y disminuir los límites de detección. Un ejemplo de estos modelos es la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS regression por sus iniciales en inglés).

Los compuestos de origen botánico en la miel pueden ser evaluados mediante espectroscopía de fluorescencia, siendo una de las técnicas más versátiles, ya que tiene una alta sensibilidad y especificidad, una preparación mínima de la muestra y bajos costos de uso (Christensen y cols., 2006). Además de los compuestos fenólicos, la miel contiene otros compuestos fluorescentes que podrían ser evaluados mediante esta técnica, incluyendo los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina (Bouseta y cols., 1996), vitaminas (particularmente riboflavina) (Rodríguez-Delgado y cols., 2001, Tomás-Barberán y cols., 2001), así como productos de la reacción de Maillard, que se generan cuando reacciona un azúcar reductor (cetosa o aldosa) y un grupo amino libre. También se ha demostrado que es posible determinar el origen geográfico de la miel mediante espectroscopía de fluorescencia (Ruoff y cols., 2006). Para ello se ha propuesto obtener espectros de emisión de la miel a diferentes longitudes de onda de excitación, obteniéndose una matriz de excitación-emisión bidimensional (EEM por sus siglas en inglés), la que representa una huella digital única de la muestra. Posteriormente esta EEM se analiza mediante el método multidireccional de análisis paralelo de factores (PARAFAC) para determinar el número de fluoróforos, extraer sus espectros de excitación y emisión puros, y determinar la concentración relativa de cada compuesto fluorescente en la muestra, información finalmente usada para construir modelos de clasificación de las muestras (Lenhardt y cols., 2015).

En cuanto al análisis de marcadores de inmunidad social en la miel, en la literatura se han descrito métodos inmunológicos para cuantificar GOX y defensina-1 (Bučeková y cols., 2014 y Valachová y cols., 2016). Si bien existen métodos químicos para cuantificar la actividad de GOX, los cuales se basan en determinar la concentración del peróxido de hidrógeno acumulado por la enzima (White y cols., 1963b y Kwakman y cols., 2010), no los hay para determinar la concentración de defensina-1 en la miel. Como alternativa se ha propuesto aislar el péptido desde la miel mediante ultrafiltración (dado su tamaño de 5,5 kDa) y posteriormente analizarlo mediante fluorescencia total (dada la presencia de triptófano en su composición) asociada a Resolución Multivariada de Curvas con mínimos cuadrados alternantes (MCR-ALS por sus siglas en inglés) (Sanhueza, 2016). Ello permitió establecer

la presencia de triptófano en la miel ultrafiltrada, inicialmente asociada a la existencia de defensina-1 en ésta. Cabe señalar que MCR-ALS es un método de análisis de información multidireccional cuyo modelo se escribe de la siguiente forma: $D=CS^T$, donde D es el conjunto de datos brutos, en este caso las EEM de las muestras, C los espectros de excitación puros de los compuestos fluorescentes presentes en estas y S^T los espectros de emisión puros de los mismos. Para mejorar la interpretación de los perfiles se utilizan restricciones que responden a sus propiedades fisicoquímicas, como la no negatividad aplicada a espectros, ya que éstos no presentan valores negativos (de Juan y cols., 2014).

Otra alternativa para el análisis de péptidos como la defensina-1 es aislarla desde la fracción de miel que la contiene a través de un método de separación, como por ejemplo HPLC, acoplado a un detector de fluorescencia capaz de entregar un espectro de emisión por cada señal cromatográfica, permitiendo su identificación a partir de su tiempo de retención y sus máximos de fluorescencia (Timperman y cols., 1995), lo que mejora la selectividad de la cuantificación. Por último, la actividad antimicrobiana de la miel es una variable importante para determinar, ya que da cuenta de la capacidad del conjunto de sustancias que esta contiene para inhibir el crecimiento de bacterias de interés clínico, lo que se determina según lo descrito por Sherlock y cols., 2010.

HIPÓTESIS

La concentración de prolina libre, proteínas totales, fenoles totales, defensina-1, la actividad de glucosa oxidasa y la actividad antimicrobiana de la miel reflejan el estado metabólico e inmunitario de la colmena que la produjo. En consecuencia, estas variables aumentan en la miel obtenida desde colonias infectadas por *Nosema ceranae* o de colonias sanas tratadas con una composición biocida basada en un extracto vegetal (HO21).

OBJETIVOS

Objetivo General

Relacionar la concentración de prolina libre, proteínas totales, fenoles totales, defensina-1, la actividad de glucosa oxidasa y la actividad antimicrobiana de miel de *Apis mellifera* con la presencia de *Nosema ceranae* en abejas o con la aplicación de HO21 en colmenas sanas.

Objetivos Específicos

1. Determinar la presencia de *Nosema ceranae* en abejas de la V región.
2. Caracterizar las muestras de mieles de la V región en términos de la concentración de prolina libre, proteínas totales, fenoles totales y otros compuestos fluorescentes, así como de la actividad de GOX.
3. Cuantificar defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de las muestras de miel de la V Región.
4. Determinar la actividad antimicrobiana de las muestras de miel de la V región y de sus fracciones de 3 a 10 kDa.
5. Evaluar el efecto de la aplicación de HO21 en las variables relacionadas con la inmunidad y metabolismo sociales en la miel de colonias sanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

1. Insumos

Asas plásticas de siembra

Capilares LightCycler® de 20 μ L, Roche

Frascos de polipropileno de 100 mL

Gasa

Papel filtro 5B, Advantec

Placas de cultivo celular de 96 pocillos y fondo plano de poliestireno, Nest

Placas Petri de poliestireno, Nest

Potes de polipropileno de 260 mL, Haddad

Puntas de propileno de micropipeta de 1- 10, 20-200 y 100-1000 μ L

Tubos con filtro de centrifugación Amicon® Ultra-15 de 3 y 10 kDa, Merck

Tubos con tapa rosca de polipropileno de 50 mL

Tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca

Tubos de ensayo de vidrio de 5 mL

Tubos de poliestireno de 5 mL

Tubos *ependorf* de polipropileno de 1,5 y 2 mL

Viales de vidrio ámbar, tapa rosca y contratapa de teflón de 20 mL

Viales de vidrio de 150 μ L

2. Reactivos

2-propanol 99,9%, Merck

4-Ditiodipiridina 98%, Sigma-Aldrich

Ácido acético 99,8%, Merck

Ácido clorhídrico 37% m/v, Merck

Ácido fórmico 98%, Merck

Ácido orto-fosfórico 85%, Merck

Ácido trifluoroacético para síntesis, Merck

Agar, Becton Dickinson
Albúmina de suero bovino, Merck
Borohidruro de sodio 96%, Merck
Cisteína 97%, Sigma-Aldrich
Cloruro de sodio para análisis, Merck
Coomassie® Azul brillante G 250, Merck
Defensina-1 recombinante, sintetizada en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.
Etanol 95%, Merck
Extracto de levadura, Becton Dickinson
Fluoruro de metilfenilsulfonilo, Sigma-Aldrich
Fosfato mono ácido de sodio 99,5%, Merck
Hidróxido de sodio 99%, Merck.
LightCycler® DNA Master SYBR Green I, Roche
Mono metil éter etilenglicol 99,5%, Merck
Ninhidrina, apto para detección de aminoácidos, Sigma-Aldrich
Orto-dianisina 95%, Sigma-Aldrich
Partidores, IDT
Peroxidasa ~150 U/mg, Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrógeno 30% v/v, Merck
Prolina 99%, Merck
Tryptona, Becton Dickinson
UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit, Mo Bio Laboratories, Inc.

3. Solventes

Acetonitrilo para cromatografía líquida $\geq 99,9\%$, Merck
Agua estéril
Agua ultrapura

4. Instrumentos

Celda de cuarzo de 3 mL con paso óptico de 1 cm para espectroscopía de fluorescencia

Celda de cuarzo de 3 mL con paso óptico de 1 cm para espectroscopía ultravioleta-visible

Celda de cuarzo de 760 μ L con paso óptico de 0,5 cm para espectroscopía de fluorescencia

Hemocitómetro Neubauer mejorado de 0,1 mm de profundidad

Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A

Micropipetas de 1-10, 20-100 y 100-1000 μ L

5. Equipos

Balanza modelo 4000C (\pm 0,00001 g), Precisa

Balanza modelo 405M-200AS (\pm 0,001 g), Precisa

Balanza modelo AQT 250 (\pm 0,1g), Adam Equipment

Baños ultrasónicos ISOLAB y Transsonic Digital, Elma

Calentador en bloque modelo SBD120-2, Select Bioproducts

Centrífuga modelo LabofugeTM, HeraeusTM

Centrífuga modelo Universal 32 R, Hettich

Densitómetro modelo DensiCHEKTM Plus, Biomérieux

Espectrofotómetro UV-Vis modelo Cary 8454, Agilent Technologies, equipado con lámpara de tungsteno y deuterio y detector de arreglo de diodos

Espectrómetro de fluorescencia modelo Cary-Eclipse, Varian, equipado con dos monocromadores Czerny-Turner y una lámpara de destello de xenón

Incubador modelo IN55, Memmert

Lector de microplacas modelo Sunrise Remote ST / Genalyser, Tecan

Mezclador vortex modelo LP, Thermo Scientific

Mezclador vortex modelo MX-S, Scilogex

Microcentrífuga modelo Z216MK, Hermle

Microcentrífuga PrismTM modelo C2500-230V, Labnet

Microscopio óptico modelo DM2000, Leica

pHmetro modelo pH 1100, Oakton

Sistema de HPLC Waters 600, Waters, equipado con detector de fluorescencia Waters 2475 Multi λ , bomba de solvente Waters 600E, controlador Waters 600, automuestreador Waters 717plus y el software Empower.

Termociclador para PCR en tiempo real modelo LightCycler 1.5, Roche

6. Software

GraphPad Prism v7.04, GraphPad Software, Inc.

MATLAB v7.6.0.324 (R2008a), The MathWorks, Inc.

STATGRAPHICS Centurion XVI v16.1.03, Stat Point Technologies, Inc.

The Unscrambler v9.7, CAMO software AS.

Métodos

1. Muestras de miel y abejas

En noviembre del 2016 se obtuvieron muestras de miel y abejas de colmenas de distintos apiarios de la V región, específicamente de Con-Con, Quintero, Quillota, Catemu, Panquehue y Casablanca. Se tomaron 36 muestras en total, cada una proveniente de 3 colmenas de 12 apiarios distintos. En la Figura 1 se muestra la ubicación de las localidades en las que se hizo el muestreo y en la Tabla 2 cómo se agruparon tales muestras. Por otro lado, entre diciembre del 2017 y enero del 2018 se obtuvieron 12 muestras de miel provenientes de 2 colmenas sanas del apiario experimental de la Universidad del Desarrollo, las cuales fueron tratadas con 3 dosis de 50 mL de una solución de 5 g/L de HO21 administradas mediante asperjado. En la Figura 2 se detalla el diseño experimental de este estudio y en la Tabla 3 el código de las muestras obtenidas. Las muestras de miel fueron congeladas a -20°C hasta su análisis, mientras que las muestras de abejas se almacenaron a 4°C en etanol al 70%.

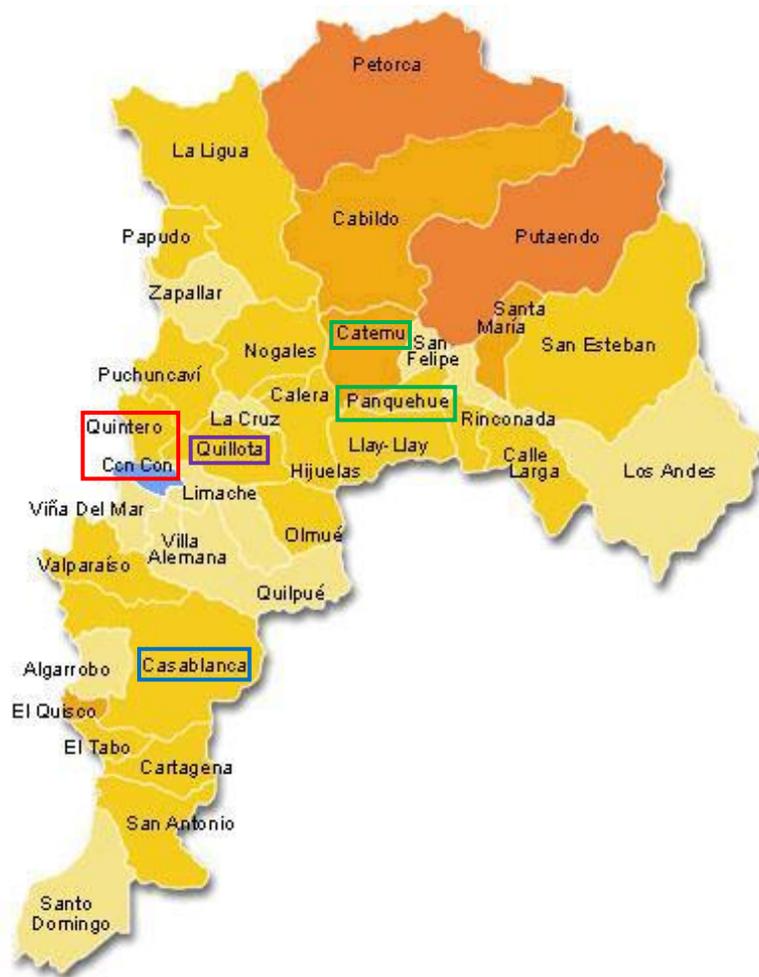


Figura 1. Localidades de la V Región en las que se hizo el muestreo de abejas y mieles.

Tabla 2. Grupos de muestras de la V Región

Grupo	Localidad y número de apiarios muestreados
CB	Casablanca: 3
CP	Catemu: 2 / Panquehue: 1
CQ	Concón: 2 / Quintero: 1
Q	Quillota: 3
36 muestras en total, 3 por los 12 apiarios muestreados	

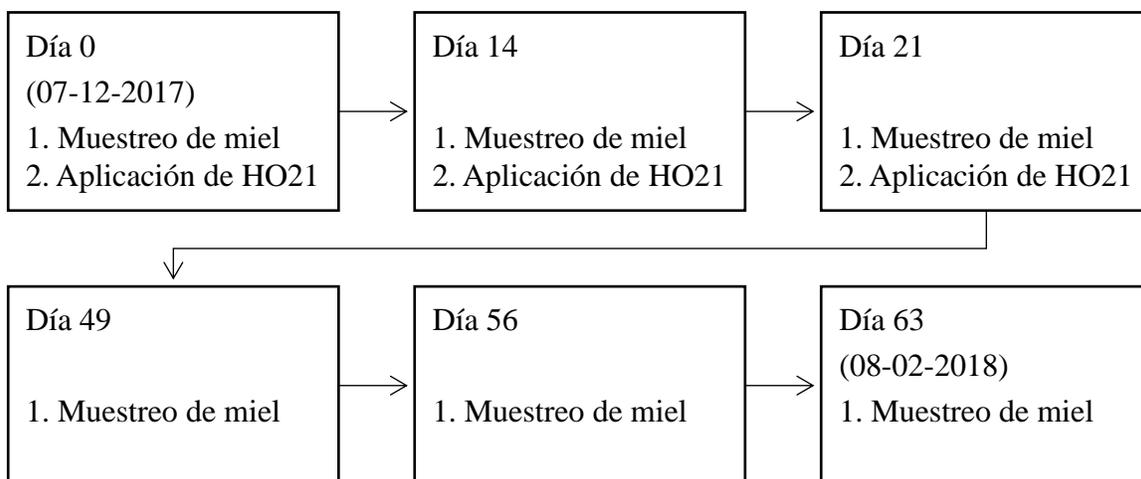


Figura 2. Diseño experimental para evaluar el efecto de HO21.

Tabla 3. Códigos de las muestras de miel obtenidas de colmenas tratadas con HO21

Día	Colmena 2	Colmena 4
0	C2A	C4A
14	C2B	C4B
21	C2C	C4C
49	C2D	C4D
56	C2E	C2E
63	C2F	C2F

2. Detección de *Nosema ceranae* en abejas

Para cuantificar las esporas de *Nosema spp.* se removieron quirúrgicamente los abdómenes de 10 abejas obreras y se trituraron en 5 mL de agua estéril, cuyo homogenizado fue filtrado por 2 capas de gasa. Las esporas presentes en el homogenizado se analizaron bajo microscopio óptico y se contaron usando un hemocitómetro. Para aislar el ADN de las esporas de *Nosema spp.* se utilizó el kit UltraClean Soil DNA. El ADN genómico se eluyó con 40 μ L de tampón de elución y se almacenó a -20°C . Para detectar *N. apis* y *N. ceranae* se realizó una PCR en tiempo real en el equipo LightCycler® 1.5, con un volumen final de 10 μ L que contuvo 1 μ L de ADN, 0,5 μ M de partidores, 1,6 mM MgCl_2 y 1X de SYBR Green Mastermix del kit LightCycler® DNA Master SYBR Green I. Para amplificar el gen que codifica para el rARN 16S de *N. apis* y *N. ceranae*, los partidores utilizados fueron APIS-F/APIS-R y MITOC-F/MITOC-R, respectivamente, de acuerdo con Martínez y cols., 2012. El programa de amplificación fue: un ciclo a 95°C durante 10 min, 40 ciclos a 95°C durante

10 s, a 60°C durante 10 s y a 72°C durante 9 s y un ciclo de análisis de la temperatura de fusión: 0,1°C/s hasta 95°C. La temperatura de fusión del amplicón se determinó usando el software LightCycler versión 3.5. El control negativo correspondió a una reacción sin ADN molde. El control positivo correspondió a la reacción con el plásmido pJNA-2 que contiene el gen del rARN 16S de *N. apis* y el plásmido pNCH-1 que contiene el mismo gen para *N. ceranae*.

3. Cuantificación de prolina libre en miel

Se utilizó el método de Ough (Ough, 1969). Se preparó una solución de prolina de 1000 mg/L, a partir de la cual se obtuvieron soluciones de 10 a 70 mg/L en agua ultrapura para la curva de calibración. Por otra parte, se prepararon disoluciones de miel de concentración 5% m/v en agua ultrapura, las que fueron filtradas con papel filtro. En un tubo de ensayo con tapa rosca se agregaron 0,5 mL de solución estándar de prolina o solución de miel 5% m/v, 0,25 mL de ácido fórmico y 0,5 mL de ninhidrina al 3% m/v en mono metil éter etilenglicol. Los tubos se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos y luego se enfriaron rápidamente con 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 análoga que no fue sometida a calentamiento. 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 600 nm), los cuales fueron utilizados para construir un modelo de calibración multivariado mediante PLS (mínimos cuadrados parciales) y para analizar las muestras.

4. Cuantificación de proteínas totales en miel

Se utilizó el método de Bradford siguiendo los pasos descritos (Bradford, 1976). Se preparó el reactivo de Bradford utilizando 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml de etanol 95% y 100 ml de ácido fosfórico 85%. La solución se aforó a 1 L usando agua ultrapura y se almacenó a temperatura ambiente. Para realizar una curva de calibrado se prepararon 10 mL de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) de 1 mg/mL, de la que se obtuvieron

soluciones entre 25 y 1000 mg/L. Se prepararon 50 mL de soluciones de miel de 20% m/v en HCl 1 mM, a las que luego de ser filtradas se les añadió 25 µL de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 100 mM para inhibir las serín proteasas presentes en la miel. En un tubo de ensayo se agregaron 50 µL de la solución de BSA o de la solución de miel y 2,5 mL del reactivo de Bradford. La mezcla se agitó y se dejó reaccionar por 3 minutos. Se obtuvieron datos en una vía (absorbancia a 595 nm), los que se utilizaron para construir un modelo de calibración univariado y para analizar las muestras, utilizando como blanco una mezcla análoga reemplazando la BSA por agua ultrapura.

5. Cuantificación del H₂O₂ acumulado en miel como reflejo de la actividad de GOX

La actividad de la GOX se determinó indirectamente mediante la cuantificación del peróxido de hidrógeno acumulado en la miel diluida. Para ello se utilizó orto-dianisidina, reactivo que, al ser oxidado por el peróxido de hidrógeno a través de una reacción catalizada por la peroxidasa, genera un cromóforo que se analizó por espectrometría UV-Vis (White y col., 1963b; Kwakman y col., 2010). Se preparó una solución de H₂O₂ de 333 mg/L, a partir de la cual se obtuvieron soluciones entre 0,2 y 12 mg/L en buffer fosfato 0,01 M pH 6,5 para realizar una curva de calibrado. De las muestras de miel se prepararon soluciones de 20% m/v en buffer fosfato, las que fueron filtradas, recolectadas en viales ámbar y almacenadas durante 3 y 24 horas a temperatura ambiente, permitiendo la formación de H₂O₂. La reacción para cada muestra o calibrador se preparó en un tubo de ensayo, en donde se agregaron 0,5 mL de la solución de H₂O₂ o de la solución de miel 20% m/v, 1,5 mL de buffer fosfato, 0,5 mL de solución de peroxidasa 0,05 mg/mL en buffer fosfato y 0,25 mL de solución de orto-dianisidina 0,4 mg/mL en buffer fosfato. La reacción se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvieron datos en una vía (absorbancia a 444 nm), los que se utilizaron para construir un modelo de calibración univariado y para analizar las muestras, utilizando como blanco una mezcla análoga reemplazando la orto-dianisidina por buffer fosfato.

6. Fluorescencia total de la miel

Se prepararon soluciones de miel al 10% m/v con agua ultrapura, las que fueron filtradas. Luego se obtuvieron las matrices de excitación-emisión para las soluciones de miel, utilizando una celda de cuarzo de 3 mL y paso óptico de 1 cm. La longitud de onda de

excitación utilizada fue de 220 a 450 nm cada 10 nm, y de emisión de 250 a 600 nm cada 2 nm, con un slit de emisión y de excitación de 10 nm. A estas matrices se les eliminó la dispersión del Raileigh y Ramman primario y secundario mediante una rutina de cálculo usando MATLAB (corrección). Las matrices de excitación-emisión corregidas de las distintas mieles fueron concatenadas de forma vertical (o en dirección *column wise*) y analizadas por MCR-ALS. Se aplicó inicialización con el espectro más puro (*pure method*) considerando un 10% de ruido y no negatividad en ambos modos. El número de compuestos fluorescentes extraídos fue determinado mediante análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) según su importancia en explicar la variabilidad de los datos. Posteriormente, en base a la información bibliográfica, se identificaron los compuestos fluorescentes presentes en las muestras de miel, y se estableció su concentración relativa al dividir el *score* de cada variable para cada muestra por el correspondiente a la muestra CB1 en el caso de las muestras de la V Región y a la muestra C2A con relación a las muestras de colmenas tratadas con HO21.

7. Cuantificación de fenoles totales en miel

Los fenoles totales fueron cuantificados mediante fluorescencia total, utilizando ácido gálico como patrón. Para ello, se preparó una solución de este compuesto de 1000 mg/L en agua ultrapura con acetonitrilo, a partir de la cual se obtuvieron soluciones entre 0,25 y 6 mg/L en agua ultrapura para realizar una curva de calibrado. Se prepararon soluciones de miel al 0,5% m/v en agua ultrapura, las que fueron filtradas. Luego se obtuvieron las matrices de excitación-emisión para las soluciones ácido gálico y de miel, utilizando una celda de cuarzo de 760 μ L y paso óptico de 0,5 cm. Las matrices fueron obtenidas, corregidas y analizadas de la misma forma que lo descrito en el punto 6, sin embargo, para cuantificar los fenoles totales se utilizó una zona acotada de las matrices de excitación-emisión de los calibradores y las muestras, la cual fue de 240 a 280 nm en excitación y de 326 a 386 nm en emisión. Los *scores* de las muestras correspondientes al ácido gálico fueron interpolados en la curva de calibrado para obtener la concentración en equivalentes de este patrón.

8. Obtención de la fracción de 3 a 10 kDa de miel

Se prepararon 50 mL de soluciones de miel de 20% m/v en HCl 1 mM, a las que se les añadieron 25 μ L de PMSF 100 mM. Cada solución se filtró y se vertió 10 mL en un tubo Amicom Ultra-15® con membrana de tamaño de poro de 10 kDa en duplicado. Se realizó una ultrafiltración a 3000 rcf por 1 hora. Cada filtrado se vertió en un segundo tubo Amicom Ultra-15® con membrana de tamaño de poro de 3 kDa. Se realizó una nueva ultrafiltración a 3400 rcf por 80 minutos y un lavado con 1 mL de agua ultrapura a 3400 g por 20 minutos. Para cada miel la fracción retenida entre 3 y 10 kDa se recuperó, se combinó y se reconstituyó en un volumen de 1 mL de agua ultrapura. Este proceso se hizo dos veces para obtener 2 réplicas de cada muestra.

9. Cuantificación de defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de miel

9.1 Fluorescencia total

Se utilizó defensina-1 recombinante como patrón, la que se sintetizó a partir de la secuencia de la defensina-1 de la hemolinfa, reportada por Klaudiny y cols., 2005 (Figura 3a). Para ello, el péptido se sintetizó con una cola de poli histidina para su purificación, seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV (Virus del Grabado del Tabaco, por sus iniciales en inglés) en su extremos amino y carboxilo terminal, para que luego de ser aislada se removiera la cola de poli histidina digiriéndola con esta enzima. Los aminoácidos adicionales en la defensina-1 recombinante (Figura 3b) corresponden a los residuos restantes del corte que hace la proteasa TEV. A partir de este péptido se prepararon soluciones entre 0,12 y 1,85 μ M (equivalentes a 0,68 y 10,9 mg/L) en agua ultrapura para realizar una curva de calibrado. Luego se obtuvieron las matrices de excitación-emisión para las soluciones defensina-1 y de las fracciones diluidas, utilizando una celda de cuarzo de 760 μ L y paso óptico de 0,5 cm. El intervalo espectral utilizado fue de 250 a 450 nm cada 2 nm para la longitud de onda de emisión y de 200 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, su posterior análisis mediante MCR-ALS y la cuantificación se realizaron como lo indicado en el punto 7. En este caso el análisis se hizo empleando el intervalo acotado de 250 a 315 nm en excitación y de 300 a 400 nm en emisión.

a) Defensina-1 (5515.5 Da)



b) Defensina-1 Recombinante (5907.8 Da)



Figura 3. Secuencia de la defensina-1 de a) la hemolinfa y b) su versión recombinante.

9.2 HPLC con detector de fluorescencia

Se implementó un método basado en HPLC en fase reversa acoplado a un detector de fluorescencia, de acuerdo con Rees y cols., 1997, con algunas modificaciones. Se prepararon soluciones entre 0,04 y 4 μM (equivalentes a 0,22 y 22 $\mu\text{g/L}$) de defensina-1 recombinante en agua ultrapura para realizar una curva de calibrado. 80 μL de los calibradores o de las fracciones diluidas se mezclaron con 20 μL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) 0,25% v/v para obtener una concentración final de TFA de 0,05% v/v. Estas mezclas fueron traspasadas a viales de vidrio de 150 μL . Se utilizó el sistema HPLC Waters 600 con una columna C18 de 150 mm de largo y 4,6 mm de diámetro. El volumen de inyección fue de 20 μL y la elución se hizo con 2 fases: la fase A correspondió a acetonitrilo con un 0,05% de TFA y la fase B fue agua ultrapura con el mismo porcentaje de TFA. El programa de elución de las muestras duró 15 minutos: en los primeros 10 minutos se hizo un gradiente lineal que partió con 10% de fase A y 90% de fase B y terminó con un 60% de fase A y 40% de fase B, y en los últimos 5 min se hizo una elución isocrática con 60% fase B. El flujo fue de 1,1 mL/min y la columna se mantuvo a 35°C durante la corrida. La detección se hizo mediante el registro de la fluorescencia a 280 nm de excitación y 340 nm de emisión en el modo canal. Además, se realizó un registro de fluorescencia en modo *scan*, obteniendo el espectro de emisión entre 290 y 400 nm, para 280 nm en excitación, cada 1 segundo en el cromatograma. Para la cuantificación de la defensina-1, el área bajo la curva de la señal correspondiente a este analito en las fracciones se interpoló en la curva de calibrado realizada con la versión recombinante.

10. Actividad antimicrobiana de la miel

10.1 Concentración Inhibitoria Mínima de mieles de prueba

En una primera etapa, se midió la actividad antimicrobiana de 5 mieles de prueba de distintos orígenes geográficos frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* (aislado clínico) resistente a la meticilina (MRSA) y *Pseudomona aeruginosa* ATCC® 27853™, con el objetivo de establecer un rango de concentraciones en las cuales se suele presentar el efecto antimicrobiano de la miel y determinar la metodología de cuantificación del efecto antimicrobiano. Para ello se decidió utilizar el método de microdilución, según Sherlock y cols, 2010, con el cual se determinó la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) de estas mieles, es decir, la concentración más baja que inhibe el crecimiento de una bacteria en $\geq 80\%$ (CLSI, 2012), mediante la lectura de densidad óptica (DO), la cual es una medida que da cuenta del crecimiento de las bacterias. Finalmente, las mieles de la V Región y las obtenidas de colmenas tratadas con HO21 fueron diluidas a la CIM que se presentó con más frecuencia en las mieles de prueba, con el objetivo de determinar su actividad antimicrobiana a partir de la misma concentración y condiciones de trabajo.

El día anterior al ensayo las bacterias fueron sembradas en placas Petri con medio LB sólido e incubadas a 37°C en condiciones aeróbicas. En el día del ensayo se prepararon soluciones de miel al 50% m/v en medio LB líquido, a partir de las cuales se hicieron las siguientes diluciones seriadas utilizando el mismo medio: 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32. Luego se preparó una suspensión de cada bacteria con una densidad óptica de 0,5 McFarland en medio LB líquido, de la cual se preparó una suspensión con una concentración de bacterias equivalente a 10^6 UFC/mL, considerando el título bacteriano previamente determinado. En microplacas estériles de 96 pocillos de fondo plano se añadieron en diferentes pocillos 100 μ L de cada solución de las mieles de prueba (50, 25, 13, 6,3 y 3,1% m/v). Como blanco de la solución se agregó a los pocillos conteniendo las mieles de prueba 100 μ L medio LB, y en otros pocillos 100 μ L de la suspensión de bacteria. Tres pocillos de control contuvieron sólo medio LB (control negativo o de esterilidad) y 3 pocillos bacterias y medio LB (control positivo), considerando en todos el mismo volumen final de 200 μ L. Las placas se incubaron 37°C en condiciones aeróbicas por 18 h. La $DO_{595\text{ nm}}$ se determinó antes de la incubación (T_0) y

después de las 18 h de incubación (T18). La $DO_{595\text{ nm}}$ de cada pocillo con bacterias menos la $DO_{595\text{ nm}}$ de cada pocillo control en T0 se restó a la $DO_{595\text{ nm}}$ de cada replicado en T18, previa sustracción de la $DO_{595\text{ nm}}$ del control. El promedio de la $DO_{595\text{ nm}}$ ajustada de los controles positivos se asignó entonces un valor de crecimiento del 100%.

El porcentaje de inhibición del crecimiento se determinó usando la fórmula siguiente:

Porcentaje de inhibición =

$$\frac{\text{Promedio de DO ajustada de control positivo} - \text{DO ajustada de pocillo de ensayo de DO}}{\text{Promedio de DO ajustada de control positivo}} \times 100$$

10.2 Actividad antimicrobiana relativa de la miel

Cada muestra de miel, ya sea de la V Región como las que se obtuvieron de colmenas tratadas con HO21, fue diluida a la CIM que se presentó con más frecuencia en las mieles de prueba para establecer el porcentaje de inhibición de crecimiento para cada bacteria. El procedimiento fue similar al descrito en el punto 10.1, a diferencia que por cada miel diluida se realizó el control con medio LB en un pocillo y la inoculación de suspensión de bacterias en duplicado. Puesto que se midió el porcentaje de inhibición para un solo valor de concentración de miel, sin utilizar otro antimicrobiano de referencia, para comparar la actividad antimicrobiana entre las distintas muestras se le asignó arbitrariamente un valor de 1 al porcentaje de inhibición de la muestra CB1 en el caso de las muestras de la V Región y la muestra C2A en relación con las muestras de colmenas tratadas con HO21, de esta manera se obtiene la actividad antimicrobiana relativa con respecto a los valores de estas muestras, lo que permite hacer comparaciones entre las distintas mieles (Janakat y cols., 2015).

11. Actividad antimicrobiana de la fracción de 3 a 10 kDa de la miel

11.1 Concentración Inhibitoria Mínima de la fracción de 3 a 10 kDa de mieles de prueba

Se prepararon diluciones seriadas de las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles de prueba con medio LB líquido de las siguientes concentraciones: 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16. En las microplacas se añadieron 50 μL de las siguientes diluciones de cada fracción (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) y 50 μL medio LB como blanco de la solución en un pocillo, y en otro pocillo 50 μL de cada

solución y 50 μL de la suspensión de bacteria. El control negativo consistió en 50 μL de agua ultrapura más 50 μL de medio LB, mientras que el control positivo contenía 50 μL de agua ultrapura y 50 μL de la suspensión de bacterias con una concentración de bacterias equivalente a 10^6 UFC/mL, ambos en triplicado. Las condiciones de incubación, lectura y determinación de la MIC se llevaron a cabo de la misma forma descrita en el punto 10.1.

11.2 Actividad antimicrobiana relativa de las fracciones de 3 a 10 kDa de la miel

Aquellas fracciones de mieles de la V Región y de colmenas tratadas con HO21 con la mayor concentración de defensina-1, ya sea mediante MCR-ALS como HPLC con detector de fluorescencia, fueron sometidas a un ensayo similar al descrito en el punto 11.1, con la diferencia de que se prepararon diluciones seriadas de las fracciones con medio LB líquido de las siguientes concentraciones: 1:2 y 1:4. En las microplacas se añadió cada solución de las fracciones (1:1, 1:2 y 1:4).

12. Test estadísticos y análisis de componentes principales (PCA)

Los datos se analizaron estadísticamente usando una prueba t de Student no pareada para comparar dos muestras y ANOVA de una vía para comparar más de dos muestras para datos paramétricos, acompañada de la prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Se usó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas con datos no paramétricos, asociada a la prueba de Dunn de comparaciones múltiples. Por otra parte, para establecer las relaciones entre los diferentes factores (presencia de *Nosema ceranae*, origen geográfico del néctar y aplicación de HO21) y variables, se utilizó el Análisis de Componentes Principales. Este procedimiento transforma las variables originales en nuevas variables no correlacionadas denominadas componentes principales, que son una combinación lineal de las variables originales. Se generan un grupo de ejes ortogonales que representan las direcciones de mayor varianza en los datos, por lo que se reduce su dimensionalidad. Esta herramienta permite identificar aquellas muestras y variables correlacionados, agrupando las muestras en base a características comunes. Para ello, se construyeron dos matrices de información, una de las mieles de la V Región y otra de las mieles obtenidas de colmenas tratadas con HO21, conteniendo en las filas las muestras analizadas y en las columnas las diferentes variables evaluadas para cada muestra. Posteriormente se realizó un PCA sobre la matriz de correlación

(se centraron y estandarizaron los descriptores por la desviación estándar observada en cada uno de éstos para que tengan la misma trascendencia), utilizando la validación cruzada total para seleccionar el número de componentes relevantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Muestras de la V Región

1.1 Presencia de *Nosema ceranae* en abejas

La presencia de *N. apis* y *N. ceranae* se determinó a través de la cuantificación de esporas de *Nosema spp.* mediante su observación en el microscopio óptico. Posteriormente, para distinguir entre ambas especies se detectó el gen que codifica para el rRNA 16S del genoma de *N. apis* y/o *N. ceranae* a través de una PCR en tiempo real, de acuerdo con lo descrito por Martínez y cols., 2012. En la Tabla 4 se muestran los resultados de estos análisis.

Tabla 4. Infección por *Nosema spp.* en abejas de colmenas de la V región

Muestra	Análisis por microscopía	PCR en tiempo real		Muestra	Análisis por microscopía	PCR en tiempo real	
	Esporas/abeja	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i>		Esporas/abeja	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i>
CB1	0	-	-	CQ1	-	-	-
CB2	0	-	-	CQ2	0	-	-
CB3	0	-	-	CQ3	0	-	-
CB4	0	-	-	CQ4	0	-	-
CB5	0	-	-	CQ5	0	-	-
CB6	0	-	-	CQ6	0	-	-
CB7	0	-	-	CQ7	0	-	-
CB8	0	-	-	CQ8	0	-	-
CB9	0	-	-	CQ9	130000	Positivo	Negativo
CP1	0	-	-	Q1	0	-	-
CP2	0	-	-	Q2	0	-	-
CP3	0	-	-	Q3	0	-	-
CP4	0	-	-	Q4	0	-	-
CP5	0	-	-	Q5	0	-	-
CP6	0	-	-	Q6	0	-	-
CP7	0	-	-	Q7	0	-	-
CP8	0	-	-	Q8	0	-	-
CP9	0	-	-	Q9	0	-	-

∴ No se hizo PCR en tiempo real

Según lo descrito en la Tabla 4, sólo en la muestra CQ9 se encontraron esporas de *Nosema spp.* de acuerdo con el análisis por microscopía, la cual tuvo un recuento de 130.000 esporas/abeja. A través de PCR en tiempo real se confirmó que estas esporas correspondían a *N. ceranae* y no a *N. apis*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Fraunhofer Chile en el documento “Monitoreo de colmenas de *Apis mellifera* en la zona central de Chile, 2015-2016”, en donde se observó que la infección por *Nosema spp.* en las Regiones V, VI y Metropolitana fue menor en el 2016 (año en el que se recolectaron las muestras de este estudio) que en el 2015, probablemente porque el 2016 fue más seco en comparación con el 2015. En aquel documento, como en otras referencias (Özgör y cols., 2015), también se menciona que una alta humedad es favorable para la proliferación de *N. ceranae*, condición que no se presentó en el 2016. Finalmente, la muestra CQ9 fue negativa para la presencia de *N. apis*, lo que coincide con lo descrito por Martínez y cols., 2012, quienes concluyen que en Chile *N. ceranae* es un patógeno emergente que ha reemplazado a *N. apis*. De acuerdo con este resultado no se pudo determinar el efecto de este parásito sobre los marcadores químicos presentes en la miel. Sin embargo, las mieles fueron igualmente caracterizadas en base a estos marcadores para evaluar cómo influyen en su composición el entorno donde se desarrolla la colmena, es decir, el origen geográfico (componente externo) y las características propias de los insectos que la componen (componente interno).

1.2 Concentración de prolina libre en miel

La concentración de prolina libre en miel se determinó a través de lo descrito por Ough, 1969. En una primera instancia se hizo una curva de calibrado de orden cero, la que correlacionó la concentración de prolina y la absorbancia a la longitud de onda analítica (513 nm) (Figura 4).

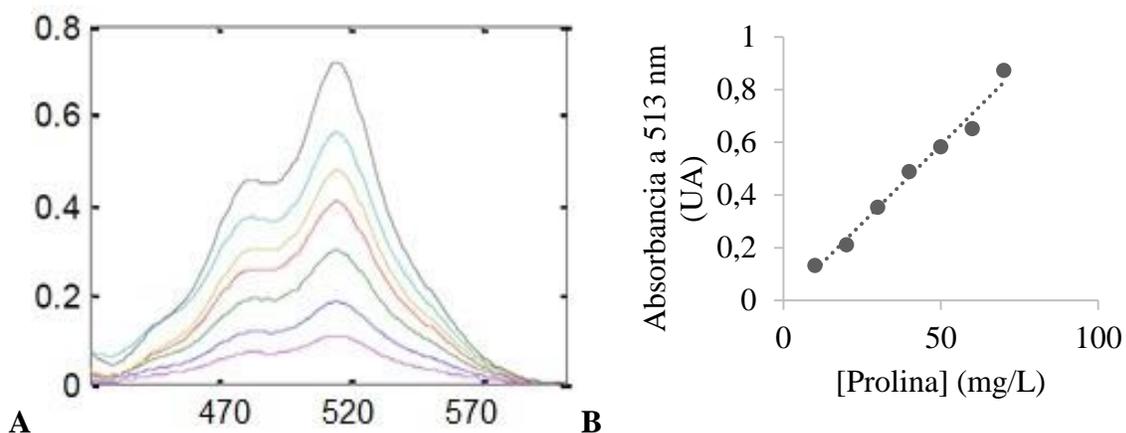


Figura 4. Espectros de absorbancia (A) y curva de calibración (B) obtenidos a partir de las muestras de calibrado para la determinación de prolina libre en miel.

También se construyó un modelo de calibrado de orden uno a través del método de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), utilizando el intervalo espectral comprendido entre 420 y 600 nm. Se calcularon para ambos modelos parámetros de calidad como el coeficiente de correlación (r), la sensibilidad analítica ($S_{y/x}$) que corresponde al error estándar en la predicción de la concentración, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), los que se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros de calidad del calibrado de orden cero y uno obtenidos para la determinación de prolina libre en miel

Parámetro de calidad	Orden 0 (Autopredicción)		Orden 1 (Autopredicción)		Orden 1 (Muestras)	
r	0,9919		0,9972		-	
$S_{y/x}$	3,0 mg/L	30 mg/Kg de miel	0,07 mg/L	0,70 mg/Kg de miel	0,12 mg/L	1,2 mg/Kg de miel
LOD	9,9 mg/L	99 mg/Kg de miel	0,23 mg/L	2,3 mg/Kg de miel	0,40 mg/L	4,0 mg/Kg de miel
LOQ	30 mg/L	300 mg/Kg de miel	0,70 mg/L	7,0 mg/Kg de miel	1,20 mg/L	12 mg/Kg de miel

Los coeficientes de correlación para el calibrado de orden cero y uno fueron 0,9919 y 0,9972 respectivamente, lo cual indica una alta correlación lineal entre las variables y una gran variabilidad de la respuesta explicada mediante el calibrado de ambos modelos. El LOD del modelo de calibración de orden uno fue 0,40 mg/L (4 mg/Kg de miel) al calcularlo a partir del residuo obtenido en muestras reales (la situación más exigente), mientras que el mismo

parámetro analítico en el modelo de orden cero es casi 25 veces mayor. Ello demuestra la ventaja que tiene el modelo de calibrado de orden 1. Luego se determinó la concentración de prolina en las 36 mieles provenientes de la V Región, cuyos espectros se muestran en la Figura 5.

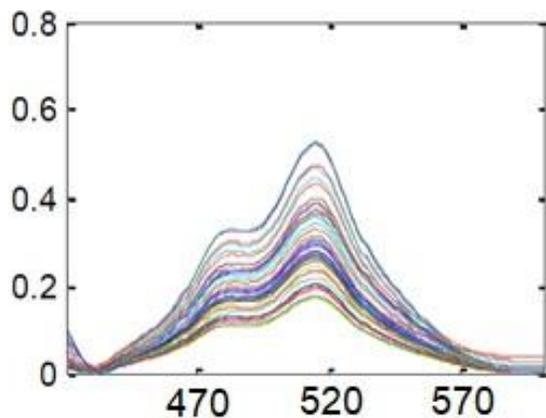


Figura 5. Espectros de absorción de las muestras de miel de la V región obtenidos para la determinación de prolina libre.

Una vez obtenidos los espectros de las muestras de miel, se obtuvieron los valores de concentración de prolina libre utilizando el calibrado de orden uno. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración de prolina libre en las muestras de miel de la V región predichas con el calibrado de orden uno

Muestra	[Prolina libre] (mg/Kg de miel)	Promedio \pm desviación estándar por zona	Promedio \pm desviación estándar por apiario	Muestra	[Prolina libre] (mg/Kg de miel)	Promedio \pm desviación estándar por zona	Promedio \pm desviación estándar por apiario
CB1	438	376 \pm 96	343 \pm 110	CQ1	253	238 \pm 64	302 \pm 60
CB2	223			CQ2	284		
CB3	367			CQ3	368		
CB4	371		406 \pm 44	CQ4	184		214 \pm 50
CB5	455			CQ5	272		
CB6	392			CQ6	187		
CB7	282		388 \pm 142	CQ7	213		199 \pm 30
CB8	549			CQ8	164		
CB9	334			CQ9	219		
CP1	521	425 \pm 97	512 \pm 39	Q1	236	271 \pm 64	327 \pm 103
CP2	546			Q2	306		
CP3	469			Q3	438		
CP4	277		318 \pm 48	Q4	193		217 \pm 45
CP5	371			Q5	189		
CP6	306			Q6	269		
CP7	445		445 \pm 70	Q7	280		268 \pm 20
CP8	515			Q8	245		
CP9	376			Q9	280		

En la Tabla 6 se observa que casi todas las muestras de miel cumplen con la norma de calidad, en donde el mínimo debe ser 180 mg/Kg para que una miel sea considerada genuina, auténtica y madura (Bogdanov y Martin, 2002). La muestra CQ8, del apiario de Quintero, presentó un valor de 164 mg/Kg, que está por debajo de la norma. El mayor valor registrado fue de 549 mg/Kg para la muestra CB8, proveniente de Casablanca. El promedio de las muestras fue 328 \pm 112 mg/Kg. Di Gerónimo y Fritz, 2001 midieron la concentración de prolina en 40 mieles argentinas con este mismo método, determinando que el promedio fue de 356 \pm 118 mg/Kg y que el mínimo y máximo valor fue de 73 mg/Kg y 577 mg/Kg respectivamente.

Se realizó un ANOVA para determinar si existen diferencias significativas en el promedio de concentración de prolina para las diferentes zonas de muestreo. En la Figura 6 se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre las distintas zonas, en donde la mayor diferencia se da entre las áreas de Catemu-Panquehue y Concón-Quintero. Cuando se

hizo el mismo análisis comparando los promedios de apiarios de una misma zona, solo en la zona de Catemu-Panquehue se encontraron diferencias significativas, siendo ambos apiarios de Catemu (Figura 6). Si bien la literatura menciona que la prolina proviene principalmente de las secreciones de las abejas y en menor grado del polen y néctar que las abejas recolectan (Hermosín y cols., 2003), las diferencias significativas encontradas entre las distintas zonas indicarían que el efecto dado por el origen geográfico sobre esta variable es importante, presentando homogeneidad en su contenido en colmenas relativamente cercanas entre sí.

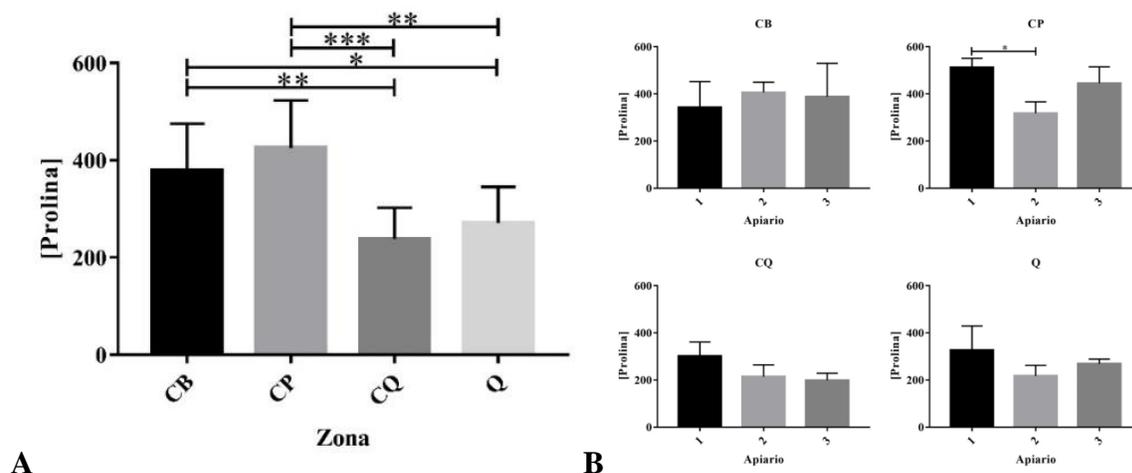


Figura 6. Concentración promedio de prolina libre en mieles de la V región según A: zona y B: apiarios de cada zona. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas a través de un ANOVA de una vía con la prueba de Tukey de comparaciones múltiples con un 95% de nivel de confianza (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$).

1.3 Concentración de proteínas totales en miel

La concentración de proteínas totales se determinó a través del método de Bradford (Bradford, 1976). Se obtuvo una curva de calibrado que correlacionó la concentración de soluciones de BSA y la absorbancia a la longitud de onda analítica (595 nm) (Figura 7).

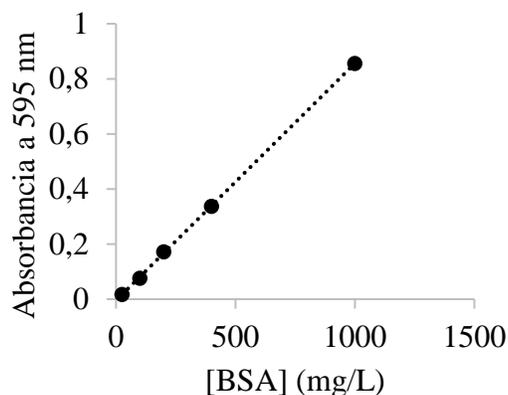


Figura 7. Curva de calibración obtenida a partir de las muestras de calibrado para la determinación de proteínas totales en miel.

Se obtuvieron los parámetros de calidad de este modelo de calibrado de orden cero, los que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros de calidad del calibrado de orden cero obtenido para la determinación de proteínas totales en miel

Parámetro de Calidad	Valor	
r	0,9999	
$S_{y/x}$	5,0 mg/L	25 mg/Kg de miel
LOD (3 $S_{y/x}$)	17 mg/L	85 mg/Kg de miel
LOQ (10 $S_{y/x}$)	50 mg/L	251 mg/Kg de miel

El coeficiente de correlación para el calibrado de orden cero (Absorbancia a 595 nm = 0,00086 [BSA] - 0,00468) fue 0,9999, lo cual indica una alta correlación lineal entre las variables y una gran variabilidad de la respuesta explicada mediante el calibrado. La $S_{y/x}$ del modelo de calibración fue de 5,0 mg/L (equivalente a 25 mg/Kg) y consecuentemente, el LOD fue 17 mg/L (equivalente a 83 mg/Kg) y el LOQ de 50 mg/L (equivalente a 251 mg/Kg). Una vez obtenidas las absorbancias a 595 nm de las muestras de miel de la V Región, se utilizó el calibrado de orden cero para obtener los valores de concentración de proteínas totales. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración de proteínas totales en las muestras de miel de la V región

Muestra	[Proteínas totales] (mg/Kg miel)	Promedio \pm desviación estándar por zona	Promedio \pm desviación estándar por apiario	Muestra	[Proteínas totales] (mg/Kg miel)	Promedio \pm desviación estándar por zona	Promedio \pm desviación estándar por apiario
CB1	2386	1989 \pm 436	2386*	CQ1	1174	1192 \pm 367	1174*
CB2	2476			CQ2	1438		
CB3	2202			CQ3	880		
CB4	2064		2064*	CQ4	1666		1596*
CB5	2328			CQ5	1596		
CB6	1085			CQ6	1525		
CB7	1684		1809*	CQ7	822		822*
CB8	1809			CQ8	834		
CB9	1866			CQ9	796		
CP1	1143	1391 \pm 257	1367 \pm 225	Q1	2256	1740 \pm 379	1981 \pm 486
CP2	1593			Q2	2267		
CP3	1365			Q3	1420		
CP4	1527		1467 \pm 200	Q4	1151		1583 \pm 376
CP5	1244			Q5	1834		
CP6	1630			Q6	1765		
CP7	1031		1339 \pm 401	Q7	1417		1656 \pm 250
CP8	1792			Q8	1634		
CP9	1195			Q9	1916		

* Mediana del apiario

En la totalidad de las muestras se pudo determinar la concentración de proteínas totales, mostrando valores que variaron entre 796 (CQ9, Quintero) y 2476 mg/Kg de miel (CB2, Casablanca), con un promedio de 1578 \pm 469 mg/Kg. da C Azeredo y cols., 2003 cuantificaron las proteínas totales en mieles brasileñas con este mismo método, cuyos valores fluctuaron entre 199 y 2236 mg/Kg, con un promedio de 860 \pm 683 mg/Kg.

Se realizó un ANOVA para determinar si existen diferencias significativas en la concentración de proteínas totales para las diferentes zonas de muestreo, en donde la mayor diferencia fue entre la zona de Casablanca (CB) y Concón-Quintero (CQ) (Figura 8). Cuando se hizo el mismo análisis comparando los promedios o medianas de apiarios de una misma zona, solo en la zona de Concón-Quintero se encontraron diferencias significativas, siendo un apiario de Concón y el otro de Quintero, es decir, con distancias geográficas mayores que entre los apiarios de las otras tres zonas, lo que explicaría esta diferencia. Si bien la literatura

menciona que sólo 1/3 de las proteínas tienen origen floral, específicamente del polen que las abejas recolectan (Nazarian y cols, 2010) y los 2/3 restantes corresponden a las enzimas y péptidos que las abejas le añaden al néctar y polen recolectados para transformarlos en miel (Afroz y cols., 2016), las diferencias significativas encontradas entre las distintas zonas indicarían que el efecto dado por el origen geográfico sobre esta variable, al igual que sobre el contenido de prolina, es importante, con homogeneidad en su contenido en colmenas relativamente cercanas entre sí.

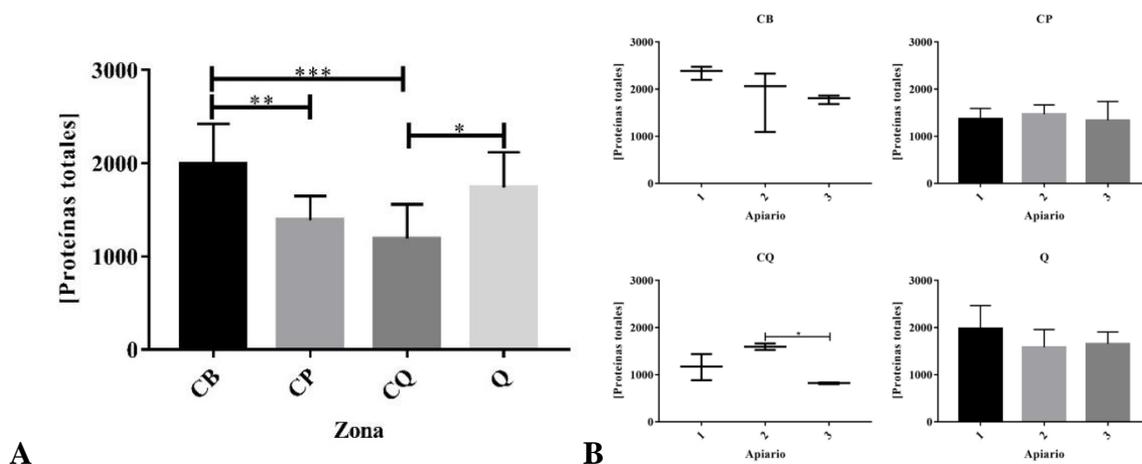


Figura 8. Concentración de proteínas totales en mieles de la V región según A: zona y B: apiarios de cada zona. En el caso de A y B (zonas CP y Q) los asteriscos denotan las diferencias estadísticamente significativas determinadas a través de un ANOVA de una vía con la prueba de Tukey de comparaciones múltiples con un 95% de nivel de confianza. En el caso de B (zonas CB y CQ) se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$).

1.4 Concentración de H_2O_2 en miel como reflejo de la actividad de GOX

La concentración de H_2O_2 acumulado en la miel diluida se utiliza como reflejo de la actividad de GOX de acuerdo con el método de White y cols., 1963b y Kwakman y cols., 2010. Se obtuvo una curva de calibrado que correlacionó la concentración peróxido de hidrógeno y la absorbancia a la longitud de onda analítica (444 nm) (Figura 9).

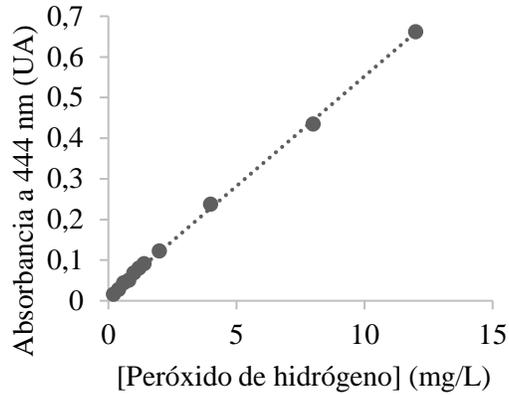


Figura 9. Curva de calibración obtenida a partir de las muestras de calibrado para la determinación de la concentración de H₂O₂ en miel.

Se obtuvieron los parámetros de calidad de este modelo de calibrado de orden cero, los que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros de calidad del calibrado de orden cero obtenido para la determinación de la concentración de H₂O₂ en miel

Parámetro de Calidad	Valor	
r	0,9996	
S _{y/x}	0,11 mg/L	0,55 µg/g de miel
LOD (3,3 S _{y/x})	0,36 mg/L	1,8 µg/g de miel
LOQ (10 S _{y/x})	1,1 mg/L	5,5 µg/g de miel

El coeficiente de correlación para el calibrado de orden cero (Absorbancia a 444 nm = 0,054 [Peróxido de hidrógeno] + 0,012) fue 0,9996, lo cual indica una alta correlación lineal entre las variables y una gran variabilidad de la respuesta explicada mediante el calibrado. El S_{y/x} del modelo de calibración fue 0,11 mg/L (equivalente a 0,55 µg/g) y consecuentemente, el LOD fue 0,36 mg/L (equivalente a 1,8 µg/g) y el LOQ de 1,10 mg/L (equivalente a 5,5 µg/g).

Una vez obtenidas las absorbancias de las muestras de miel a 444 nm, se utilizó el calibrado de orden cero para obtener los valores de actividad de GOX a las 3 y 24 horas de incubación. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Actividad de GOX en las muestras de miel de la V Región

Muestra	Tiempo de incubación				Muestra	Tiempo de incubación			
	3 horas		24 horas			3 horas		24 horas	
	Actividad de GOX ($\mu\text{g/g}$)	Mediana por zona	Mediana por apiario	Actividad de GOX ($\mu\text{g/g}$)		Actividad de GOX ($\mu\text{g/g}$)	Mediana por zona	Mediana por apiario	Actividad de GOX ($\mu\text{g/g}$)
CB1	10	14	10	< 5,5	CQ1	< 5,5	11	6,7	< 5,5
CB2	20			< 5,5	CQ2	6,1			< 5,5
CB3	9,0			< 5,5	CQ3	7,3			< 5,5
CB4	16		14	< 5,5	CQ4	11		< 5,5	
CB5	7,5			< 5,5	CQ5	32		< 5,5	
CB6	14			< 1,8	CQ6	10		6,1	
CB7	< 5,5		16	< 1,8	CQ7	7,9		< 1,8	
CB8	< 5,5			< 1,8	CQ8	13		< 1,8	
CB9	16			< 1,8	CQ9	16		< 1,8	
CP1	< 5,5	9,4	-	< 5,5	Q1	< 1,8	17	23	< 1,8
CP2	< 5,5			< 1,8	Q2	< 5,5			< 5,5
CP3	< 1,8			< 5,5	Q3	23			14
CP4	7,8		7,8	< 5,5	Q4	< 1,8		< 1,8	
CP5	11			< 1,8	Q5	< 5,5		< 1,8	
CP6	6,0			< 1,8	Q6	< 1,8		< 1,8	
CP7	< 1,8		15	< 5,5	Q7	< 5,5		< 1,8	
CP8	< 5,5			< 5,5	Q8	< 5,5		< 5,5	
CP9	15			44	Q9	10		< 5,5	

< 1,8: actividad de GOX menor al LOD, < 5,5: actividad de GOX menor al LOQ

Se pudo cuantificar la actividad de la GOX en 21 muestras (58%) a las 3 horas de incubación, con valores que variaron entre 6,0 (CP6, Catemu) y 32 $\mu\text{g/g}$ (CQ5, Concón) y con una mediana de 11 $\mu\text{g/g}$. A las 24 horas de incubación, en cambio, en sólo 3 muestras fue posible cuantificar esta variable, alcanzando valores entre 6,1 (CQ6, Concón) y 44 $\mu\text{g/g}$ (CP9, Panquehue) y con una mediana de 14 $\mu\text{g/g}$. En relación con los valores reportados, White y cols., 1963a, midieron la acumulación de peróxido de hidrógeno en 90 muestras de miel de diferentes orígenes botánicos con esta misma metodología, encontrando valores que van desde los 0 a los 360 $\mu\text{g/g}$ luego de una hora de incubación.

En general, se observó que a las 24 horas de incubación hubo un menor número de muestras con actividad de GOX sobre el LOD en comparación con los valores obtenidos a las 3 horas de incubación, excepto para la muestra CP9, cuyo valor fue de 15 $\mu\text{g/g}$ a las 3 horas de incubación y 44 $\mu\text{g/g}$ a las 24 horas, siendo este último el mayor valor registrado. Es probable que esta disminución de la actividad de GOX con el tiempo se deba, por un lado, a la inestabilidad del peróxido de hidrógeno y, por otro, a la existencia de enzimas en la miel,

como la catalasa, de origen botánico, que degradan este compuesto (Molan, P. C. y Rhodes, T., 2015). Otros factores que afectan la acumulación de peróxido de hidrógeno en la miel tienen que ver con la reacción entre los polifenoles y los de metales de transición, los que generan cantidades sustanciales de H_2O_2 (Bucekova y cols., 2014). Otra explicación plausible podrían ser las diferencias en los niveles de GOX derivados de las abejas o su actividad enzimática, los cuales pueden verse significativamente afectados por los compuestos presentes en la miel o por la ingesta de proteínas por parte de las abejas (Alaux y cols., 2010b).

Para determinar si existen diferencias significativas en la actividad de la GOX a las 3 horas de incubación para las diferentes zonas de muestreo, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis sobre los datos clasificados por ranking, en donde todos los datos menores al LOQ están vinculados al ranking más bajo. Este procedimiento se utiliza en vez de sustituir o eliminar los datos que están por debajo del LOQ, ya que al realizar test estadísticos con los datos tratados de esa forma se añade o se quita información, lo que puede generar conclusiones incorrectas (Helsel, 2005). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las zonas ni entre apiarios de una misma zona, lo que indicaría que el origen geográfico no tiene efecto sobre esta variable (Figura 10). Sin embargo, hubo una variabilidad apreciable entre las muestras que podría estar explicada por otros factores, como por ejemplo, factores genéticos/epigenéticos asociados a la expresión de los genes que codifican para GOX en las abejas, como postulan Bucekova y cols., 2014. Ellos determinaron una correlación positiva entre el contenido de GOX y la concentración de H_2O_2 .

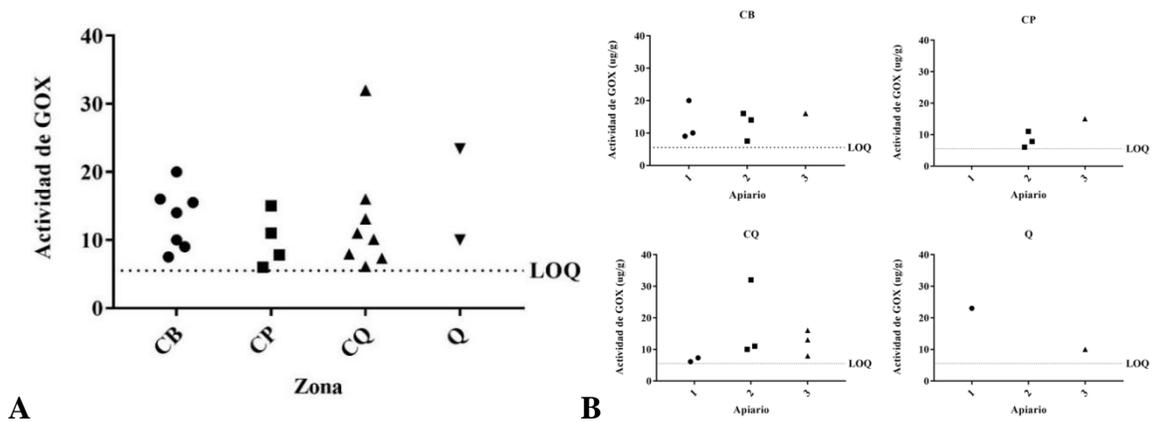


Figura 10. Diagrama de dispersión de la actividad de GOX a las 3 horas de incubación en mieles de la V región según A: zona y B: apiario por zona. CB: n=7, CP: n=4, CQ: n=8 y Q: n=2. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn de comparaciones múltiples para identificar las diferencias estadísticamente significativas con un 95% de nivel de confianza.

1.5 Fluorescencia total en miel

A partir del análisis por MCR-ALS se extrajeron 6 componentes que permitieron describir adecuadamente los perfiles de fluorescencia de las mieles diluidas, los cuales se muestran en la Figura 11.

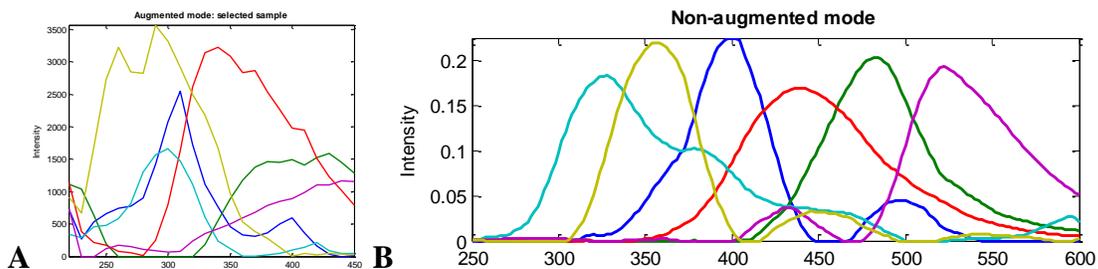


Figura 11. Espectros de excitación (A) y de emisión (B) promedio de los 6 componentes extraídos por MCR-ALS para las muestras de miel de la V Región. La asignación de compuestos fluorescentes es la siguiente: ácidos cinámicos (azul), hidroximetilfurfural (verde), furosina (rojo), tirosina (cian), riboflavina (violeta) y triptófano (amarillo).

El primer componente (azul) presenta un máximo de excitación de 310 nm de y de emisión de 400 nm, el que estaría relacionado con los compuestos fenólicos presentes en la miel, específicamente los ácidos cinámicos, que muestran máximos de emisión intensos entre los 400 y 450 nm (Wünsch y cols., 2015). El segundo y tercer componente (verde y rojo, respectivamente), que tienen un máximo de excitación y emisión de 400 y 480 nm, 350 y

440 nm, respectivamente, corresponderían a los principales productos de la reacción de Maillard, que son 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). El cuarto componente (cian) tiene un máximo de excitación/emisión de 290 y 325 nm respectivamente, el cual correspondería a la tirosina, ya que en estado puro muestra un par de excitación/emisión 280 y 300 nm. El quinto componente (violeta) correspondería a la riboflavina (vitamina B2), ya que este compuesto puro muestra un par de excitación/emisión de 450/525 nm (Yang y col., 2015) y el componente extraído presentó máxima excitación y emisión a 430 nm y 520 nm, respectivamente. El sexto componente (amarillo) presenta una longitud de onda máxima de excitación de 300 nm y un máximo de emisión de 360 nm, y se puede relacionar con el triptófano presente en la miel, el que presenta longitudes de onda excitación/emisión de intensidad de fluorescencia máxima de 275 y 343 nm (Lenhardt y col., 2015).

En la Tabla 11 se observan los valores de concentración relativa de los 6 componentes extraídos por MCR para las 36 muestras.

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

Muestra	Compuestos Fenólicos	Hidroximetilfurfural	Furosina	Tirosina	Riboflavina	Triptófano
CB1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
CB2	0,73	1,05	0,83	1,08	0,68	0,97
CB3	0,89	0,90	0,85	0,34	0,92	0,83
CB4	0,66	1,53	1,27	0,35	1,27	0,56
CB5	0,66	1,20	1,07	0,44	0,92	0,77
CB6	0,95	1,01	1,29	1,08	0,71	0,97
CB7	0,54	2,16	1,41	0,28	1,28	0,19
CB8	0,60	1,72	1,34	0,14	1,08	0,48
CB9	0,57	2,31	1,41	0,21	1,35	0,14
CP1	0,83	2,05	1,44	0,16	1,68	0,17
CP2	0,41	1,57	1,43	0,23	1,22	0,14
CP3	0,73	1,79	1,62	0,19	1,40	0,11
CP4	0,64	1,97	1,33	1,03	1,15	0,55
CP5	0,74	2,37	1,40	0,29	1,29	0,19
CP6	0,87	1,68	1,37	0,72	1,61	0,44
CP7	0,44	1,84	1,43	0,17	1,33	0,10
CP8	0,64	2,00	1,45	0,14	1,55	0,11
CP9	0,94	2,25	1,56	0,34	3,25	0,19
CQ1	1,24	1,83	1,54	0,70	1,67	0,34
CQ2	0,78	1,72	1,31	0,64	1,60	0,42
CQ3	0,77	1,69	1,30	0,61	1,64	0,41
CQ4	0,77	2,36	1,40	0,32	1,28	0,21
CQ5	1,56	1,84	1,55	2,21	1,49	0,78
CQ6	0,65	2,12	1,37	0,36	1,22	0,26
CQ7	1,10	0,41	0,92	3,67	0,43	0,80
CQ8	0,48	0,57	0,71	1,77	0,59	0,69
CQ9	0,53	0,46	0,74	2,32	0,55	0,78
Q1	0,96	2,17	1,37	0,34	1,33	0,30
Q2	0,91	2,12	1,41	0,49	1,21	0,29
Q3	0,93	1,78	1,44	1,42	0,99	0,47
Q4	0,66	2,30	1,48	0,04	2,60	0,05
Q5	0,60	2,20	1,41	0,06	1,77	0,05
Q6	0,60	2,00	1,41	0,02	2,19	0,02
Q7	0,58	1,63	1,23	0,12	0,61	0,61
Q8	0,99	1,81	1,50	0,82	1,12	0,53
Q9	0,74	1,58	1,18	0,59	1,05	0,85

La muestra CQ9, perteneciente a Quintero, tiene la menor concentración de fenoles (0,53), mientras que la muestra proveniente de Concón CQ5 tiene la mayor (1,56). Con relación al contenido de hidroximetilfurfural, el mínimo fue registrado para la muestra CQ7 (0,41), de

Quintero, y el máximo para la CP5 (2,37), de Catemu. CQ8, de Quintero, tiene un contenido de furosina de 0,71, siendo el menor valor obtenido, mientras que CP3, que proviene de Catemu, tiene el mayor valor (1,62). Con respecto a la concentración de tirosina, se observa que la muestra Q6 (0,02) tiene el menor valor, mientras que CQ7 (3,67) tiene el mayor. La primera proviene de Quillota y la segunda de Quintero. Los valores mínimos y máximos de riboflavina fueron 0,43 y 3,25, correspondientes a las muestras CQ7 de Quintero y CP9 de Panquehue, respectivamente. Por último, el contenido de triptófano varió de 0,02 a 1, correspondiendo a las muestras Q6 de Quillota y CB1 de Casablanca.

De acuerdo con esto, las muestras de Quintero (CQ7-CQ9) muestran el menor contenido de compuestos fenólicos, hidroximetilfurfural, furosina y riboflavina, y el mayor contenido de tirosina. Puesto que los compuestos fenólicos y la riboflavina tienen origen botánico, es probable que el polen y néctar de los cultivos cercanos sea pobre en estos compuestos. El bajo contenido de hidroximetilfurfural y furosina puede atribuirse a que estas mieles no han madurado completamente, ya que ambos compuestos aumentan en mieles que han sido almacenadas por periodos largos de tiempo (Morales y cols., 2009). Con respecto a la tirosina, cuyo origen es botánico, se ha encontrado que en ciertas mieles su contenido es elevado (Kaškonienė, V., y Venskutonis, P. R., 2010).

Para verificar si existen patrones en común entre las muestras, las concentraciones relativas de cada compuesto fluorescente en éstas fueron sometidas a un PCA. De acuerdo con este análisis se obtuvieron 4 componentes principales, los cuales explican el 85% de la variabilidad de las muestras. El primero explica el 61% y el segundo el 22%. En la Figura 12, donde se grafica el mapa de las muestras y de las variables sobre los componentes principales, se observa que la mayoría de las muestras no se ordenan por origen geográfico, si no que se agrupan de acuerdo con ciertas variables. 2/3 de las muestras se agrupan alrededor de las variables Furosina, Riboflavina e Hidroximetilfurfural y el resto están correlacionadas a las variables Tirosina y Triptófano. De acuerdo con trabajos como los de Lenhardt y cols., 2015, donde se utilizó espectroscopía de fluorescencia junto con PARAFAC y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para la caracterización y clasificación de 95 muestras de mieles, se esperaba que las muestras se ordenaran según

origen geográfico, ya que es probable que muestras de una misma localidad compartan el origen botánico de su miel. Es probable que un mayor número de muestras podría brindar un mejor modelo de clasificación que dé cuenta de las variables relacionadas con el origen geográfico y/o botánico de las mieles.

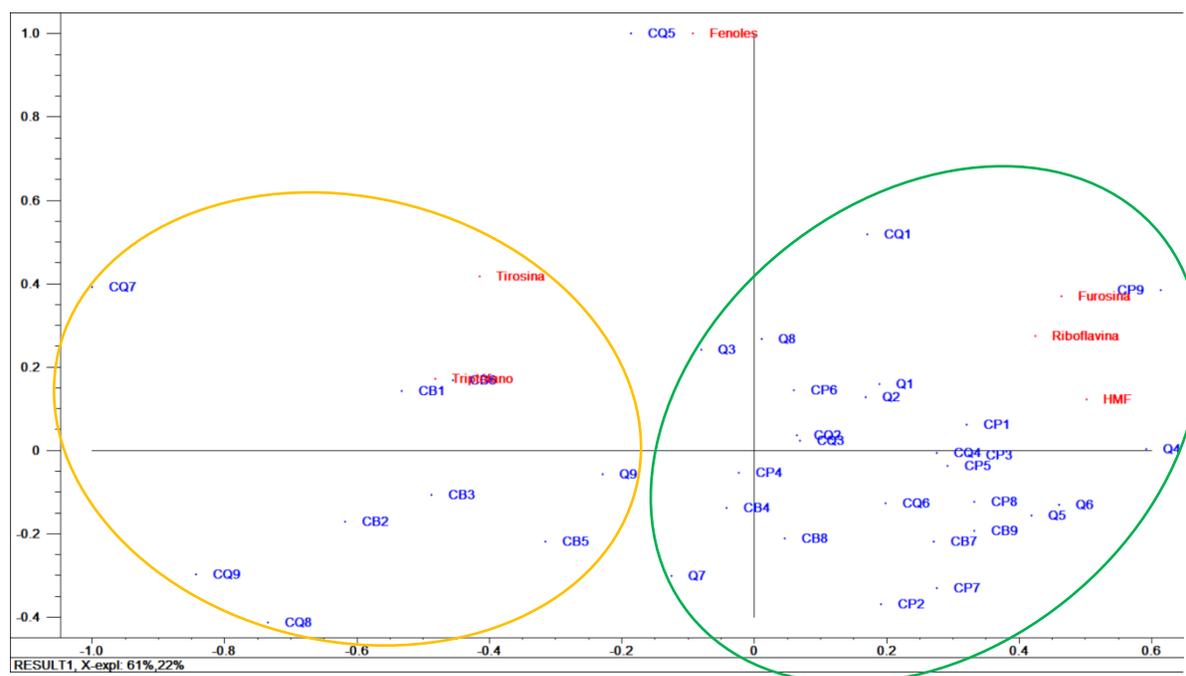


Figura 12. Mapa de muestras y variables del PCA aplicado sobre la concentración relativa de los componentes fluorescentes extraídos para las mieles de la V Región. Se presentan las muestras en azul y las variables en rojo. El componente principal 1 corresponde a la línea horizontal y el 2 a la vertical. El análisis se realizó con las variables centradas y estandarizadas.

1.6 Concentración de fenoles totales en miel

Los compuestos fenólicos encontrados en la miel se dividen en ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales provienen del néctar y polen que las abejas recolectan. Los ácidos fenólicos se subdividen en dos clases: los ácidos benzoicos sustituidos y los ácidos cinámicos. Los flavonoides presentes en la miel se dividen en tres clases con estructuras similares: flavonoles, flavonas y flavanonas (Silva y cols., 2013). De los compuestos fenólicos descritos, sólo los ácidos fenólicos presentan fluorescencia nativa moderada a intensa, mientras que en el caso de los flavonoides un número limitado tiene fluorescencia nativa muy leve (Hurst, 2008). Es por esto que los ácidos fenólicos pueden ser cuantificados

utilizando métodos basados en fluorescencia. Los ácidos benzoicos tienen un leve máximo de emisión a 360 nm y los ácidos cinámicos muestran máximos de emisión intensos entre los 400 y 450 nm (Wünsch y cols., 2015). En este estudio se utilizó el ácido gálico como patrón, el cual corresponde a un ácido benzoico sustituido. Para ello, se emplearon los perfiles de fluorescencia total de distintas soluciones de ácido gálico y de las mieles de la V Región (Figura 13).

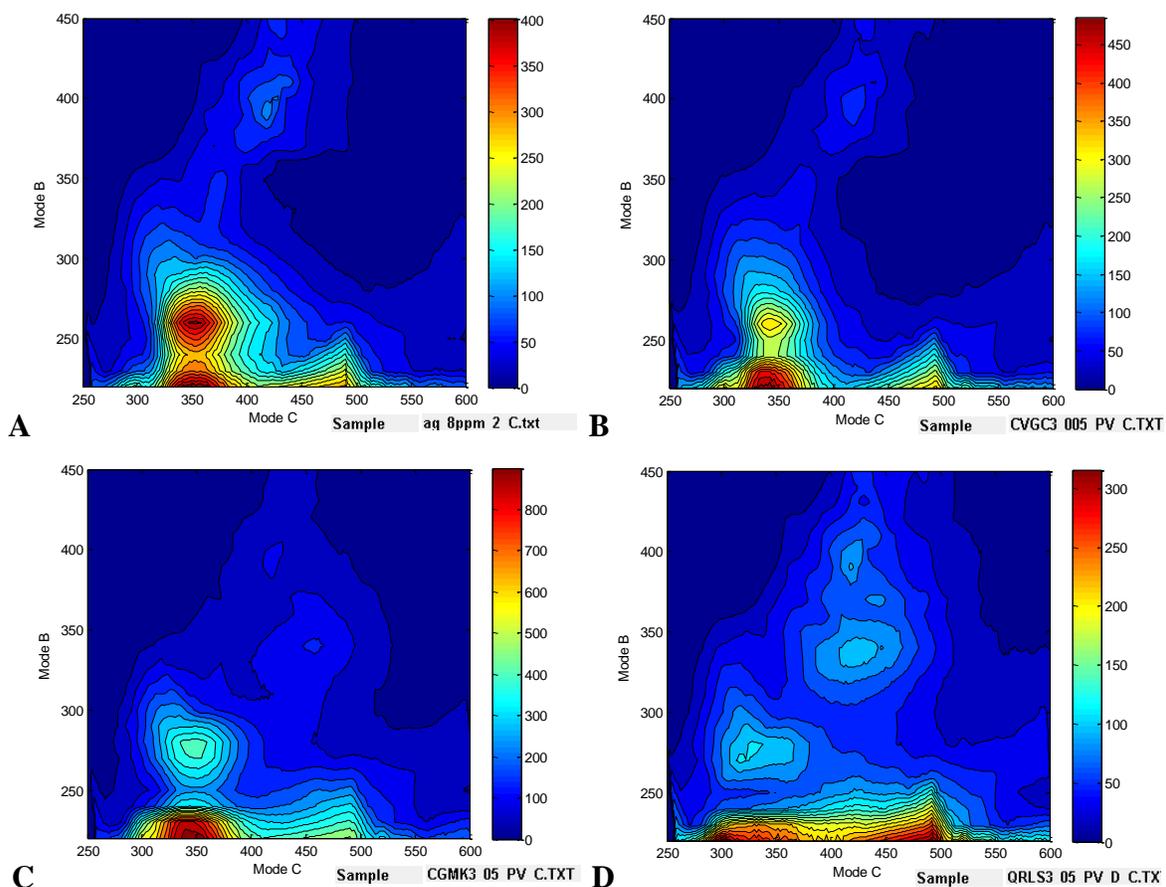


Figura 13. Matrices de excitación/emisión del ácido gálico y de las muestras de miel de la V Región. (A): ácido gálico 8 mg/L, (B): muestra del grupo 1, (C) y (D): muestras del grupo 2.

El ácido gálico mostró dos bandas, con máximos a 220/350 nm y 260/350 nm (Figura 13A). En relación con las muestras, se encontraron en dos tipos de perfiles de acuerdo con los compuestos fluorescentes detectados, como se muestra en la figura 13B, C y D. El primer tipo de muestras (9 en total) presentó un perfil de fluorescencia total similar al ácido gálico (Figura 13B). En el tipo 2 (Figuras 13C y D) la intensidad de las bandas asociadas al ácido

gálico disminuye y al mismo tiempo se sumó una banda adicional, la que correspondería a ciertos productos finales de glicación avanzada (AGEs), que tienen un máximo característico de 370 nm de excitación y 440 de emisión. Los AGEs son un grupo de compuestos heterogéneos que derivan de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que son glicosados/fructados (unión de glucosa/fructosa) y oxidados en forma no enzimática en la reacción de Maillard (Ashraf y cols., 2015). De acuerdo con lo observado, las muestras ricas en ácidos benzoicos carecen de AGEs, lo que podría deberse al hecho de que los fenoles, que son antioxidantes, desfavorezcan la producción de tales compuestos, los cuales se generan en condiciones prooxidantes (Matiacevich y cols., 2005). Para cuantificar los fenoles totales se realizó un análisis por MCR-ALS a una zona acotada de las matrices. En la Figura 14 se muestran los resultados, tanto para la curva de calibrado como para las muestras.

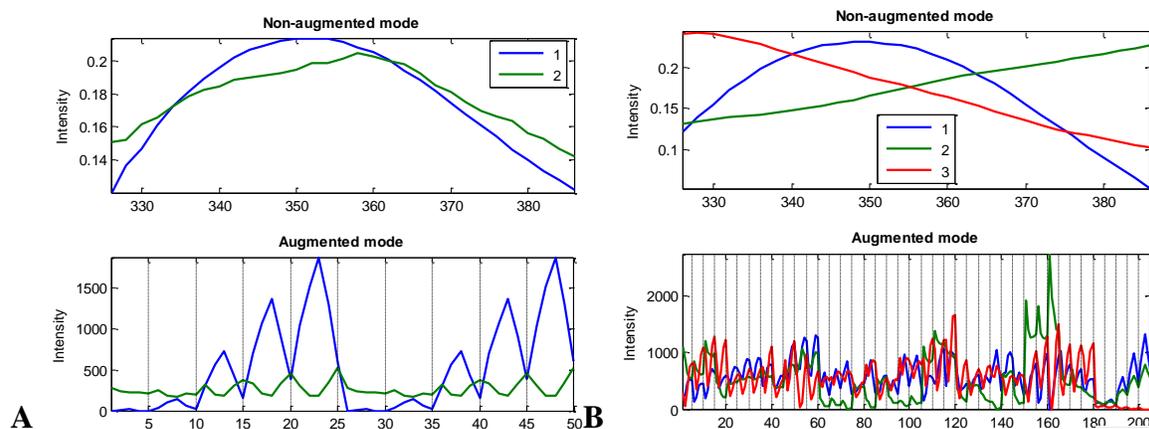


Figura 14. Espectros de emisión (Arriba) y de excitación (Abajo) de los componentes extraídos por MCR-ALS para la cuantificación de fenoles totales. A: autopredicción de la curva de calibrado de ácido gálico, B: predicción de la curva de calibrado de ácido gálico y de las muestras de miel.

El análisis por MCR-ALS de la curva de calibrado del ácido gálico generó 2 componentes, siendo el primero (azul) el que se atribuye al analito. En el caso de las muestras se obtuvieron 3 componentes, en donde el primero corresponde al ácido gálico. En la Figura 15 se muestra la curva de calibrado del ácido gálico en la que se predijeron las concentraciones de las muestras.

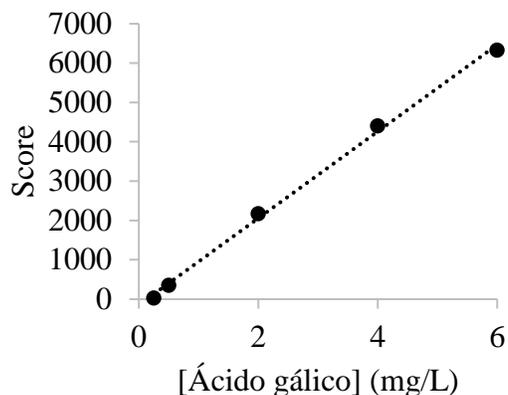


Figura 15. Curva de calibración pseudo-univariada de ácido gálico para la cuantificación de los fenoles totales en las muestras de miel.

Se obtuvieron los parámetros de calidad de este modelo de calibrado, los que se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Parámetros de calidad del calibrado de orden 2 para cuantificar fenoles totales en miel

Parámetro de Calidad	Autopredicción		Muestras	
	r	0,9989		-
S _{y/x}	0,093 mg/L	9,3 mg/Kg de miel	0,15 mg/L [eq AG]*	15 mg/Kg de miel [eq AG]*
LOD	0,31 mg/L	31 mg/Kg de miel	0,49 mg/L [eq AG]*	49 mg/Kg de miel [eq AG]*
LOQ	0,93 mg/L	93 mg/Kg de miel	1,5 mg/L [eq AG]*	150 mg/Kg de miel [eq AG]*

[eq AG]*: equivalentes a 1 mg de ácido gálico

El coeficiente de correlación para el calibrado ($\text{Score} = -148 + 1102[\text{Ácido gálico}]$) fue 0,9989, lo cual indica una alta correlación lineal entre las variables y una gran variabilidad de la respuesta explicada mediante el calibrado. Cuando se hizo la predicción sobre las muestras se obtuvieron LODs y LOQs algo superiores a los de la autopredicción, ya que las muestras presentan una mayor variabilidad que los calibradores, por lo que estos últimos límites fueron considerados al cuantificar los fenoles totales en las muestras, cuyos valores se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13. Contenido de fenoles totales en las muestras de miel de la V Región predicho con el calibrado de orden dos

Muestra	[Fenoles totales] (mg/Kg [eq AG]*)	Mediana por zona	Promedio \pm desviación estándar por apiario	Muestra	[Fenoles totales] (mg/Kg [eq AG]*)	Mediana por zona	Promedio \pm desviación estándar por apiario
CB1	5003	3423	4879 \pm 1851	CQ1	586	869	726 \pm 142
CB2	2969			CQ2	722		
CB3	6664			CQ3	869		
CB4	1989		3295 \pm 1133	CQ4	997		1123 \pm 113
CB5	4010			CQ5	1217		
CB6	3887			CQ6	1154		
CB7	980		1635 \pm 1567	CQ7	461		680 \pm 334
CB8	3423			CQ8	1065		
CB9	501			CQ9	515		
CP1	424	613	292 \pm 127	Q1	843	652	652**
CP2	171			Q2	652		
CP3	280			Q3	489		
CP4	878		946 \pm 269	Q4	302		302**
CP5	718			Q5	316		
CP6	1242			Q6	237		
CP7	233		491 \pm 224	Q7	16739		5018**
CP8	613			Q8	1622		
CP9	627			Q9	5018		

* equivalentes a 1 mg de ácido gálico por kilogramo de miel, ** mediana por apiario.

Se pudo determinar el contenido de fenoles totales en la totalidad de las muestras, registrándose valores entre 171 (CP2, de Catemu) y 16739 mg/Kg (Q7, de Quillota), con una mediana de 856 mg/Kg. Meda y cols., 2005, utilizando el método colorimétrico Folin-Ciocalteu y ácido gálico como patrón, reportaron que el contenido de fenoles totales en mieles de Burkina Faso varió entre los 325,9 a 1147,5 mg/Kg. La fluorescencia en general es más selectiva y más sensible que los métodos colorimétricos. Por ejemplo, el método mencionado tiene como interferentes azúcares, entre otras sustancias (Everette y cols., 2010), las cuales se encuentran en grandes cantidades en la miel, por lo que podría decirse que el método planteado aquí genera resultados más confiables.

Para determinar si existen diferencias significativas en el contenido de fenoles totales para las diferentes zonas de muestreo, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas solamente entre las medianas de las zonas de

Casablanca (CB) y Catemu-Panquehue (CP) (Figura 16), lo que estaría indicando que el efecto dado por el origen geográfico en esta variable no sería muy importante. Sin embargo, al realizar el mismo análisis o un ANOVA comparando distintos apiarios de una misma zona, se observaron diferencias significativas en Catemu-Panquehue y Quintero, lo que indicaría que, a pesar de que los apiarios estén relativamente cercanos entre sí, se pueden dar diferencias en el contenido de fenoles en la miel debido a la flora local particular desde la cual las abejas colectan néctar y polen. En este sentido, se ha descrito que el perfil fenólico de las mieles depende de las fuentes florales utilizadas para recolectar la miel (Silva y cols., 2013), por lo que probablemente si se estudia más de un compuesto fenólico se lograría diferenciar el origen botánico de mejor forma que al utilizar esta metodología, en la que se emplea una sola señal de fluorescencia.

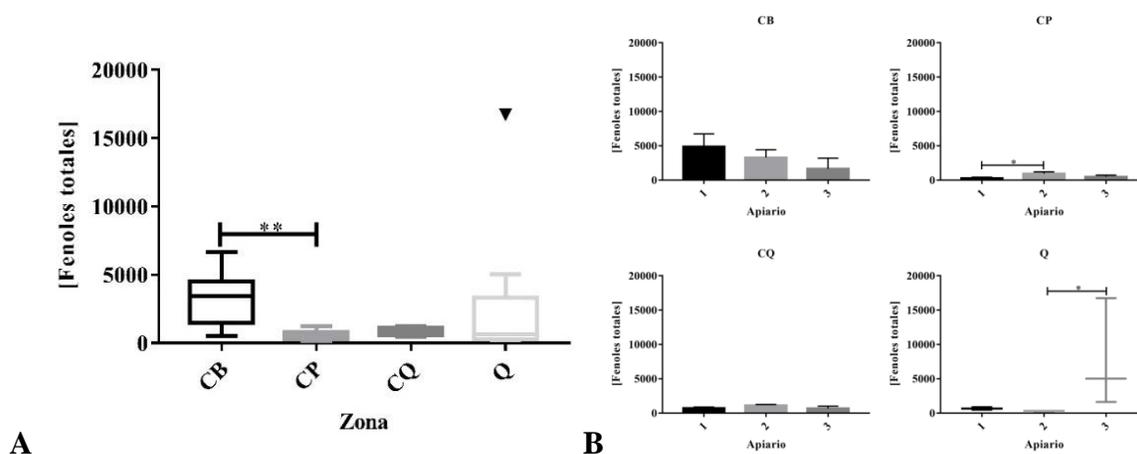


Figura 16. Distribución del contenido de fenoles totales en mieles de la V región según A: zona y B: apiarios de una misma zona. Los asteriscos denotan las diferencias estadísticamente significativas, las cuales fueron determinadas en A y B (zona Q) con la prueba de Dunn de comparaciones múltiples con un 95% de nivel de confianza. En el caso de B (zonas CB, CP, CQ) se utilizó un ANOVA con la prueba de Tukey (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$).

1.7 Cuantificación de defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de la miel a través de fluorescencia total

Se obtuvieron las EEM de las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles y de soluciones de defensina-1 recombinante como curva de calibrado (el péptido había sido obtenido previamente en el trabajo de Cebrero, 2018), los cuales se muestran en la Figura 17.

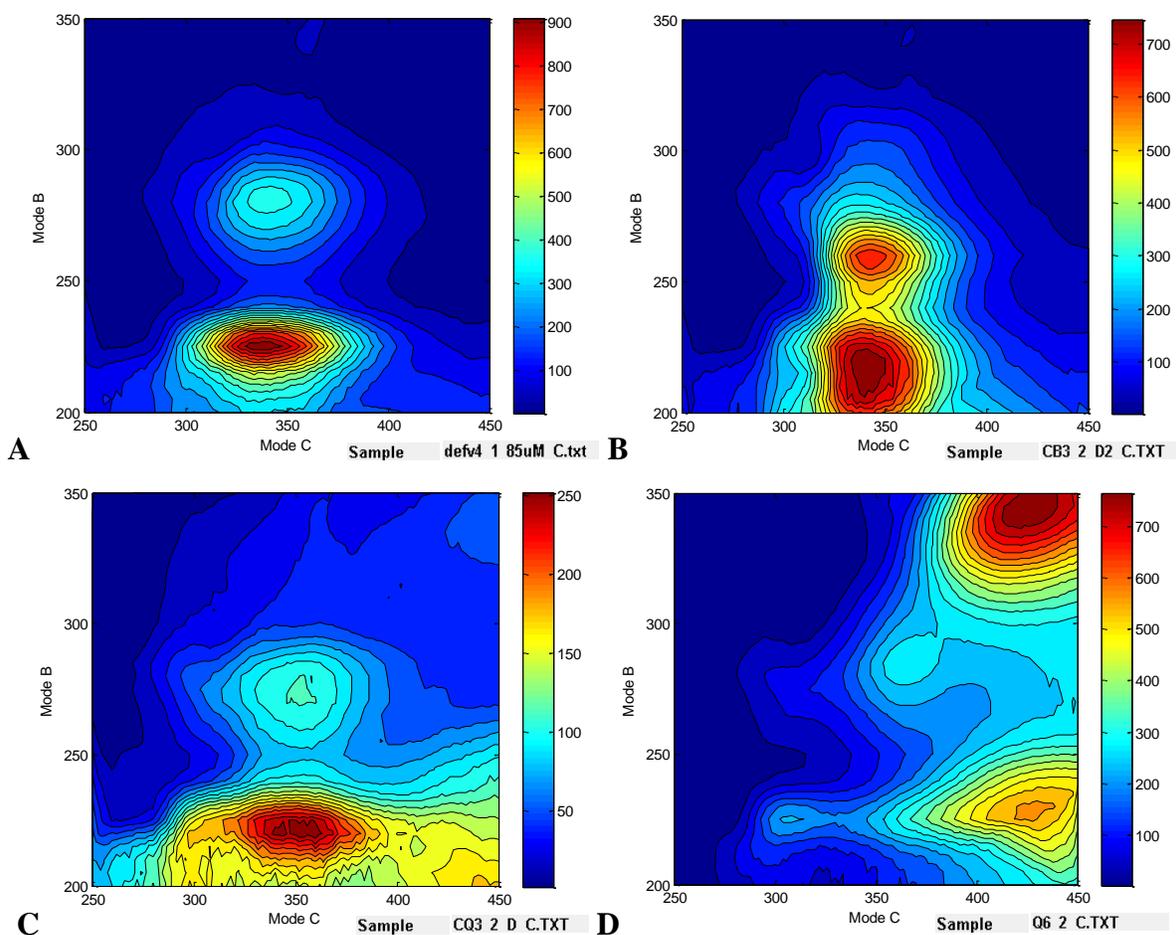


Figura 17. Matrices de excitación/emisión de la defensina-1 recombinante y de las fracciones de 3 a 10 kDa de las muestras de miel de la V Región. A: defensina-1 recombinante 1,85 μ M, B: muestra del grupo 1, C y D: muestras del grupo 2.

El espectro de fluorescencia de la defensina-1 recombinante (Figura 17A) presentó dos bandas con máximos excitación/emisión a 220/350 nm y 280/350 nm, las cuales están asociadas al triptófano presente en la estructura del péptido. Se observó que las muestras se pueden dividir en dos grupos según los compuestos fluorescentes detectados (Figuras 17B, C y D). El primer grupo (9 muestras) (Figura 17B) presenta dos bandas de emisión en posiciones similares a las observadas para la defensina-1 recombinante, asociadas a la fluorescencia del triptófano. Adicionalmente en estas muestras se observó una banda intensa a 260 nm de excitación y 340 nm de emisión, solapada con la del triptófano y similar a la que presentó el ácido gálico (Figura 13A). Es probable que esta banda de emisión esté asociada a complejos entre fenoles y proteínas, cuya presencia en la miel ha sido descrita (Brudzynski, 2012), y no a fenoles aislados, ya que tienen pesos moleculares menores a 3 kDa.

El segundo grupo de muestras (Figuras 17C y D) la banda asociada al triptófano se presentó con un corrimiento hacia longitudes de onda más largas en emisión, mostrando un máximo en 350 nm. Vivian y Callis, 2001 describen que cuando el triptófano se encuentra en un ambiente más polar su máximo de emisión se desplaza a hacia el rojo, es decir, hacia longitudes de onda más largas. En estas muestras también se presentó una tercera banda, con intensidad variable dependiendo de la muestra, pero esta vez a 340 nm de excitación y 440 de emisión. Esta se debería a la presencia de ciertos productos finales de glicación avanzada (AGEs), como la pentosidina y la crosslina, los cuales están presentes en la mayoría de los alimentos. Los AGEs fluorescentes se encuentran formando parte de enlaces cruzados que se dan entre proteínas (Ashraf y cols., 2015), por lo que es probable que los que se observan en estas muestras estén unidos a péptidos o proteínas, ya que las muestras contienen moléculas cuyo tamaño va de 3 a 10 kDa. De acuerdo con lo observado, las fracciones de 3 a 10 kDa ricas en complejos fenólicos carecen de AGEs que forman parte de complejos proteicos (Figura 19B), tal como se observó en las muestras de miel total (Figura 13B, C y D). Esto se atribuiría, por un lado, a que un alto contenido de fenoles favorezca la formación de complejos entre proteínas y fenoles, evitando la generación de complejos entre proteínas y AGEs. Por otro lado, también podría deberse a que los fenoles, que son antioxidantes, desfavorezcan la producción de tales compuestos, los cuales se generan en condiciones prooxidantes (Matiacevich y cols., 2005).

La presencia de la señal del triptófano desplazada hacia el rojo y de AGEs en las muestras del grupo 2 (Figura 17C y D), en conjunto con el gran contenido de carbohidratos en la miel, siendo los principales la glucosa y la fructosa (Nagai y cols., 2018), indicarían que la defensina-1 estaría siendo modificada en la reacción de Maillard. Este proceso genera una variedad de productos pardos, intermedios y subproductos, y se compone de tres etapas (Figura 18): en la etapa inicial, los azúcares y las aminos se condensan (A), y luego ocurre la reordenación Amadori (B); en la etapa intermedia, el color se debilita o se vuelve amarillo, dándose reacciones de deshidratación de azúcares (C), fragmentación de azúcares (D) y degradación de aminoácidos (E); y en la etapa final, los compuestos altamente coloreados se forman por condensación aldólica (F) y polimerización de aldehído-amina con la formación de compuestos de nitrógeno heterocíclico (G) (Nagai y cols., 2018).

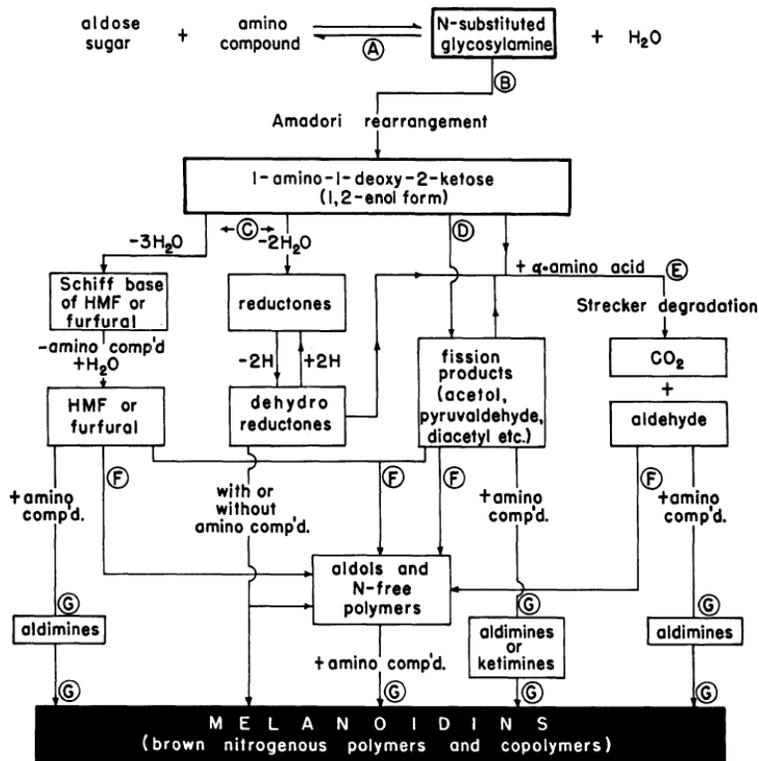


Figura 18. Esquema de la reacción de Maillard basada en Hodge (1953).

Cuando el grupo amino de una proteína se condensa con una azúcar se originan diferentes compuestos y algunos de ellos pueden interactuar con los reactivos iniciales modificando, en diferentes grados, la estructura de la proteína. En comparación con los pasos iniciales, las etapas avanzada y final contribuyen en gran medida a la agregación de proteínas y la formación de compuestos coloreados y fluorescentes (Sanmartín y cols., 2009), entre los cuales se encuentran los AGEs. Todos estos cambios estructurales pueden afectar la funcionalidad de las proteínas. Por ejemplo, GhoshMoulick y cols., 2007 estudiaron las alteraciones en las estructuras secundaria y terciaria de la hemoglobina provocadas por la unión de glucosa y fructosa (glicación y fructación), lo que se tradujo en cambios en la fluorescencia del triptófano presente en esta proteína y un aumento en la fluorescencia asociada a los AGEs. Entonces se postula que gran parte de la defensina-1 en las mieles debe estar glicada y/o fructada, e inclusive formando parte de estos compuestos poliméricos finales. Actualmente se están llevando a cabo experimentos en los que la defensina-1 recombinante es incubada con altas concentraciones de glucosa y fructosa, y se han estudiado los cambios en la fluorescencia de este péptido a medida que transcurre el tiempo.

Puesto que las muestras mostraron distintos perfiles de fluorescencia, específicamente en relación con la presencia de distintos compuestos fluorescentes, se decidió realizar la cuantificación de la defensina-1 por grupo. En la Figura 19 se muestran los perfiles de fluorescencia de los compuestos fluorescentes extraídos por MCR-ALS de cada grupo de muestras en un intervalo acotado de las matrices.

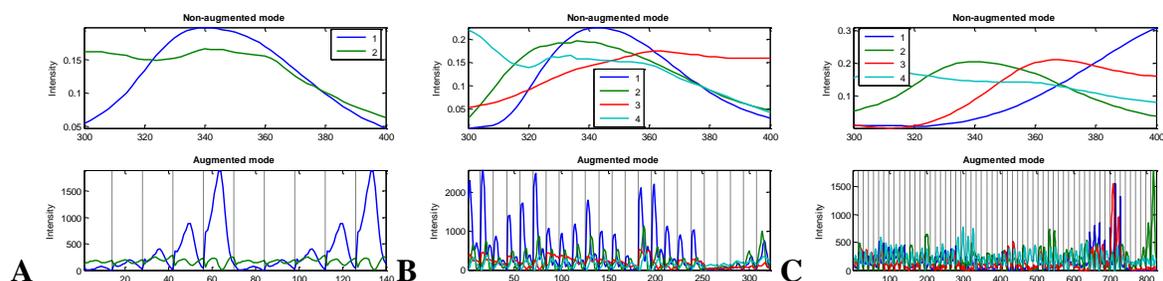


Figura 19. Espectros de emisión (arriba) y de excitación (abajo) de los componentes extraídos por MCR-ALS para la cuantificación de defensina-1. A: predicción de la curva de calibrado defensina-1 recombinante, B: muestras del grupo 1 y C: muestras del grupo 2, en ambos casos junto a la defensina-1 recombinante.

El análisis por MCR-ALS de la defensina-1 recombinante (Figura 19A) generó dos componentes, siendo el primero el que corresponde a este analito, ya que mostró un máximo de excitación/emisión de 280/340 nm. El segundo componente probablemente se trata de una interferencia dada por la corrección de las muestras, ya que en todas aparece con la misma intensidad. En las muestras del grupo 1 (Figura 19B) el análisis mediante MCR-ALS extrajo 4 componentes. El primer componente tiene un máximo de excitación/emisión de 260/345 nm, el cual podría corresponder a un ácido benzoico como el ácido gálico. El segundo componente, con un máximo de excitación/emisión de 275/335 nm, se asignó como defensina-1 y se utilizó para realizar la cuantificación de esta molécula en las muestras. El tercer componente, que tiene un máximo de excitación/emisión de 300/360 nm, se postula como un péptido modificado que contiene un residuo de triptófano con un máximo de emisión desplazado hacia el rojo. El cuarto componente tiene un máximo de excitación/emisión de 280/300 nm, el cual podría asociarse a moléculas con un residuo de tirosina.

Por otro lado, en las muestras del grupo 2 (Figura 19C) también se encontraron 4 compuestos fluorescentes, en donde el primer componente tiene un máximo de excitación/emisión de 340/440 nm, el cual se asocia a los AGEs fluorescentes. El segundo, tercer y cuarto componente son similares a los mismos componentes extraídos para las muestras del grupo 1, ya que el máximo de excitación/emisión del componente 2 es de 280/340 nm, del 3 es de 290/365 nm y el 4 275/310 nm. Al igual que para las muestras del grupo 1, el componente 2 se asignó como defensina-1 y fue utilizado para su cuantificación. En la Figura 20 se muestra la curva de calibración pseudounivariada de orden 2 y en la Tabla 14 se muestran los parámetros de calidad de la cuantificación de la defensina-1 por MCR-ALS para los dos grupos de muestras.

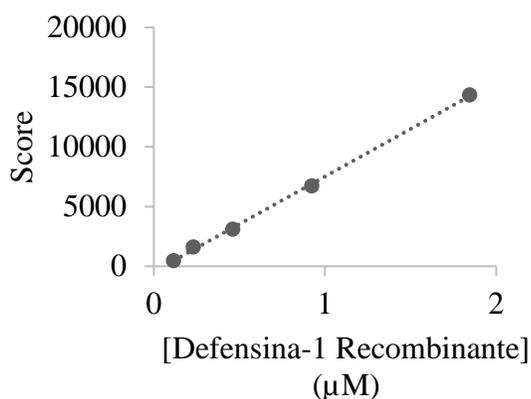


Figura 20. Curva de calibración pseudo-univariada de la defensina-1 recombinante para cuantificar la defensina-1 en las fracciones de 3 a 10 kDa.

Tabla 14. Parámetros de calidad del calibrado de orden 2 para cuantificar defensina-1 en las fracciones de 3 a 10 kDa de miel

Parámetro de Calidad	Valor					
	Autopredicción		Grupo 1		Grupo 2	
r	0,9996		-		-	
$S_{y/x}$	0,015 µM	0,21 mg/Kg de miel	0,0075 µM	0,11 mg/Kg de miel	0,014 µM	0,20 mg/Kg de miel
LOD	0,050 µM	0,69 mg/Kg de miel	0,025 µM	0,35 mg/Kg de miel	0,047 µM	0,66 mg/Kg
LOQ	0,15 µM	2,1 mg/Kg de miel	0,075 µM	1,1 mg/Kg de miel	0,14 µM	2,0 mg/Kg de miel

El coeficiente de correlación para el calibrado (Score = 7967,6 [Defensina-1 Recombinante] - 448,792) fue 0,9996, lo cual indica una alta correlación lineal entre las variables y una gran variabilidad de la respuesta explicada mediante el calibrado. La $S_{y/x}$ del modelo de calibración fue 0,015 μM (equivalente a 0,21 mg/Kg) y consecuentemente, el LOD fue 0,050 μM (equivalente a 0,69 mg/Kg) y el LOQ de 0,15 μM (equivalente a 2,1 mg/Kg). Cuando se hizo la predicción sobre el grupo 1 de muestras se obtuvo un LOD y un LOQ menores a los de la autopredicción. Esto podría deberse, por un lado, al hecho de que en estas muestras existe una superposición espectral de los componentes 1 y 2 (este último asociado a defensina-1), y que, por otro lado, el componente 1 es más intenso que el componente 2 (Figura 19B), por lo que estaría elevando el valor de *score* del componente 2, lo que se traduce en una pendiente y una sensibilidad aparentemente mayores. En el grupo 2 de muestras, en cambio, los LOD y LOQ fueron similares a los de la autopredicción porque no existe esta gran superposición entre los distintos componentes. Finalmente, los LOD y LOQ de la autopredicción fueron considerados para la cuantificación de defensina-1 en las muestras, donde los valores obtenidos fueron normalizados por el contenido de proteínas en las mismas (Tabla 15).

Tabla 15. Contenido de defensina-1 en las muestras de miel de la V Región calculado a partir de la calibración de orden 2 utilizando defensina-1 recombinante

Muestra	Grupo	[Defensina-1] (mg/kg miel)	[Proteínas totales] (mg/kg miel)	% Defensina-1 (de proteínas totales)	Mediana por zona	Promedio por apiario ± desviación estándar	Muestra	Grupo	[Defensina-1] (mg/kg miel)	[Proteínas totales] (mg/kg miel)	% Defensina-1 (de proteínas totales)	Mediana por zona	Mediana por apiario
CB1	1	48	2386	2,0	1,5	2± 2	CQ1	2	5,9	1174	0,50	0,75	1,1
CB2	1	10	2476	0,41			CQ2	2	16	1438	1,1		
CB3	1	103	2202	4,7			CQ3	2	23	880	2,6		
CB4	1	31	2064	1,5		2,4 ± 0,9	CQ4	2	4,5	1666	0,27		0,27
CB5	1	53	2328	2,3			CQ5	2	3,4	1596	0,21		
CB6	1	36	1085	3,3			CQ6	2	4,7	1525	0,31		
CB7	2	5,6	1684	0,33		0,6 ± 0,6	CQ7	2	< 0,69	822	-		1,1
CB8	1	23	1809	1,3			CQ8	2	8,6	834	1,0		
CB9	2	4,7	1866	0,25			CQ9	2	9,9	796	1,2		
CP1	2	4,2	1143	0,37	0,37	0,40 ± 0,07	Q1	2	3,5	2256	0,16	0,46	0,26
CP2	2	5,5	1593	0,34			Q2	2	5,8	2267	0,26		
CP3	2	6,5	1365	0,48			Q3	2	6,5	1420	0,46		
CP4	2	5,8	1527	0,38		0,41 ± 0,08	Q4	2	7,5	1151	0,65		0,18
CP5	2	4,3	1244	0,34			Q5	2	2,8	1834	0,15		
CP6	2	8,2	1630	0,50			Q6	2	3,1	1765	0,18		
CP7	2	4,7	1031	0,45		0,3 ± 0,1	Q7	1	57	1417	4,0		1,1
CP8	2	4,7	1792	0,26			Q8	2	14	1634	0,85		
CP9	2	3,0	1195	0,25			Q9	1	22	1916	1,1		

La defensina-1 pudo ser cuantificada en 35 (97%) de las muestras, registrando valores entre 3,0 (CP9, de Panquehue) y 103 (CB3, de Casablanca) mg/Kg de miel y mostrando una mediana de 6,5 mg/Kg. Al normalizar el contenido de este péptido por el valor de las proteínas totales, se tuvo que en 35 (97%) de las muestras la defensina-1 equivale entre el 0,2 a 4,7% de las proteínas totales, con una mediana de 0,46%. Los valores obtenidos para defensina-1 con el método FT/MCR-ALS son algo superiores a los reportados por Valachová y cols., 2016, para mieles eslovacas (0,04-5,17 mg/kg, equivalentes a 0,01-1,23% de las proteínas totales). Esta diferencia se debería a una posible sobreestimación de la defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de las mieles, ya que el método aquí descrito no lograría discriminarla de otros péptidos que contengan triptófano.

Para determinar si existen diferencias significativas en el porcentaje de defensina-1 calculado a partir del método de calibración de orden 2 (FT/MCR-ALS) entre las diferentes zonas de muestreo, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. No se encontraron diferencias

estadísticamente significativas entre las medianas de las zonas estudiadas. Este análisis o un ANOVA aplicado a apiarios de una misma zona arrojó el mismo resultado, lo que indicaría que el origen geográfico no tendría efecto en esta variable (Figura 21) y que su variación estaría asociada a factores genéticos/epigenéticos de las abejas, ya que Majtan y cols., 2012 encontraron que la expresión de defensina-1 es constitutiva, pero variable en abejas, y cuya variación está correlacionada con los contenidos variables de la defensina-1 en productos las abejas como la miel y la jalea larval.

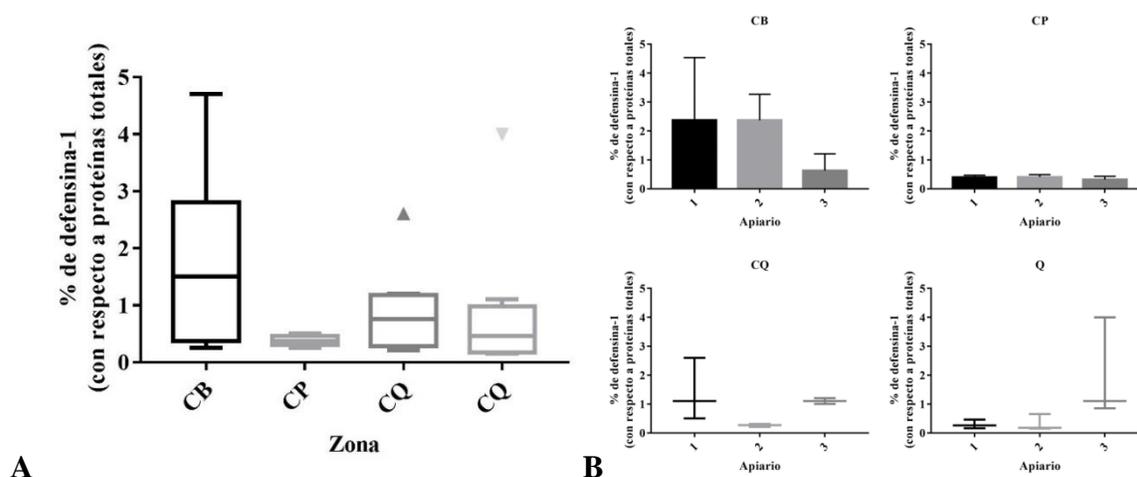


Figura 21. Distribución del porcentaje de defensina-1 a partir del método de calibración de orden 2 (FT/MCR-ALS) en mieles de la V región según A: zona y B: apiarios por zona. CB: n=9, CP: n=9, CQ: n=8 y Q: n=9. Se utilizó la prueba de Dunn de comparaciones múltiples para identificar las diferencias estadísticamente significativas con un 95% de nivel de confianza.

1.8 Cuantificación de defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de la miel a través de HPLC con detector de fluorescencia

Se evaluó un método de análisis que permitiera una determinación más sensible y específica de la defensina-1. Para ello las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles fueron analizadas a través de HPLC en fase reversa acoplado a un detector de fluorescencia, de acuerdo con Rees y cols., 1997, con las modificaciones descritas en la sección de Métodos. Como se observa en la Figura 22, bajo las condiciones descritas, la defensina-1 recombinante presentó un pico cromatográfico a 4,68 minutos (traza verde), el cual también está presente en las muestras de miel y por ello es atribuible al péptido. Las mieles presentaron varios picos adicionales, entre

ellos uno a 6,5 minutos coincidente con el obtenido en los ensayos preliminares de glicación/fructación de la defensina-1 recombinante, por lo que correspondería a una forma glicada/fructada de este analito en las muestras. Indudablemente se requieren más estudios en esta dirección.

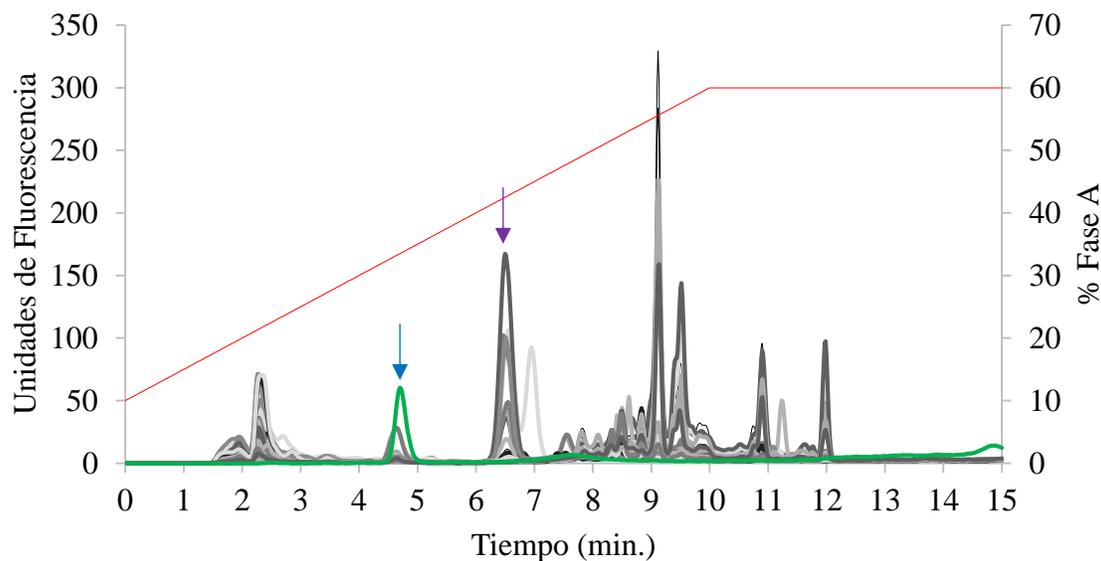


Figura 22. Cromatogramas de las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles de la V Región, registrados a 280 nm de excitación y 340 nm de emisión. Líneas grises: cromatogramas de las 36 muestras, línea roja: % de acetonitrilo y línea verde: cromatograma de defensina-1 recombinante a 4 nM. Flecha azul: señal asociada a la defensina-1. Flecha violeta: señal asociada a la defensina-1 glicada/fructada.

Para caracterizar espectroscópicamente el pico cromatográfico correspondiente a la defensina-1, tanto las muestras como la defensina-1 pura fueron analizadas en modo *scan*. Tanto en las muestras como en la defensina-1 recombinante, la señal a 4,68 minutos tuvo un máximo en emisión de 340 nm, como se muestra en la Figura 23. Esto indicaría que la defensina-1 en la miel tiene sólo un triptófano y no una tirosina adicional como la royalisina-F, isoforma que se encuentra en la jalea real (Klaudiny y cols., 2005), ya que carece del máximo de emisión a 300 nm, que es característico de la tirosina. Esta información podría dar cuenta de la isoforma de la defensina-1 en la miel, ya que no ha sido descrita en detalle.

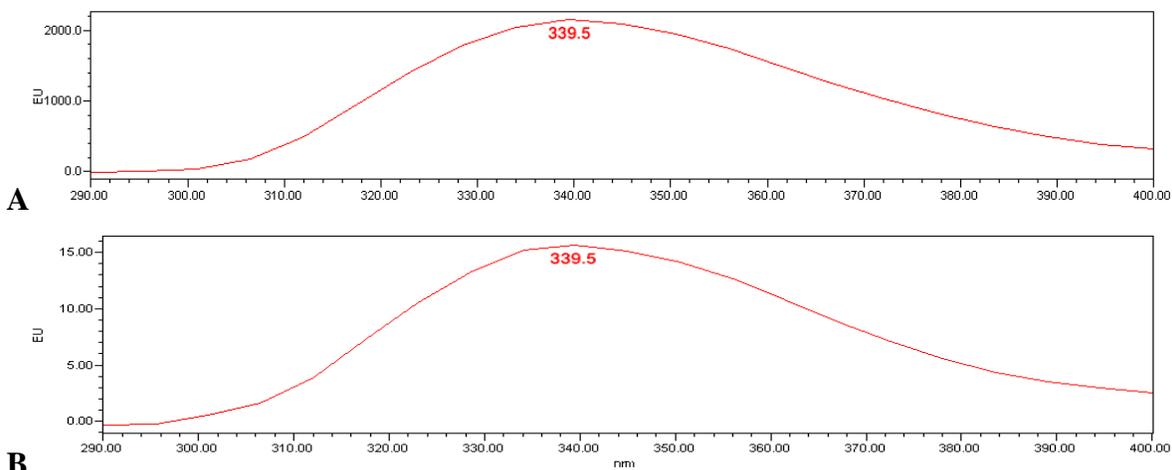


Figura 23. Espectro de emisión de la señal cromatográfica obtenida a 4,68 minutos asociada a la defensina-1. A: defensina-1 pura, B: defensina-1 de una muestra CB9.

Se llevó a cabo la cuantificación de la defensina-1 en las muestras. Para ello se hizo una curva de calibrado con distintas concentraciones de defensina-1, abarcando 2 órdenes de magnitud (0,04, 0,4 y 4 nM), las cuales fueron analizadas con el programa cromatográfico descrito. La señal correspondiente a la defensina-1 fue integrada, obteniéndose su área, la cual fue utilizada para hacer una curva de calibrado (Figura 24) y obtener sus correspondientes parámetros de calidad (Tabla 16).

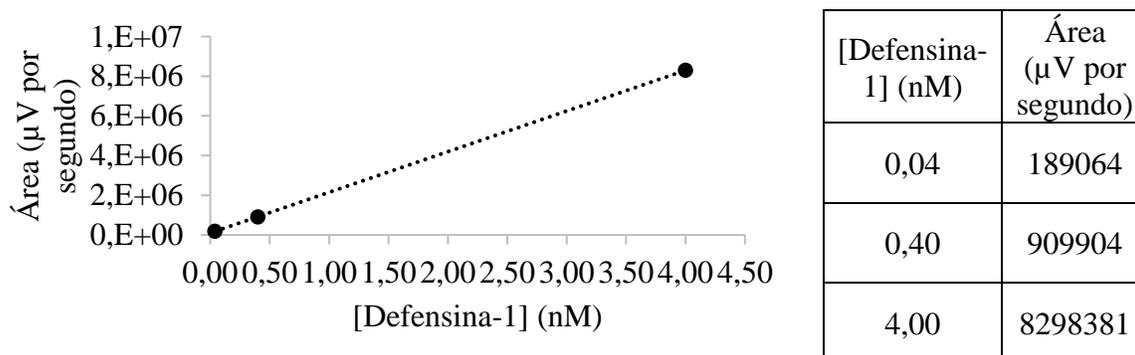


Figura 24. Curva de calibrado de orden cero de defensina-1 recombinante obtenida por cromatografía.

Tabla 16. Parámetros de calidad de la cuantificación de defensina-1 a través de HPLC

Parámetro de Calidad	Valor	
r	0,9999	
S _{y/x}	0,0074 nM	0,015 µg/Kg
LOD	0,024 nM	0,050 µg/Kg
LOQ	0,074 nM	0,15 µg/Kg

El coeficiente de correlación para el calibrado (Área = 2049650 [Defensina-1 Recombinante] + 98966,4) fue 0,9999, lo cual indica una alta correlación lineal entre las variables y una gran variabilidad de la respuesta explicada mediante el calibrado. La S_{y/x} del modelo de calibración fue 0,0074 nM (equivalente a 0,015 µg/Kg) y consecuentemente, el LOD fue 0,024 nM (equivalente a 0,050 µg/Kg) y el LOQ de 0,074 nM (equivalente a 0,15 µg/Kg).

Posteriormente, las áreas de la señal de 4,68 min fueron interpoladas en esta curva para obtener la concentración de defensina-1 en las muestras, información que se detalla en la Tabla 17.

Tabla 17. Contenido de defensina-1 en las muestras de miel de la V Región calculado con el método cromatográfico

Muestra	[Defensina-1] (µg/Kg miel)	[Proteínas totales] (mg/kg miel)	% Defensina- 1	Mediana por zona	Mediana por apiario	Muestra	[Defensina-1] (µg/Kg miel)	[Proteínas totales] (mg/kg miel)	% Defensina- 1	Mediana por zona	Mediana por apiario
CB1	1,8	2386	7,4x10 ⁻⁵	1,2x10 ⁻⁴	4,2x10 ⁻⁵	CQ1	<0,050	1174	-	4,6x10 ⁻⁵	4,6x10 ⁻⁵
CB2	0,24	2476	9,7x10 ⁻⁶			CQ2	0,65	1438	4,6x10 ⁻⁵		
CB3	<0,050	2202	-			CQ3	<0,15	880	-		
CB4	<0,050	2064	-		7,2x10 ⁻⁴	CQ4	0,17	1666	1,0x10 ⁻⁵		1,0x10 ⁻⁵
CB5	<0,050	2328	-			CQ5	<0,15	1596	-		
CB6	7,9	1085	7,2x10 ⁻⁴			CQ6	<0,050	1525	-		
CB7	<0,050	1684	-		1,7x10 ⁻⁴	CQ7	0,40	822	4,9x10 ⁻⁵		6,0 x10 ⁻⁵
CB8	<0,050	1809	-			CQ8	0,33	834	3,9x10 ⁻⁵		
CB9	3,1	1866	1,7x10 ⁻⁴			CQ9	0,74	796	9,3x10 ⁻⁵		
CP1	<0,050	1143	-	2,8x10 ⁻⁵	1,7x10 ⁻⁵	Q1	<0,050	2256	-	2,6x10 ⁻⁵	1,8x10 ⁻⁵
CP2	0,32	1593	2,0x10 ⁻⁵			Q2	<0,050	2267	-		
CP3	0,18	1365	1,3x10 ⁻⁵			Q3	0,25	1420	1,8x10 ⁻⁵		
CP4	<0,050	1527	-		5,6x10 ⁻⁵	Q4	0,93	1151	8,0x10 ⁻⁵		4,6 x10 ⁻⁵
CP5	0,94	1244	7,6x10 ⁻⁵			Q5	0,21	1834	1,2x10 ⁻⁵		
CP6	0,59	1630	3,6x10 ⁻⁵			Q6	<0,050	1765	-		
CP7	<0,050	1031	-		-	Q7	<0,050	1417	-		8,3 x10 ⁻⁵
CP8	<0,050	1792	-			Q8	2,3	1634	1,4x10 ⁻⁴		
CP9	<0,050	1195	-			Q9	0,49	1916	2,6x10 ⁻⁵		

Con respecto al contenido de defensina-1, 18 muestras (50%) tuvieron resultados sobre el LOQ del método, cuyos valores van de 0,17 (CQ4, de Concón) a 7,9 $\mu\text{g/Kg}$ (CB6, de Casablanca) de miel y cuya mediana fue 0,54 $\mu\text{g/Kg}$ de miel. Al ser normalizada por el contenido de proteínas, los valores fluctuaron entre $9,7 \times 10^{-6}$ y $7,2 \times 10^{-4}\%$ de las proteínas totales, con una mediana de $4,2 \times 10^{-5}\%$. De acuerdo con lo descrito por Valachová y cols., 2016, la concentración de este péptido en mieles eslovacas fue de 40-5170 $\mu\text{g/Kg}$ (0,01-1,23% de las proteínas totales), siendo valores bastante mayores a los obtenidos para las muestras analizadas por el método aquí descrito.

En el trabajo de Valachová y cols., 2016 utilizan el método ELISA competitivo (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), en donde la defensina-1 de la muestra compite con una defensina-1 sintética marcada para unirse a una cantidad limitada de anticuerpo. Cuanto mayor es la concentración de la defensina-1 en la muestra, más débil es la señal obtenida. El anticuerpo utilizado es policlonal, es decir, es una mezcla de anticuerpos que se unen con variada afinidad a distintas partes (epítomos) del extremo carbonilo de la defensina-1 (cuya secuencia aminoacídica es CRKTSFKDLWDKRFG), lo que, por un lado, tiene la desventaja de que un compuesto con una estructura similar pueda presentar reactividad cruzada y, por otro lado, no permite diferenciar aquellas modificaciones estructurales que pudiesen haber en la secuencia no detectada por el anticuerpo. Con el método cromatográfico aquí descrito, en cambio, se utiliza como patrón un equivalente de la defensina-1 completa, que tiene la ventaja de ser un analito con una estructura casi idéntica al que se presenta en las muestras. Además, el mismo procedimiento cromatográfico permite separar los interferentes presentes en la muestra, así como las posibles especies del analito con modificaciones estructurales (como glicación, fructación y/o formación de aductos).

Por lo tanto, es posible que mediante ELISA se detecte un total de defensina-1 en miel, mientras que por este método cromatográfico se cuantifique la versión sin modificaciones estructurales de la defensina-1, lo que por un lado explicaría la diferencia de magnitudes entre los valores reportados por cada método. Por otro lado, indicaría que gran parte de la defensina-1 presente en la miel se encuentra en una forma modificada (glicada, fructada o formando parte de aductos) y posiblemente con su capacidad antimicrobiana alterada, como

lo reportado por Kiselar y cols., 2015, quienes observaron que la β -defensina-2 humana en presencia de metilglioxal y glioxal, sustancias que aumentan en condiciones de hiperglicemia, forma parte de aductos, lo que provoca la pérdida de su actividad antimicrobiana.

Para determinar si existen diferencias significativas en el porcentaje de defensina-1 calculado a partir del método cromatográfico entre las diferentes zonas de muestreo, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de las zonas estudiadas. Este análisis aplicado a apiarios de una misma zona arrojó el mismo resultado, lo que indicaría que el origen geográfico no tiene efecto en esta variable (Figura 25) y que su variación estaría asociada a factores genéticos/epigenéticos de las abejas (ya observado en la defensina-1 determinada mediante FT/MCR), según lo descrito por Majtan y cols., 2012.

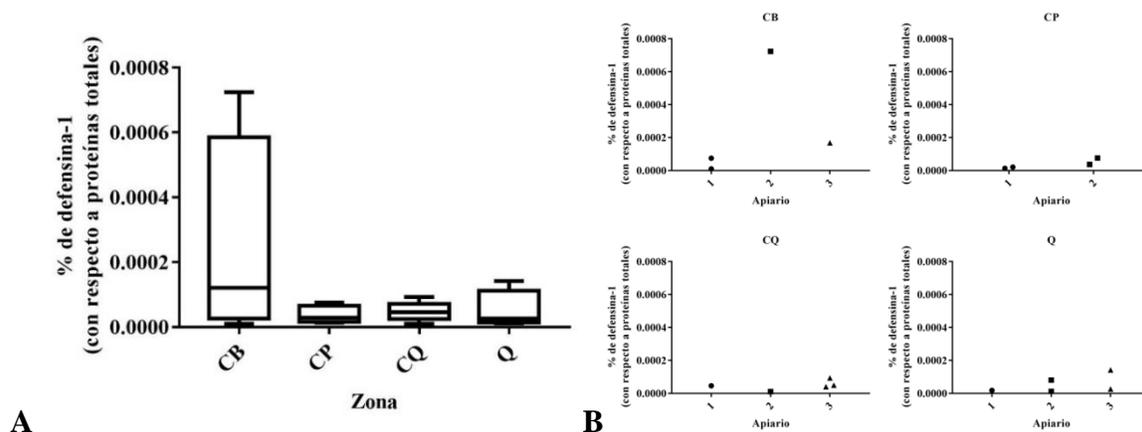


Figura 25. Distribución del porcentaje de defensina-1 a partir del método cromatográfico en mieles de la V región según A: zona y B: apiarios de la misma zona. CB: n=4, CP: n=4, CQ: n=5 y Q: n=5. Se utilizó la prueba de Dunn de comparaciones múltiples para identificar las diferencias estadísticamente significativas entre zonas con un 95% de nivel de confianza.

1.9 Actividad antimicrobiana de la miel

La actividad antimicrobiana de la miel puede variar dependiendo de su fuente geográfica, estacional y botánica, así como de las condiciones de cosecha, procesamiento y almacenamiento. Por lo tanto, la CIM de la miel puede variar desde concentraciones <3% a

50% y superiores (Mandal y Mandal, 2011). Es por esto que en una primera instancia se midió la actividad antimicrobiana de 5 mieles de prueba de distintos orígenes geográficos frente a *Pseudomona aeruginosa* ATCC® 27853™ y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (aislado clínico), con el objetivo de establecer un rango de concentraciones en las cuales se suele presentar el efecto antimicrobiano de la miel. Para ello se decidió utilizar el método de microdilución, según Sherlock y cols, 2010, en donde la densidad óptica se utilizó como medida del crecimiento bacteriano. En la Tabla 18 se muestran los porcentajes de inhibición para las distintas mieles de prueba y las bacterias seleccionadas.

Tabla 18. Porcentajes de inhibición de mieles de prueba frente a las cepas bacterianas seleccionadas

Muestra	Concentración de miel (% m/v)	Inhibición de crecimiento (%)	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Miel 1	50	100	101
	25	99,0	101
	13	80,5	101
	6,3	18,9	98,5
	3,1	-21,7	29,5
Miel 2	50	100	100
	25	98,7	98,7
	13	-17,1	98,3
	6,3	-23,5	14,1
	3,1	-26,9	-6,3
Miel 3	50	99,4	101
	25	98,5	100
	13	-18,9	99,5
	6,3	-25,3	-4,1
	3,1	-31,0	-4,3
Miel 4	50	100,0	101
	25	43,3	99,0
	13	4,5	32,6
	6,3	-24,2	9,8
	3,1	-29,2	9,1
Miel 5	50	100,0	102
	25	-8,2	100
	13	-8,7	99,3
	6,3	-25,2	59,6
	3,1	-38,6	38,3

Como se observa en la Tabla 18, los porcentajes de inhibición disminuyen a medida que la concentración de miel también lo hace. También existen porcentajes de inhibición mayores a 100%, los que se dan cuando la DO es negativa, la que al ser restada al control positivo genera un valor superior a la DO del control. Por último, también se dan porcentajes de inhibición negativos cuando las concentraciones de miel son bajas, lo que indica que la miel a esas concentraciones promueve el crecimiento de la bacteria. De acuerdo con estos resultados, ciertas mieles presentarían el fenómeno de hormesis, en donde ciertos agentes inhibidores son capaces de estimular el crecimiento cuando están en concentraciones bajas. Este fenómeno se ha visto para varias especies y tipos de agentes inhibidores (Stebbing, 1982). En la Tabla 19 se muestran las CIMs de cada miel y bacteria, las cuales corresponden a aquellas concentraciones con un porcentaje de inhibición $\geq 80\%$ (CLSI, 2012).

Tabla 19. CIM de las mieles de prueba frente a las cepas bacterianas seleccionadas

Muestra	CIM (% m/v)	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Miel 1	13	6,3
Miel 2	25	13
Miel 3	25	13
Miel 4	50	25
Miel 5	50	13

De acuerdo con estos resultados (Tabla 19), las CIMs de las mieles contra *S. aureus* variaron entre 6,3 y 25% m/v, las cuales son similares a las obtenidas por Brudzynski y Lannigan, 2012, quienes midieron la actividad antimicrobiana de 8 mieles de distintos orígenes botánicos frente a esta misma bacteria, las cuales presentaron CIMs entre 6,25 y 25% v/v, que equivalen a 9,1 y 36% m/v si se considera que la miel tiene una densidad de 1,45 g/mL (Tomasik, 2003). Las CIMs contra *P. aeruginosa* variaron entre 13 y 50% m/v, las cuales son similares a las obtenidas por Zainol y cols., 2013, en donde las 6 mieles de distintos orígenes botánicos que utilizaron mostraron CIMs entre 10 y 25% m/v contra esta bacteria. Puesto que en el caso de *P. aeruginosa* una de las CIMs más frecuente fue 25% m/v y en relación a *S. aureus* ésta correspondió a 13% m/v, se decidió determinar el porcentaje de inhibición de las mieles de la V Región siendo diluidas estas concentraciones. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Porcentajes de inhibición de mieles de la V Región frente a las bacterias seleccionadas (diluidas al 25% m/v en el caso de *P. aeruginosa* y al 13% m/v en el caso de *S. aureus*)

Muestra	Inhibición de crecimiento (%)		Muestra	Inhibición de crecimiento (%)	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
CB1	63,5	58,2	CQ1	99,1	98,1
CB2	75,8	100	CQ2	94,4	92,1
CB3	74,4	61,8	CQ3	94,2	94,9
CB4	99,9	102	CQ4	100	98,1
CB5	99,8	99,1	CQ5	56,2	49,8
CB6	99,4	99,4	CQ6	99,5	97,8
CB7	39,7	99,4	CQ7	-11,9	24,7
CB8	98,8	90,7	CQ8	89,7	99,0
CB9	103	102	CQ9	100	99,9
CP1	101	101	Q1	99,9	99,9
CP2	99,5	101	Q2	99,3	98,7
CP3	28,2	65,1	Q3	99,6	100
CP4	101	98,8	Q4	99,7	99,9
CP5	101	101	Q5	103	74,1
CP6	95,7	96,3	Q6	99,7	99,6
CP7	98,9	100	Q7	99,4	99,6
CP8	99,6	102	Q8	100	100
CP9	99,3	97,0	Q9	99,7	99,4

De acuerdo con la Tabla 20, la mayoría de las muestras (83% de total) en las diluciones seleccionadas son capaces de inhibir por completo el crecimiento de las cepas seleccionadas. Puesto que se midió el porcentaje de inhibición para un solo valor de concentración de miel, sin utilizar otro antimicrobiano de referencia, para comparar la actividad antimicrobiana entre las distintas muestras se le asignó arbitrariamente un valor de 1 al porcentaje de inhibición de la muestra CB1, de esta manera se obtiene la actividad antimicrobiana relativa con respecto al valor de esta muestra, lo que permite hacer comparaciones entre las distintas mieles (Janakat y cols., 2015). Los resultados se muestran en la Tabla 21 y 22 para *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente.

Tabla 21. Actividad antimicrobiana relativa de mieles de la V Región frente a *P. aeruginosa* (diluidas al 25% m/v)

Muestra	Actividad antimicrobiana relativa	Mediana por zona	Mediana por apiario	Muestra	Actividad antimicrobiana relativa	Mediana por zona	Mediana por apiario
CB1	1,00	1,56	1,17	CQ1	1,56	1,49	1,51 ± 0,04*
CB2	1,20			CQ2	1,49		
CB3	1,17			CQ3	1,49		
CB4	1,58		1,57	CQ4	1,58		1,4 ± 0,4*
CB5	1,57			CQ5	0,885		
CB6	1,57			CQ6	1,57		
CB7	0,625		1,56	CQ7	-0,187		0,9 ± 0,9*
CB8	1,56			CQ8	1,41		
CB9	1,62			CQ9	1,58		
CP1	1,59	1,57	1,57	Q1	1,57	1,57	1,57
CP2	1,57			Q2	1,56		
CP3	0,444			Q3	1,57		
CP4	1,59		1,59	Q4	1,57		1,57
CP5	1,59			Q5	1,63		
CP6	1,51			Q6	1,57		
CP7	1,56		1,57	Q7	1,57		1,57
CP8	1,57			Q8	1,57		
CP9	1,57			Q9	1,57		

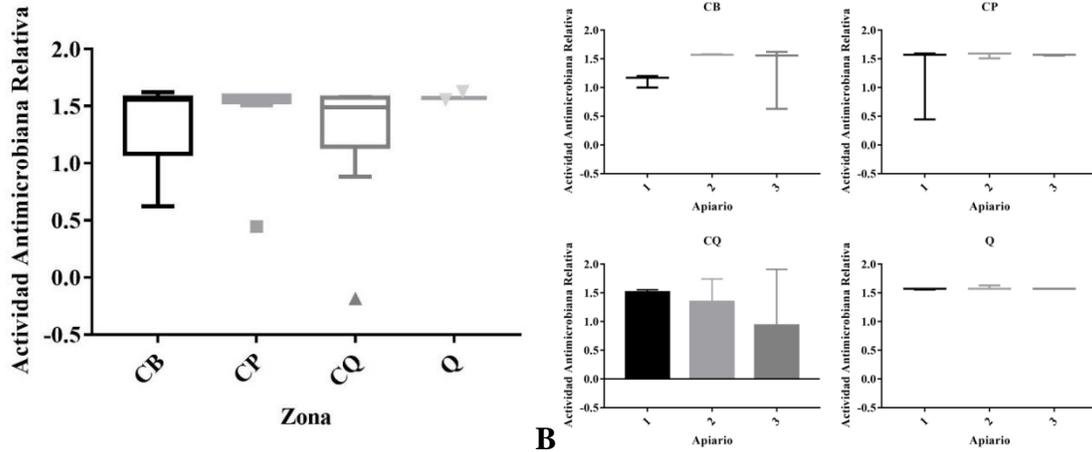
*: promedio ± desviación estándar por apiario

Tabla 22. Actividad antimicrobiana relativa de mieles de la V Región frente a *S. aureus* (diluidas al 13% m/v)

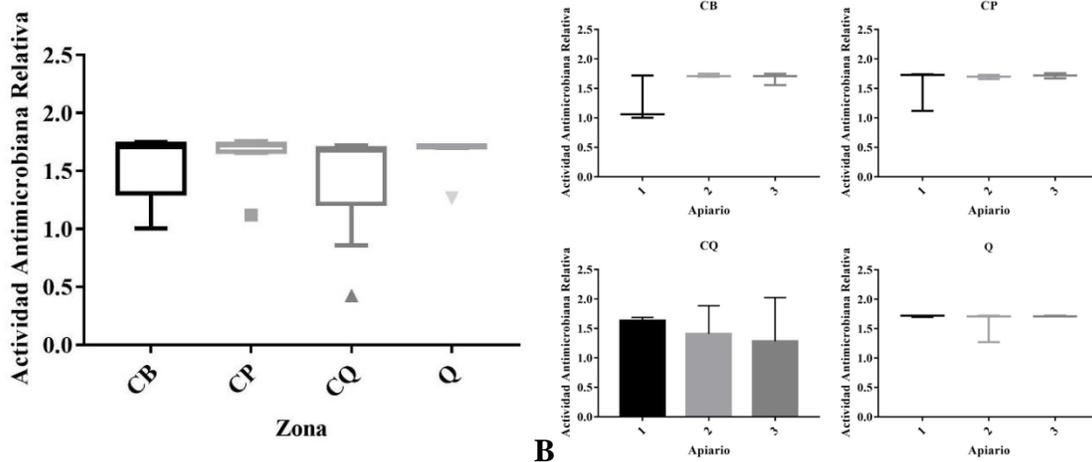
Muestra	Actividad antimicrobiana relativa	Mediana por zona	Mediana por apiario	Muestra	Actividad antimicrobiana relativa	Mediana por zona	Mediana por apiario	
CB1	1,00	1,71	1,06	CQ1	1,69	1,68	1,63 ± 0,05*	
CB2	1,72			CQ2	1,58			
CB3	1,06			CQ3	1,63			
CB4	1,75		1,71	CQ4	1,69		1,68	1,4 ± 0,4*
CB5	1,70			CQ5	0,856			
CB6	1,71			CQ6	1,68			
CB7	1,71		1,71	CQ7	0,424		1,68	1,2 ± 0,7*
CB8	1,56			CQ8	1,70			
CB9	1,75			CQ9	1,72			
CP1	1,73	1,72	1,73	Q1	1,72	1,71	1,72	
CP2	1,74			Q2	1,70			
CP3	1,12			Q3	1,72			
CP4	1,70		1,70	Q4	1,72		1,71	1,71
CP5	1,73			Q5	1,27			
CP6	1,66			Q6	1,71			
CP7	1,72		1,72	Q7	1,71		1,71	1,71
CP8	1,76			Q8	1,72			
CP9	1,67			Q9	1,71			

*: promedio ± desviación estándar por apiario

De acuerdo con la Tabla 21 y 22, la actividad antimicrobiana relativa varió entre -0,187 y 1,63, con una mediana de 1,57 para *P. aeruginosa* y entre 0,424 y 1,76, con una mediana de 1,71 para *S. aureus*. Para determinar si existen diferencias significativas en la actividad antimicrobiana relativa entre las diferentes zonas de muestreo, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de las zonas estudiadas para ambas bacterias (Figuras 26 y 27). Este análisis o un ANOVA aplicado a apiarios de una misma zona arrojó el mismo resultado. Ello que indicaría que el origen geográfico no tendría efecto en esta variable y que su variación podría estar asociada a otros factores no estudiados en este trabajo, como por ejemplo, el pH, el contenido de azúcares y compuestos de origen vegetal con actividad antimicrobiana (Couquet y cols., 2013).



A **B**
 Figura 26. Distribución de la actividad antimicrobiana relativa frente a *P. aeruginosa* en mieles de la V región según A. zona y B. apiario de una misma zona. Para A y B (CB, CP y Q) se utilizó la prueba de Dunn de comparaciones múltiples para identificar las diferencias estadísticamente significativas entre zonas con un 95% de nivel de confianza. Para CQ se utilizó un ANOVA con la prueba de Tukey.



A **B**
 Figura 27. Distribución de la actividad antimicrobiana relativa frente a *S. aureus* en mieles de la V región según A. zona y B. apiario de una misma zona. Para A y B (CB, CP y Q) se utilizó la prueba de Dunn de comparaciones múltiples para identificar las diferencias estadísticamente significativas entre zonas con un 95% de nivel de confianza. Para CQ se utilizó un ANOVA con la prueba de Tukey.

1.10 Actividad antimicrobiana de la fracción de 3 a 10 kDa de la miel

En una primera instancia, se midió la actividad antimicrobiana de las fracciones de 3 a 10 kDa de las 5 mieles de prueba frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus* con el objetivo de determinar su CIM, lo que se realizó a través del método de microdilución de forma muy similar a lo descrito en el punto 1.9. En la Tabla 23 se muestran los porcentajes de inhibición para las fracciones de las distintas mieles y la concentración de defensina-1 determinada por FT/MCR y HPLC.

Tabla 23. Porcentaje de inhibición frente a las bacterias seleccionadas de las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles de prueba y concentración de defensina-1 determinada por FT/MCR y HPLC

Muestra	[Defensina-1 por MCR-ALS] (mg/Kg)	[Defensina-1 por HPLC] (µg/Kg)	Inhibición frente a <i>P. aeruginosa</i> (%)	Inhibición frente a <i>S. aureus</i> (%)
M1	14	0,66	-78,0	42,7
M2	2,4	1,6	-88,7	49,7
M3	10	0,90	-91,3	50,5
M4	38	1,8	-80,5	44,8
M5	14	1,2	-104	51,8

Según lo descrito en la Tabla 23, las fracciones tienen porcentajes de inhibición negativos frente a *P. aeruginosa*, lo que significa que ayudan a la proliferación de esta bacteria. En cambio, frente a *S. aureus* los porcentajes de inhibición son positivos, pero menores al 80%, valor en el que se considera que la inhibición del crecimiento es completa. Se ha demostrado que la defensina-1 es eficaz contra bacterias Grampositivas (Fujiwara y cols., 1990). Sin embargo, no se observó una correlación entre la concentración de defensina-1 de las fracciones y su porcentaje de inhibición frente a *S. aureus*. Estos resultados podrían deberse a que, por un lado, existe una sustancia de forma constante en las fracciones que ayuda a la proliferación de la *P. aeruginosa* y que inhibe en cierto grado el crecimiento de *S. aureus*. Otra explicación es que la concentración de defensina-1 en las fracciones no sea la suficiente para inhibir por completo el crecimiento de las bacterias. Sojka y cols., 2016, obtuvieron una defensina-1 recombinante que redujo el recuento de colonias de *S. aureus* a concentraciones de 100 mg/L, mientras que para *P. aeruginosa* este efecto se vio a concentraciones de 1000 mg/L, siendo en ambos casos valores muy superiores a los presentes en las fracciones.

De acuerdo con estos resultados, se decidió seleccionar aquellas muestras de la V Región con concentraciones de defensina-1 superiores a 38 mg/Kg (por MCR-ALS) y/o 1,8 µg/Kg (por HPLC), que corresponde a la mayor concentración de las 5 muestras de prueba. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Porcentaje de inhibición frente a las bacterias seleccionadas de las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles de la V Región y concentración de defensina-1 determinada por FT/MCR y HPLC

Muestra	[Defensina-1 por MCR-ALS] (mg/Kg)	[Defensina-1 por HPLC] (µg/Kg)	% de inhibición frente a <i>P. aeruginosa</i>	% de inhibición frente a <i>S. aureus</i>
CB1	46	1,8	-105	44,1
CB5	60	<0,05	-112	47,1
CB6	36	7,9	-94,2	50,9
CB9	3,8	3,1	-129	52,7
Q7	68	<0,05	-70,4	48,2
Q8	20	2,3	-159	56,9

Nuevamente se observó que las fracciones tienen porcentajes de inhibición negativos frente a *P. aeruginosa*, y positivos, pero menores al 80%, frente a *S. aureus*. Tampoco hay correlación entre la concentración de defensina-1 de las fracciones y su porcentaje de inhibición. Estos resultados, en conjunto con los de las mieles de prueba y considerando que probablemente la defensina-1 glicada y/o fructada (que sería la forma que predomina en la miel) no presentaría actividad antibacteriana, estarían apoyando la hipótesis de que existe una sustancia de forma constante en las fracciones que ayuda a la proliferación de la *P. aeruginosa* y que inhibe en cierto grado el crecimiento de *S. aureus*. Probablemente se deba al pH ácido con el que quedan estas fracciones, ya que son preparadas a partir de soluciones de miel con HCl 1mM, o su fuerza iónica. En microbiología se utilizan sustancias en los medios de cultivo para seleccionar Gramnegativas de Grampositivas, es decir, que permiten el crecimiento de las primeras, mientras que inhiben a las segundas. Un ejemplo de estas sustancias son las sales biliares y el cristal violeta presentes en el medio MacConkey (Engelkirk y Duben-Engelkirk, 2008).

1.11 Análisis de componentes principales de las variables determinadas en miel

Se realizó un PCA con todas las variables medidas en las 36 muestras de la V Región. El modelo propuesto de 8 componentes explica el 95% de la variabilidad de las muestras. En la Figura 28 se presenta el gráfico conjunto de muestras y variables para los dos primeros componentes, los cuales explican el 34 y 20% de variabilidad, respectivamente. El gráfico muestra que, independientemente del origen geográfico, las muestras tienden a agruparse de acuerdo con algunas de las variables. Por ejemplo, la mayoría de las muestras se agrupa cerca del origen y en torno a las variables proteínas totales, prolina libre, actividad antimicrobiana relativa frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus*, furosina y riboflavina, lo que indicaría que ellas son homogéneas en cuanto al contenido de estos marcadores. Por otro lado, un grupo reducido de las muestras estaría relacionado con los contenidos de triptófano, % de defensina-1 por MCR-ALS y fenoles totales. El resto de las variables estarían explicando la variabilidad de muestras puntuales. La actividad antimicrobiana no está correlacionada con alguna de las variables aquí determinadas, por lo que es posible que se asocie a otras que no fueron medidas en este estudio. También destaca la correlación entre la concentración relativa de compuestos fenólicos, asociada a la fluorescencia de los ácidos cinámicos, y la actividad de la GOX a las 3 horas de incubación, lo que indicaría que posiblemente el origen del H₂O₂ en estas mieles está dado por estos compuestos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la concentración de H₂O₂ en miel está influenciada por otros factores no estudiados en este trabajo.

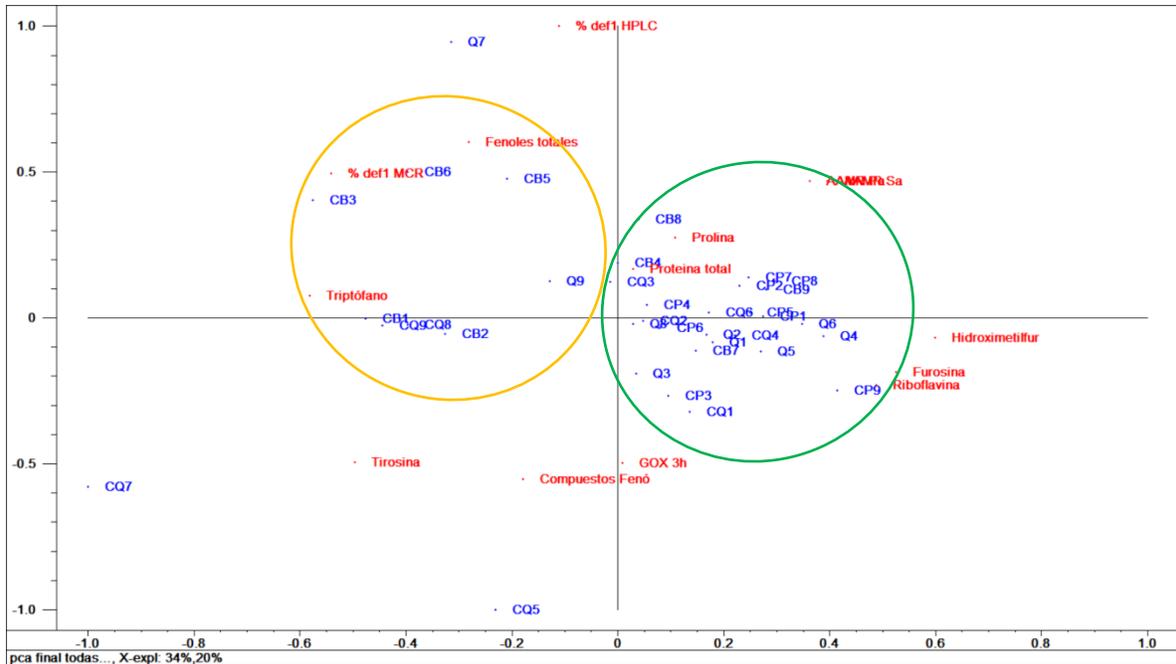


Figura 28. Mapa de las muestras de miel de la V Región y las variables medidas. Se muestran las muestras en azul y las variables en rojo. El componente principal 1 corresponde a la línea horizontal y el 2 a la vertical. El análisis se hizo con las variables centradas y estandarizadas.

Posteriormente, se decidió hacer nuevamente este mismo análisis, pero incluyendo sólo aquellas variables que mostraron diferencias significativas ya sea entre las distintas zonas, como entre algunos apiarios de una misma zona, las cuales correspondieron a prolina libre, proteínas totales y fenoles totales (Figura 29). Se obtuvo un modelo de 2 componentes que explica el 75% de la variabilidad de las muestras. En este caso se observa que las muestras se encuentran más dispersas y agrupadas de acuerdo con las zonas de las que provienen, por lo que este modelo permite identificar los grupos de muestras con un origen geográfico común de mejor forma que al considerar todas las variables medidas. Por lo tanto, la prolina libre, las proteínas totales y fenoles totales serían variables que dan cuenta de la variabilidad dada por el origen geográfico de las muestras, por lo que se proponen como marcadores del origen geográfico de las mieles de la V Región.

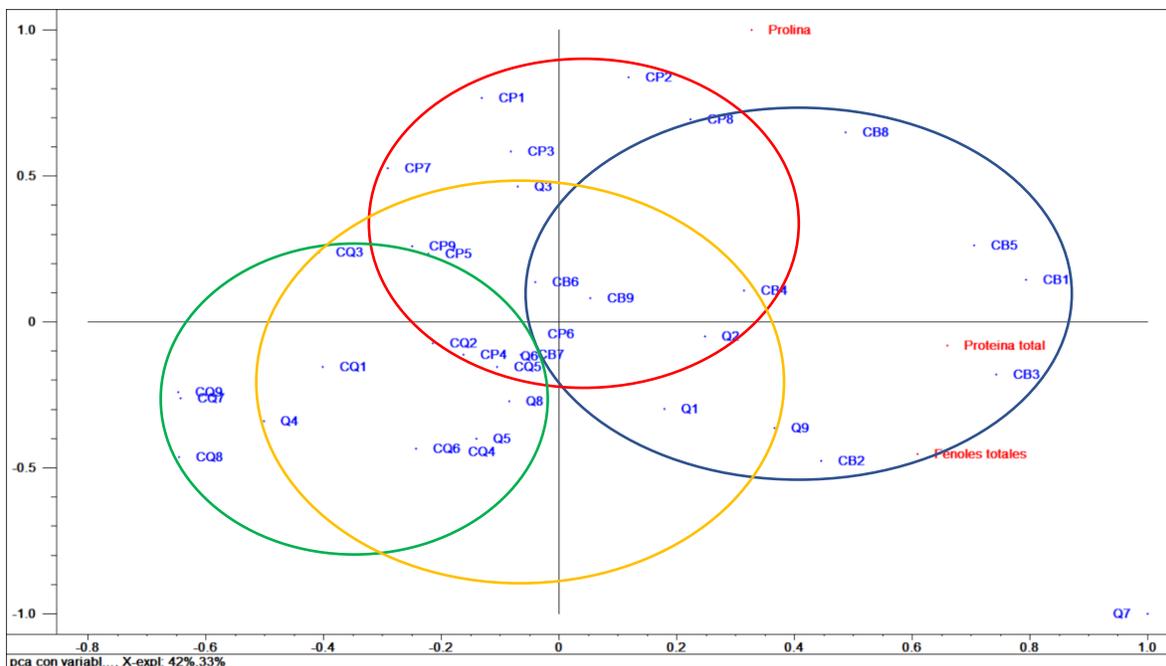


Figura 29. Mapa de las muestras de miel de la V Región y las variables asociadas a origen geográfico. Se muestran las muestras en azul y las variables en rojo. El componente principal 1 corresponde a la línea horizontal y el 2 a la vertical. El análisis se hizo con las variables centradas y estandarizadas. Los círculos agrupan muestras según el origen geográfico.

2. Análisis de miel colectada desde colmenas tratadas con HO21

2.1 Concentración de prolina libre en miel

En la Tabla 25 se muestra la concentración de prolina libre obtenida con la misma metodología utilizada en las mieles de la V Región.

Tabla 25. Concentración de prolina libre en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21

Día	Muestra	[Prolina libre] (mg/Kg), promedio ± desviación estándar	Muestra	[Prolina libre] (mg/Kg), promedio ± desviación estándar
0	C2A	215±11	C4A	89±0
14	C2B	272±22	C4B	157±3
21	C2C	478±6	C4C	558±10
49	C2D	313±6	C4D	420±3
56	C2E	401±5	C4E	455±2
63	C2F	531±15	C4F	466±0

Con respecto a la Tabla 25, la prolina libre mostró un aumento en ambas colmenas, alcanzando los 500 mg/kg aproximadamente al final del período. Sin embargo, al inicio la miel de la colmena 4 presentó la mitad de prolina que la colmena 2 (89 y 215 mg/Kg, respectivamente). También se observó que en el día 49 hubo una disminución con respecto al día 21, en donde se hizo la tercera y última aplicación. Para determinar si existen diferencias significativas entre la muestra del día 0 y las restantes se utilizó la prueba ANOVA. Se encontraron diferencias significativas en ambas colmenas a partir del día 14 (Figura 30). De acuerdo con estos resultados, la aplicación de HO21 tendría el efecto de aumentar la concentración de prolina libre en la miel, sin embargo, luego de suspender el tratamiento existe una disminución, por lo que este efecto se daría cuando HO21 está siendo aplicado. Finalmente, se observa que a partir del día 49 las colmenas se comportan de forma distinta, ya que en la colmena 2 se ve un aumento, mientras que en la 4 se mantiene el valor del día 49, lo que podría estar dando cuenta de la evolución propia de las colmenas.

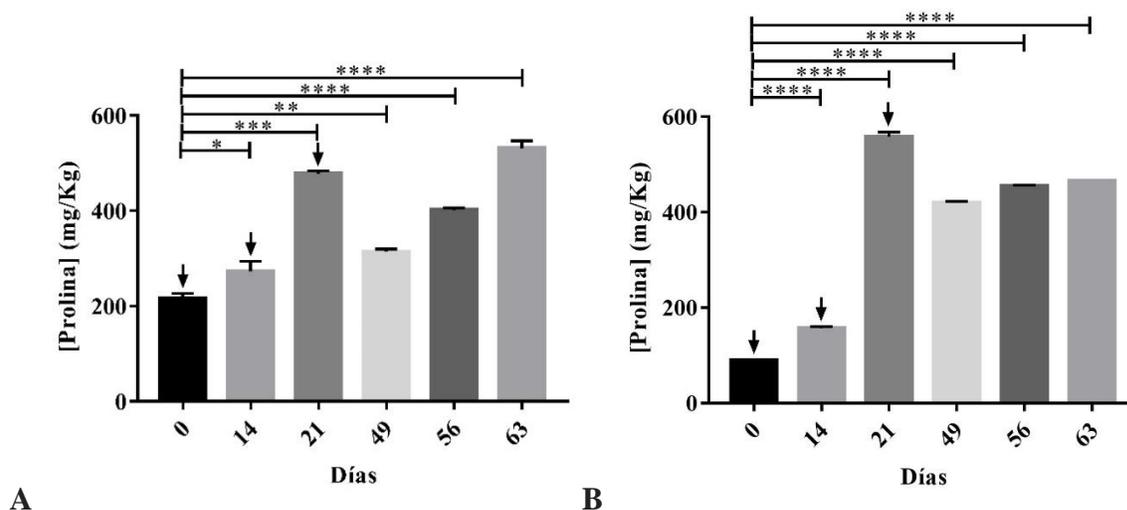


Figura 30. Concentración de prolina libre en mieles de colmenas tratadas con HO21. A: colmena 2 y B: colmena 4. Las flechas indican los días en los que se aplicó HO21. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas con la prueba de Tukey de comparaciones múltiples con un 95% de nivel de confianza (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$).

2.2 Concentración de proteínas totales en miel

En la Tabla 26 se muestra la concentración de proteínas totales obtenida con la misma metodología utilizada en las mieles de la V Región.

Tabla 26. Concentración de proteínas totales en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21

Día	Muestra	[Proteínas totales] (mg/kg), promedio \pm desviación estándar	Muestra	[Proteínas totales] (mg/kg), promedio \pm desviación estándar
0	C2A	731 \pm 194	C4A	297 \pm 27
14	C2B	1058 \pm 39	C4B	396 \pm 6
21	C2C	816 \pm 71	C4C	597 \pm 152
49	C2D	756 \pm 26	C4D	646 \pm 26
56	C2E	715 \pm 6	C4E	767 \pm 59
63	C2F	819 \pm 103	C4F	788 \pm 136

Con respecto a la Tabla 26, las proteínas totales se mantuvieron constantes en la colmena 2, con valores que fluctuaron entre 731 y 1058 mg/Kg, mientras que en la colmena 4 hubo un aumento progresivo, partiendo con 297 mg/Kg y alcanzando al final del período un valor similar a la colmena 2 (788 mg/Kg). De la misma forma que en los resultados de la prolina libre, la colmena 4 tuvo un valor al día 0 menor que la mitad del correspondiente a la colmena 2. Para determinar si existen diferencias significativas entre la muestra del tiempo 0 y las restantes se utilizó la prueba ANOVA. Se encontraron diferencias significativas sólo en la colmena 4 a partir del día 56 (Figura 31). De acuerdo con estos resultados, la aplicación de HO21 incrementaría significativamente el contenido de proteínas en la miel, solamente luego de varias aplicaciones y transcurrido un tiempo de maduración de la miel o de acumulación de éste en la colmena, pero este efecto depende además de las características de cada colmena, ya que se observó sólo en una.

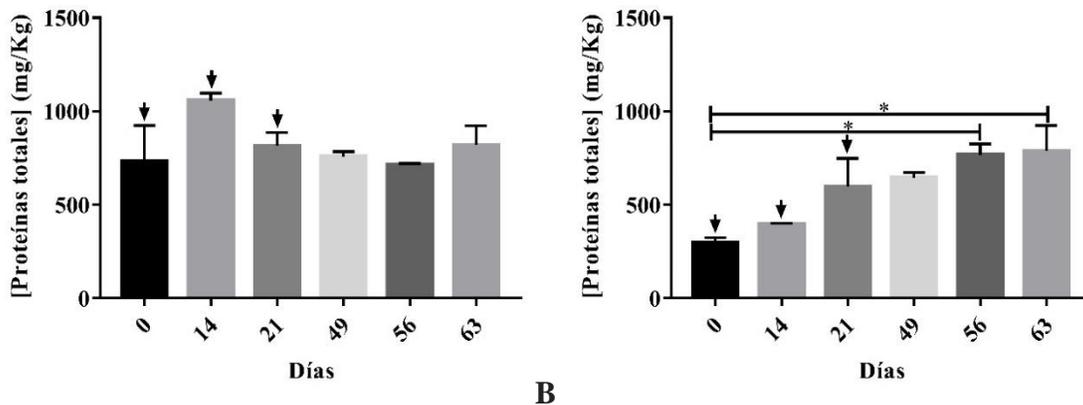


Figura 31. Concentración de proteínas totales en mieles de colmenas tratadas con HO21. A: colmena 2 y B: colmena 4. Las flechas indican los días en los que se aplicó HO21. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas con la prueba de Tukey de comparaciones múltiples con un 95% de nivel de confianza (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$).

2.3 Concentración de H₂O₂ en miel como reflejo de la actividad de GOX

En la Tabla 27 se muestra la actividad de GOX obtenida con la misma metodología utilizada en las mieles de la V Región.

Tabla 27. Actividad de GOX en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21

Día	Muestra	[H ₂ O ₂] (μg/g), promedio ± desviación estándar	Muestra	[H ₂ O ₂] (μg/g), promedio ± desviación estándar
0	C2A	12±1	C4A	36±2
14	C2B	8,7±0,9	C4B	10±2
21	C2C	14±2	C4C	22,0±0,7
49	C2D	36±1	C4D	9±1
56	C2E	30±1	C4E	44,0±0,6
63	C2F	37±3	C4F	39±0

Con respecto a la Tabla 27, la actividad de GOX previa a la aplicación fue mayor en la colmena 4 (36 μg/g) que en la colmena 2 (12 μg/g), pero en la colmena 4 decayó para luego volver a su valor inicial al día 63, mientras que en la colmena 2 mostró un aumento después de la tercera aplicación, con un valor de 37 μg/g. Para determinar si existen diferencias significativas entre la muestra del tiempo 0 y las restantes se utilizó la prueba ANOVA. Se encontraron diferencias significativas a partir del día 49 en la colmena 2 y desde el día 14 en la colmena 4 (Figura 32). De acuerdo con estos resultados, la aplicación repetida de HO21

incrementaría la actividad de GOX en la miel, pero este efecto sólo se observó luego de la tercera aplicación (días 49 y 56 para las colmenas 2 y 4, respectivamente). Sin embargo, el hecho de que en la colmena 4 se observara una gran disminución de la actividad de GOX luego de la primera aplicación de la composición biocida, indica que hay factores propios de cada colmena que influyen en la respuesta frente a este estímulo.

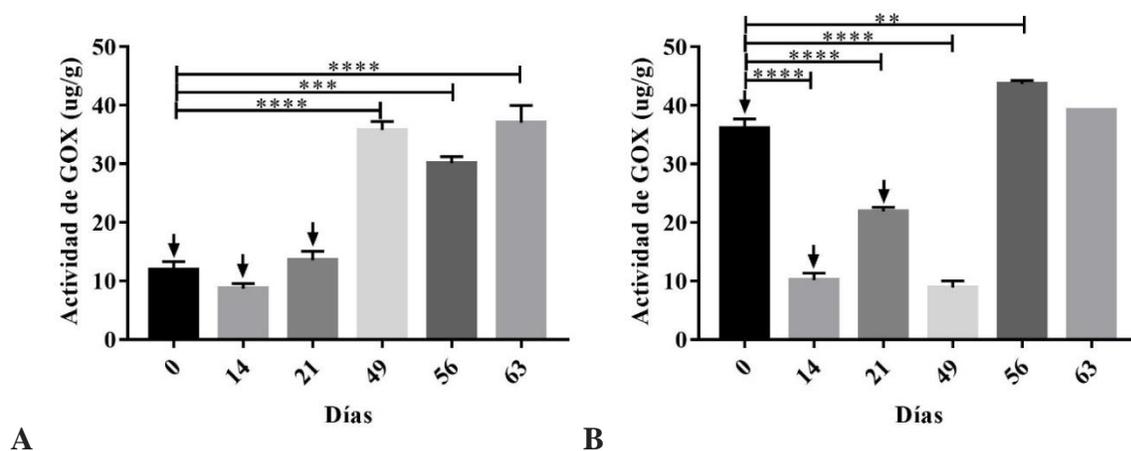


Figura 32. Actividad de GOX en mieles de colmenas tratadas con HO21. A: colmena 2 y B: colmena 4. Las flechas indican los días en los que se aplicó HO21. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas con la prueba de Tukey de comparaciones múltiples con un 95% de nivel de confianza (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$).

2.4 Fluorescencia total de la miel

A partir del análisis por MCR-ALS se extrajeron 4 componentes que permitieron describir adecuadamente los perfiles de fluorescencia de las mieles diluidas, los cuales se muestran en la Figura 32. No se obtuvieron señales asociadas a tirosina ni compuestos fenólicos, específicamente a los ácidos cinámicos, como en las mieles de la V Región. Es probable que esto se deba a un fenómeno de filtro interno, en el que la luz emitida por los compuestos fenólicos sea absorbida por otros compuestos, particularmente la riboflavina por ser el compuesto fluorescente principal en las muestras y cuyo espectro de excitación se solapa con el de emisión de los compuestos fenólicos (Figura 32 A y 11 B).

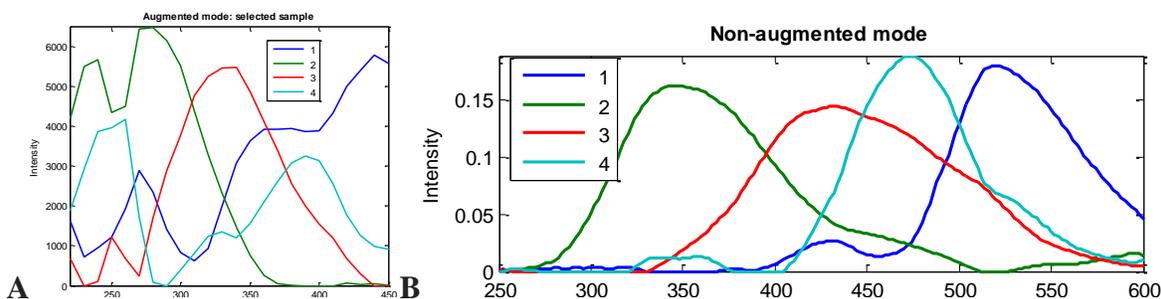


Figura 33. Espectros de excitación (A) y de emisión (B) promedio de los 4 componentes extraídos por MCR-ALS para las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21. La asignación de compuestos fluorescentes es la siguiente: riboflavina (azul), triptófano (verde), furosina (rojo), hidroximetilfurfural (cian).

En la Tabla 28 se muestra la concentración relativa de los 4 compuestos fluorescentes obtenidos por MCR-ALS y en la Figura 33 cómo varían con el tiempo para cada colmena. Se observa que la furosina se mantiene estable en ambas colmenas, mientras que el resto de los compuestos varía. Por ejemplo, el hidroximetilfurfural y el triptófano tienen una disminución luego de la segunda aplicación (día 21) en ambas colmenas y la riboflavina en la colmena 2 disminuye después de la primera aplicación (día 14), mientras que en la colmena 4 aumenta. De acuerdo con estos resultados, la aplicación de HO21 no tiene un efecto claro en estas variables. Al realizar un PCA con estas variables (Figura 34), se obtuvo un modelo de 3 componentes que explica el 97% de la variabilidad de las muestras. Se observa que el triptófano, el hidroximetilfurfural y la riboflavina están correlacionados, y estarían explicando la variabilidad de las muestras de la colmena 2 en el tiempo, mientras que la furosina estaría explicando la variabilidad de las muestras finales de la colmena 4.

Tabla 28. Concentración relativa de los compuestos fluorescentes extraídos de las mieles de colmenas tratadas con HO21

Día	Muestra	Riboflavina	Triptófano	Furosina	Hidroxiacetilfurfural
0	C2A	1,00	1,00	1,00	1,00
14	C2B	0,41	0,78	0,90	0,84
21	C2C	0,46	0,83	0,87	0,61
49	C2D	0,87	0,83	0,91	0,95
56	C2E	1,03	0,85	1,01	0,90
63	C2F	0,76	0,82	1,04	0,78
0	C4A	1,12	1,07	1,10	0,93
14	C4B	1,63	0,95	0,93	0,99
21	C4C	0,51	0,26	0,87	0,43
49	C4D	0,84	0,64	1,12	0,76
56	C4E	0,62	0,80	1,17	0,74
63	C4F	0,79	0,71	1,18	0,77

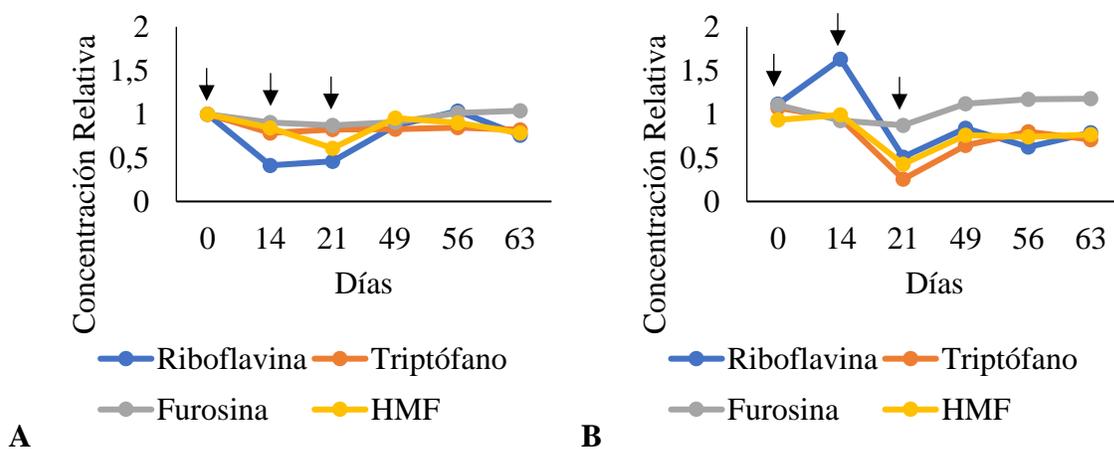


Figura 34. Concentración relativa de compuestos fluorescentes en mieles de colmenas tratadas con HO21. A: colmena 2 y B: colmena 4. Las flechas indican los días en los que se aplicó HO21.

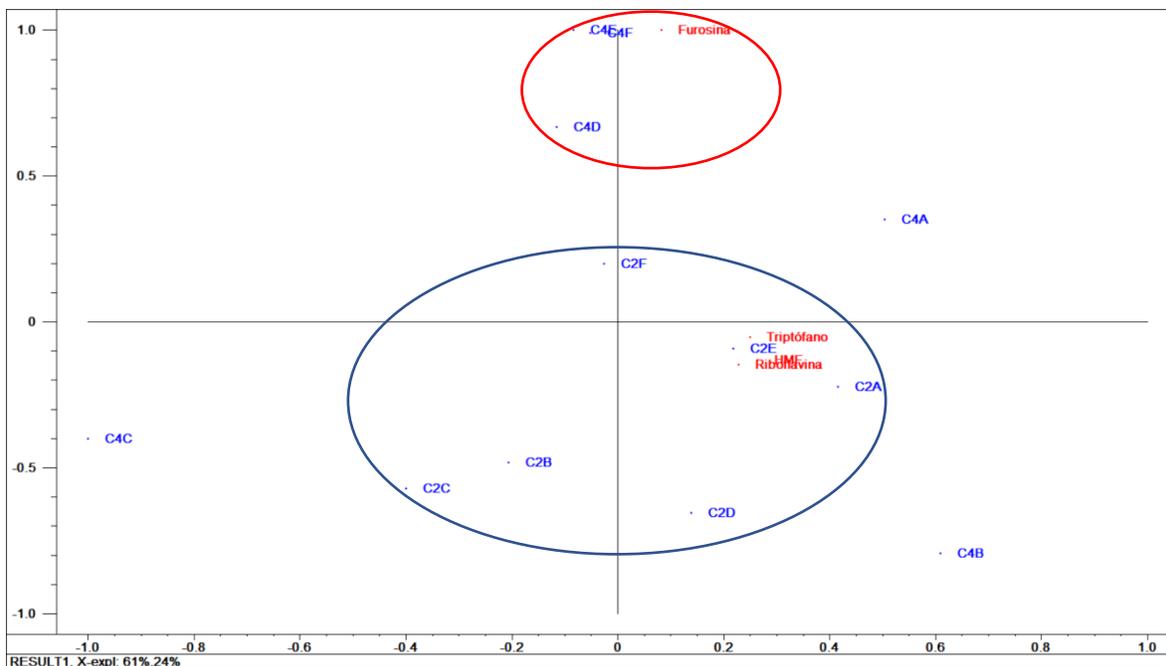


Figura 35. Mapa de las muestras y variables del PCA aplicado sobre la concentración relativa de los componentes fluorescentes extraídos para las mieles de colmenas tratadas con HO21. Se muestran las muestras en azul y las variables en rojo. El componente principal 1 corresponde a la línea horizontal y el 2 a la vertical. El análisis se realizó con las variables centradas y estandarizadas.

2.5 Concentración de fenoles totales en miel

En la Tabla 29 se muestra la concentración de fenoles totales obtenida con la misma metodología utilizada en las mieles de la V Región. Dado que en este caso la dilución de las muestras para registrar las EEM fue mayor que en análisis global de compuestos fluorescentes (0,5% m/v versus 10% m/v) el efecto de filtro interno antes mencionado se atenúa, observándose efectivamente fluorescencia asociada a los ácidos benzoicos, que es la que en este caso se utiliza para la cuantificación.

Tabla 29. Concentración de fenoles totales en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21

Día	Muestra	[Fenoles totales] (mg/Kg, equivalentes a ácido gálico), promedio \pm desviación estándar	Muestra	[Fenoles totales] (mg/Kg, equivalentes a ácido gálico), promedio \pm desviación estándar
0	C2A	755 \pm 9	C4A	604 \pm 7
14	C2B	1099 \pm 1	C4B	277 \pm 15
21	C2C	810 \pm 33	C4C	472 \pm 11
49	C2D	303 \pm 50	C4D	428 \pm 51
56	C2E	293 \pm 16	C4E	532 \pm 21
63	C2F	360 \pm 22	C4F	544 \pm 9

De acuerdo con lo descrito en la Tabla 29, en la colmena 2 entre los días 0 y 14 los fenoles totales muestran un aumento, mientras que en la colmena 4 se vio la situación inversa. En los días siguientes, los fenoles totales tendieron a disminuir en la colmena 2, mientras que en la colmena 4 volvieron a los valores iniciales. Para determinar si existen diferencias significativas entre la muestra del tiempo 0 y las restantes se utilizó la prueba ANOVA. Se encontraron diferencias significativas a partir del día 14 en ambas colmenas (Figura 35). Si bien en la colmena 2 la aplicación de HO21 se reflejó prontamente en un incremento de fenoles en la miel, en general el efecto de esta composición biocida sobre esta variable no es claro, a pesar de contener una cantidad importante de este tipo de compuestos. Esto corrobora que hay factores propios de cada colmena que influyen en la respuesta frente a este estímulo.

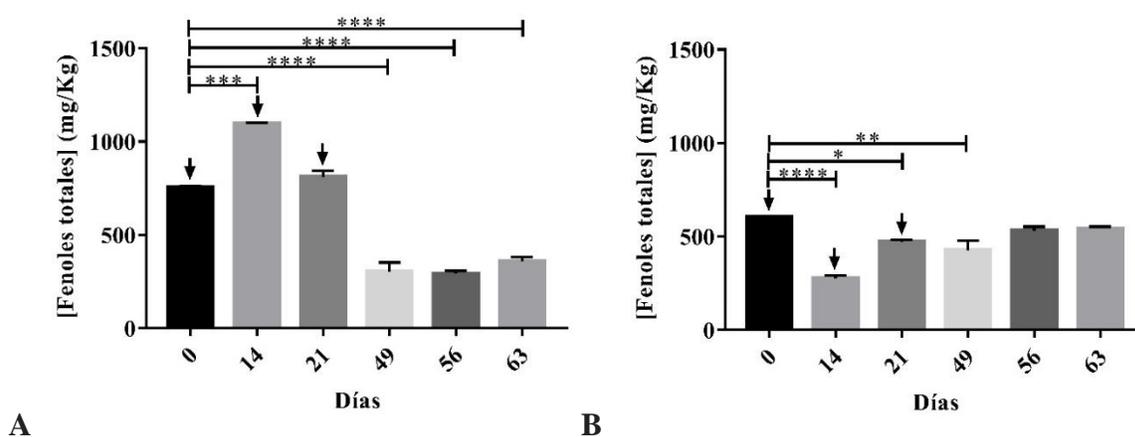


Figura 36. Concentración de fenoles totales en mieles de colmenas tratadas con HO21. A: colmena 2 y B: colmena 4. Las flechas indican los días en los que se aplicó HO21. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas con la prueba de Tukey de comparaciones múltiples con un 95% de nivel de confianza (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$).

2.6 Concentración de defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de la miel a través de fluorescencia total

En la Tabla 30 se muestra la concentración de defensina-1 obtenida con la misma metodología utilizada en las mieles de la V Región, la cual se normalizó por la concentración de proteínas totales.

Tabla 30. Concentración de defensina-1 en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21 a través de fluorescencia total asociada a MCR-ALS

Día	Muestra	[Defensina-1] (mg/Kg), promedio \pm desviación estándar	[Proteínas totales] (mg/Kg)	% de Defensina-1, promedio \pm desviación estándar	Muestra	[Defensina-1] (mg/Kg), promedio \pm desviación estándar	[Proteínas totales] (mg/Kg)	% de Defensina-1, promedio \pm desviación estándar
0	C2A	8,4 \pm 0,6	731	1,20 \pm 0,08	C4A	11 \pm 1	297	3,8 \pm 0,3
14	C2B	14,0 \pm 0,4	1058	1,40 \pm 0,04	C4B	12 \pm 2	396	3,0 \pm 0,5
21	C2C	11 \pm 1	816	1,4 \pm 0,1	C4C	11 \pm 2	597	1,8 \pm 0,4
49	C2D	11 \pm 1	756	1,4 \pm 0,2	C4D	14 \pm 1	646	2,2 \pm 0,2
56	C2E	6,8 \pm 0,4	715	0,96 \pm 0,06	C4E	14,0 \pm 0,6	767	1,8 \pm 0,1
63	C2F	6 \pm 1	819	0,8 \pm 0,1	C4F	12 \pm 1	788	1,5 \pm 0,1

Según lo descrito en la Tabla 30, al inicio del período el contenido de defensina-1 en la miel de la colmena 2 fue prácticamente el doble del de la colmena 4. Además, en ambas colmenas éste fue disminuyendo en el tiempo, particularmente al final del período. Este hecho puede estar asociado a la dilución del péptido al ir incrementándose la cantidad de miel acumulada en la colmena. Por otra parte, la cantidad de defensina-1 respecto a proteínas totales no varió en el tiempo para la colmena 2, con valores que fluctuaron entre 0,81 y 1,4%, sin embargo, en la colmena 4 hubo una disminución progresiva, ya que mostró un valor inicial de 3,8% y uno final de 1,5%, lo que se debe al aumento de la concentración de las proteínas totales en el tiempo (enriquecimiento proteico de la miel efectuado por la colmena) y a la disminución de la defensina-1 en sí. Para corroborar si existen diferencias significativas en el contenido relativo de defensina-1 entre la muestra del tiempo 0 y las restantes se utilizó la prueba ANOVA. Se encontraron diferencias significativas en la colmena 4 a partir del día 21 (Figura 36). De acuerdo con estos resultados, la aplicación de HO21 no tendría un efecto claro en esta variable, ya que en la colmena 2 no hay un cambio evidente, mientras que en la colmena 4 existe una disminución luego de las aplicaciones.

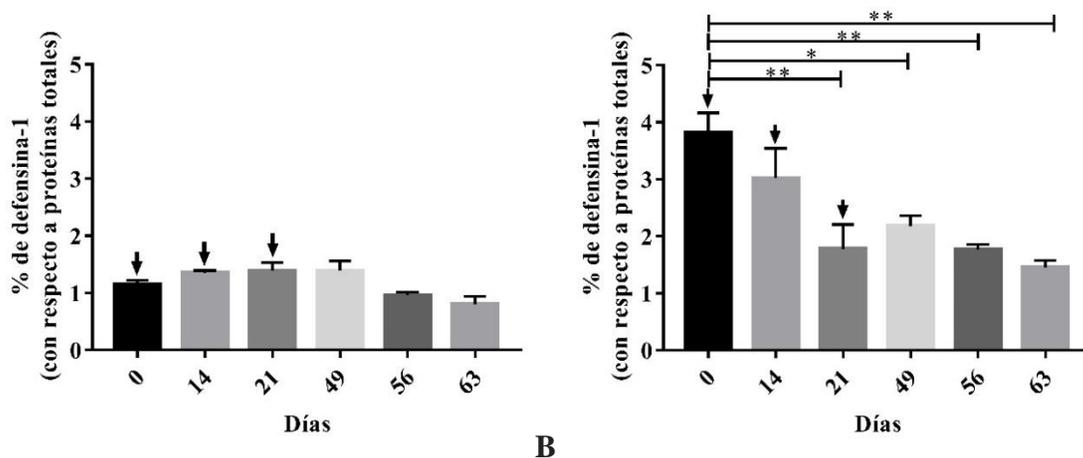


Figura 37. Concentración de defensina-1 a través de fluorescencia total asociada a MCR-ALS en mieles de colmenas tratadas con HO21. A: colmena 2 y B: colmena 4. Las flechas indican los días en los que se aplicó HO21. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas con la prueba de Tukey de comparaciones múltiples con un 95% de nivel de confianza (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$).

2.7 Cuantificación de defensina-1 en la fracción de 3 a 10 kDa de la miel a través de HPLC con detector de fluorescencia

En la Tabla 31 se muestra la concentración de defensina-1 obtenida con la misma metodología utilizada en las mieles de la V Región, la cual se normalizó por la concentración de proteínas totales.

Tabla 31. Concentración de defensina-1 en las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21 a través de HPLC con detector de fluorescencia

Día	Muestra	[Defensina-1] ($\mu\text{g/Kg}$), promedio \pm desviación estándar	[Proteínas totales] (mg/Kg)	% de Defensina-1, promedio \pm desviación estándar	Muestra	[Defensina-1] ($\mu\text{g/Kg}$), promedio \pm desviación estándar	[Proteínas totales] (mg/Kg)	% de Defensina-1, mediana
0	C2A	2,7 \pm 0,3	731	3,7 $\times 10^{-4}$ $\pm 4 \times 10^{-5}$	C4A	1,700 \pm 0,001	297	5,9 $\times 10^{-4}$
14	C2B	3,30 \pm 0,04	1058	3,10 $\times 10^{-4}$ $\pm 4 \times 10^{-6}$	C4B	3 \pm 1	396	8,6 $\times 10^{-4}$
21	C2C	1,4 \pm 0,5	816	1,9 $\times 10^{-4}$ $\pm 3 \times 10^{-5}$	C4C	2,8 \pm 0,4	597	4,7 $\times 10^{-4}$
49	C2D	1,30 \pm 0,04	756	1,70 $\times 10^{-4}$ $\pm 6 \times 10^{-6}$	C4D	3,3 \pm 0,8	646	5,2 $\times 10^{-4}$
56	C2E	0,6 \pm 0,4	715	8 $\times 10^{-5}$ $\pm 5 \times 10^{-5}$	C4E	1,7 \pm 0,3	767	2,2 $\times 10^{-4}$
63	C2F	2,3 \pm 0,5	819	2,8 $\times 10^{-4}$ $\pm 6 \times 10^{-5}$	C4F	2,2 \pm 0,34	788	2,8 $\times 10^{-4}$

En relación a lo descrito en la Tabla 31, en la colmena 2, el contenido relativo de defensina-1 mostró una disminución hasta el día 56, para luego volver a los valores iniciales, mientras que en la colmena 4 hubo un aumento luego de la primera aplicación (día 14), a partir del cual hubo una disminución progresiva. Para determinar si existen diferencias significativas entre la muestra del tiempo 0 y las restantes se utilizó la prueba ANOVA en el caso de la colmena 2 y la prueba de Kruskal-Wallis en la colmena 4. Se encontraron diferencias significativas en la colmena 2 a partir del día 21 (Figura 37). De acuerdo con estos resultados, el efecto de la aplicación de HO21 en esta variable no es claro, ya que en la colmena 2 se vio una disminución entre los días 0 y 21, mientras que en la colmena 4 hubo un aumento seguido de una disminución.

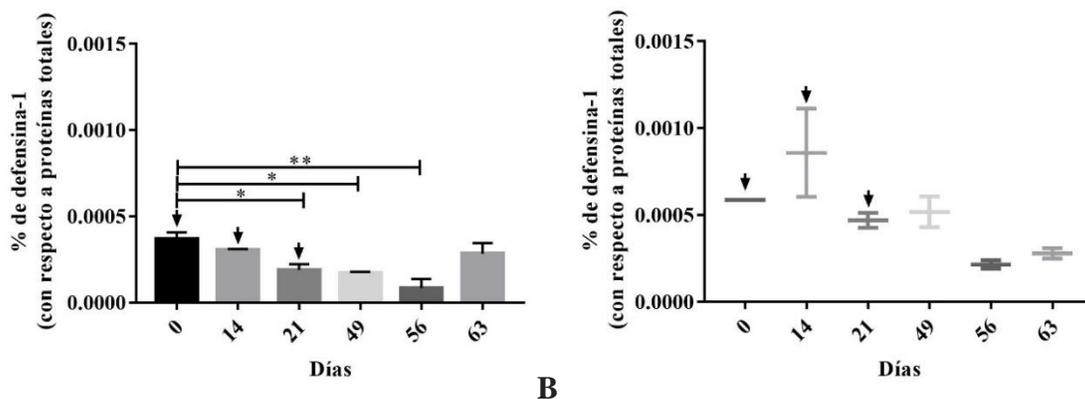


Figura 38. Concentración de defensina-1 a través de HPLC con detector de fluorescencia en mieles de colmenas tratadas con HO21. A: colmena 2 y B: colmena 4. Las flechas indican los días de aplicación de HO21. La colmena 2 se analizó con la prueba ANOVA y la colmena 4 con la prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias estadísticamente significativas en la colmena 2 fueron determinadas con la prueba de Tukey y en la colmena 4 con la prueba de Dunn con un 95% de nivel de confianza (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; ****).

2.8 Actividad antimicrobiana de la miel

Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizó la misma metodología utilizada en las mieles de la V Región, obteniéndose los porcentajes de inhibición presentados en la Tabla 32.

Tabla 32. Porcentaje de inhibición de las mieles de colmenas tratadas con HO21 frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus*

Día	Muestra	% inhibición <i>P. aeruginosa</i>	% inhibición <i>S. aureus</i>	Muestra	% inhibición <i>P. aeruginosa</i>	% inhibición <i>S. aureus</i>
0	C2A	100	99,9	C4A	96,7	98,9
14	C2B	-28,0	26,5	C4B	99,1	94,1
21	C2C	58,6	28,4	C4C	80,3	56,5
49	C2D	97,4	98,1	C4D	-35,5	38,2
56	C2E	98,5	98,9	C4E	100	98,7
63	C2F	98,7	98,4	C4F	96,7	100

Como se observa en la Tabla 32, al inicio del período la miel de ambas colmenas inhibió prácticamente por completo el crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Sin embargo, esta capacidad fue perdiéndose en el tiempo, para finalmente recuperarse, situación que se

presentó antes en la colmena 2 (días 14 al 49) que en la 4 (días 21 al 56). Cabe mencionar que una tendencia similar se observó para la actividad de GOX (correlación directa entre ambas variables), lo que demostraría la preponderancia que tendría la actividad de esta enzima en la capacidad antimicrobiana de estas muestras de miel por sobre otros factores. Para realizar comparaciones entre los porcentajes de inhibición, las muestras fueron normalizadas por la C2A, obteniendo la actividad antimicrobiana relativa. Los resultados se muestran en la Tabla 33. Dado que los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano para las mieles de C2A y C4A fueron del 100% o muy cercanos, se obtuvieron valores similares a los de la Tabla 32 y consecuentemente las mismas observaciones (alta actividad antimicrobiana inicial, decaimiento y recuperación de esta).

Tabla 33. Actividad antimicrobiana relativa de las mieles obtenidas de colmenas tratadas con HO21 frente a las bacterias seleccionadas

Día	Muestra	Actividad antimicrobiana relativa frente a <i>P. aeruginosa</i> , promedio \pm desviación estándar	Actividad antimicrobiana relativa frente a <i>S. aureus</i> , mediana	Muestra	Actividad antimicrobiana relativa frente a <i>P. aeruginosa</i> , mediana	Actividad antimicrobiana relativa frente a <i>S. aureus</i> , mediana
0	C2A	1,00 \pm 0,003	1,00	C4A	0,966	0,990
14	C2B	-0,280 \pm 0,007	0,265	C4B	0,990	0,942
21	C2C	0,59 \pm 0,01	0,284	C4C	0,802	0,566
49	C2D	0,97 \pm 0,005	0,981	C4D	-0,355	0,382
56	C2E	0,984 \pm 0,006	0,990	C4E	1,00	0,987
63	C2F	0,986 \pm 0,001	0,984	C4F	0,966	1,00

Para determinar si hay diferencias significativas entre la muestra del día 0 y las restantes se realizó una prueba ANOVA o Kruskal-Wallis, encontrándose diferencias significativas en la colmena 2 a partir del día 14 frente a *P. aeruginosa*, mientras que en la colmena 4 no se encontraron diferencias significativas (Figura 38 y 39), lo que se atribuye a que las pruebas no paramétricas como la de Kruskal-Wallis no son tan sensibles al detectar diferencias como las pruebas paramétricas. De acuerdo con estos resultados, no se puede visualizar con certeza el efecto de HO21 en la actividad antimicrobiana de la miel, ya que la disminución observada se da en días distintos para cada colmena, por lo que es posible que, por un lado, cada colmena reaccione de forma distinta a este estímulo y, por otro lado, otras variables no estudiadas estén dando cuenta de la actividad antimicrobiana.

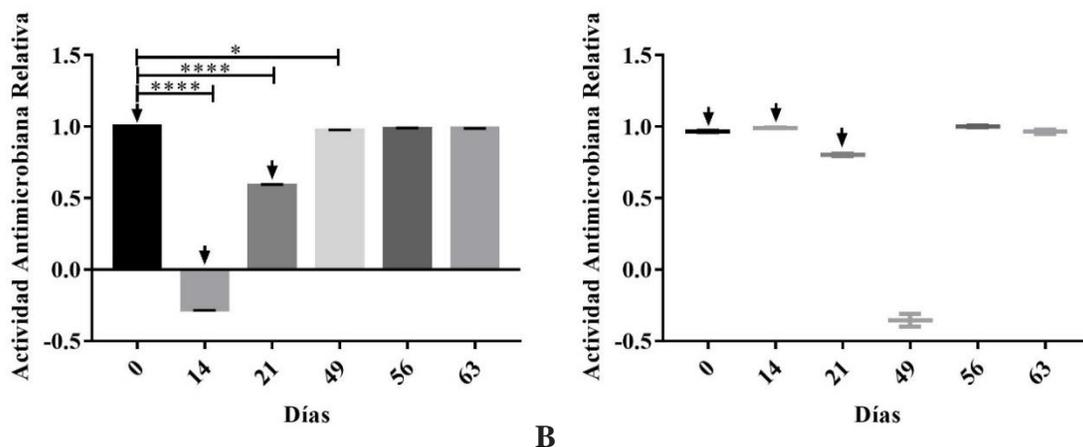


Figura 39. Actividad antimicrobiana relativa frente a *P. aeruginosa* de mieles obtenidas de colmenas tratadas con HO21. A: colmena 2 y B: colmena 4. Para determinar diferencias estadísticamente significativas, en A se utilizó la prueba ANOVA y la de Tukey con un 95% de nivel de confianza y en B se usó la prueba de Kruskal-Wallis y la de Dunn con un 95% de nivel de confianza (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$).

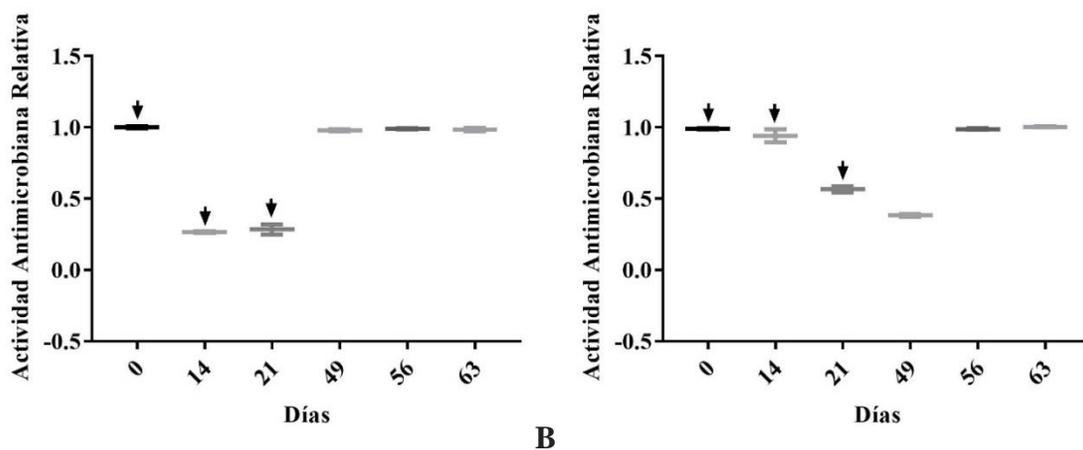


Figura 40. Actividad antimicrobiana relativa frente a *S. aureus* de mieles obtenidas de colmenas tratadas con HO21. A: colmena 2 y B: colmena 4. Para determinar diferencias estadísticamente significativas se usó la prueba de Kruskal-Wallis y la de Dunn con un 95% de nivel de confianza (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$).

2.9 Actividad antimicrobiana de la fracción de 3 a 10 kDa de la miel

De acuerdo con lo descrito en el punto 1.10, se midió la actividad antimicrobiana de las fracciones de 3 a 10 kDa de mieles con concentraciones de defensina-1 superiores a 38 mg/Kg (por MCR-ALS) y/o 1,8 $\mu\text{g/Kg}$ (por HPLC), que corresponde a la mayor concentración de las 5 muestras de prueba. Los resultados se muestran en la Tabla 34.

Tabla 34. Porcentaje de inhibición frente a las bacterias seleccionadas de las fracciones de 3 a 10 kDa de las mieles de colmenas tratadas con HO21 y concentración de defensina-1 determinada por FT/MCR y HPLC

Muestra	[Defensina-1 por MCR-ALS] (mg/Kg)	[Defensina-1 por HPLC] ($\mu\text{g/Kg}$)	Inhibición frente a <i>P. aeruginosa</i> (%)	Inhibición frente a <i>S. aureus</i> (%)
C2A	8,0	2,9	-64,9	55,7
C2B	14	3,3	-83,1	53,7
C2C	12	1,7	-109	55,0
C2F	7,4	2,7	-80,5	53,5
C4B	13	4,4	-58,3	55,2
C4C	8,8	3,1	-121	55,2
C4D	13	3,9	-95,9	49,3
C4E	14	3,9	-87,2	55,7
C4F	12	2,4	-61,0	52,9

Nuevamente se observó que las fracciones tienen porcentajes de inhibición negativos frente a *P. aeruginosa*, y positivos, pero menores al 80%, frente a *S. aureus*. También se observó que no hubo correlación entre la concentración de defensina-1 de las fracciones y su porcentaje de inhibición. Cabe señalar que junto con estar en baja concentración en la miel, la defensina-1 predominaría bajo su forma glicada o fructada, la que probablemente no presente actividad antibacteriana. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que existe una sustancia de forma constante en las fracciones que ayuda a la proliferación de la *P. aeruginosa* y que inhibe en cierto grado el crecimiento de *S. aureus*.

2.10 Análisis de componentes principales de las variables determinadas en miel

Se realizó un PCA con todas las variables medidas en las 12 muestras miel obtenidas de colmenas tratadas con HO21. El modelo obtenido de 9 componentes explica un 99% de la variabilidad de las muestras. En la Figura 40 se presenta el gráfico conjunto de muestras y variables para los dos primeros componentes, los cuales explican el 44 y 23% de variabilidad, respectivamente (Figura 40). Se observan en términos generales tres grupos de muestras: las del inicio del período (C2A, C4A y C4B), asociadas a mayores contenidos relativos de riboflavina, triptófano, hidroximetilfurfural y porcentaje de defensina-1 (por MCR), las obtenidas inmediatamente después de la aplicación de HO21 (C4C y C4D), relacionadas con mayores contenidos de prolina, proteínas totales y fenoles totales, y del final del período

(C2D, C2E, C2F, C4E, C4F), asociadas a una mayor actividad de GOX, furosina, actividad antimicrobiana relativa frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus* y porcentaje de defensina-1 a partir de HPLC. Además, un par de muestras que no tienen una relación clara con los marcadores (C2B y C2C).

Este análisis integral realizado mediante PCA indica que la aplicación de HO21 modificaría el estado metabólico e inmune de las colonias estudiadas, reflejado en un incremento de marcadores como prolina libre, proteínas totales, fenoles totales, actividad de GOX y defensina-1 no modificada (determinada por HPLC). Un hecho que coincide con esta observación es que el proceso de conversión del néctar salivado en miel tarda de 1 a 3 días (Ball, 2007), por lo que los posibles efectos generados por HO21 en la miel, ya sea por su acumulación en ésta o por la estimulación de las secreciones de las abejas, deberían manifestarse unos pocos días después de su aplicación. Sin embargo, los resultados dispares que mostraron ambas colonias por separado no permiten confirmar esta conjetura. Para ello se necesita comprobar si estas variables se modifican a través del tiempo en colmenas a las que no se le aplica HO21 y, de ser así, si lo hacen de la misma forma que en estas muestras.

Valachová y Majtan, 2015 midieron la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* de mieles cosechadas durante la primavera y el verano, encontrando que aquellas muestras obtenidas al principio del verano son las más activas en cuanto a su capacidad de inhibir el crecimiento de *S. aureus*, ya que sus CIMs son menores que las muestras del inicio de la primavera, lo que se atribuiría a su mayor contenido de defensina-1. En este experimento el muestreo también inició a finales de la primavera y terminó a mediados del verano, observándose una tendencia similar a la descrita en la referencia, es decir, que las muestras finales de ambas colmenas están correlacionadas con la actividad antimicrobiana, la actividad de GOX y el contenido de defensina-1 determinado mediante HPLC. De acuerdo a esto, no puede descartarse que el aumento observado en la actividad antimicrobiana durante el tiempo se deba al proceso de maduración propio de la miel. Otra variable a considerar en estudios futuros es la forma de administración, ya que por asperjado es posible que el consumo de HO21 por parte de las abejas haya sido bajo, mientras que si se administra en el alimento, se aseguraría su consumo.

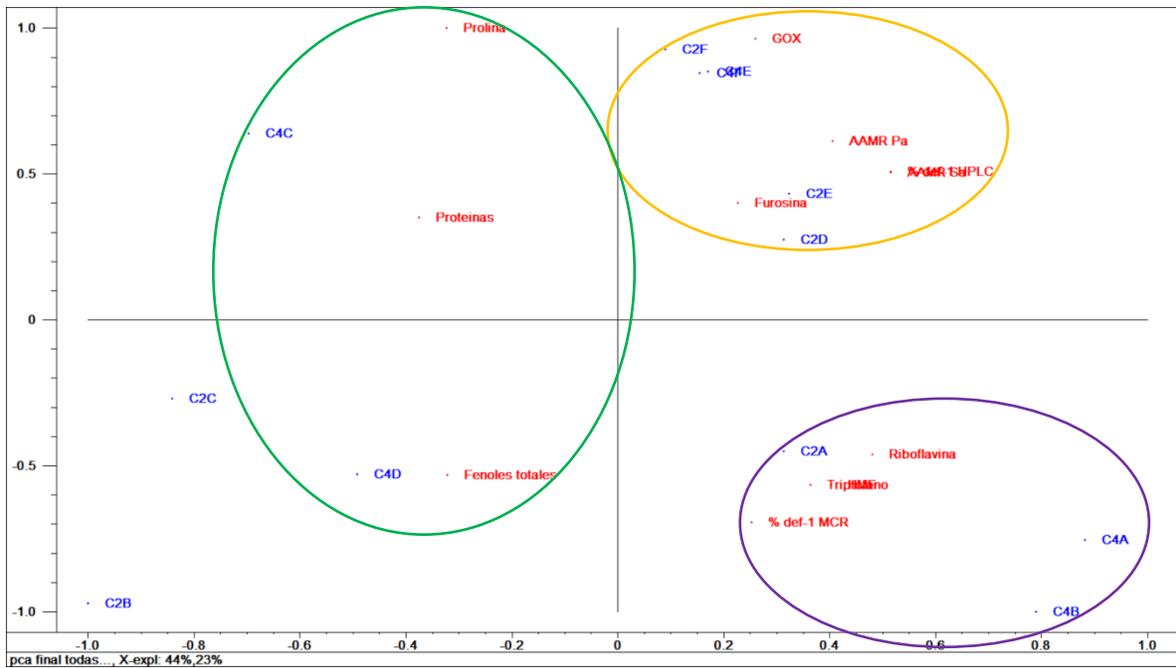


Figura 41. Mapa de las muestras de miel de colmenas tratadas con HO21 y las variables medidas. Se muestran las muestras en azul y las variables en rojo. El componente principal 1 corresponde a la línea horizontal y el 2 a la vertical. El análisis se hizo con las variables centradas y estandarizadas.

CONCLUSIONES

1. No se pudo establecer una relación entre la presencia de *N. ceranae* en las colmenas de la V Región y los marcadores químicos estudiados en sus correspondientes muestras de miel.
2. Los marcadores prolina libre, proteínas totales y fenoles totales dan cuenta de la variabilidad dada por el origen geográfico de las muestras de miel de la V Región y, por lo tanto, son reconocibles como componentes externos en las mismas.
3. Los marcadores defensina-1 y actividad de GOX en la miel estarían asociados a los factores genéticos/epigenéticos en las abejas que controlan la expresión génica, es decir, relacionados al componente interno.
4. Los distintos métodos propuestos para cuantificar la defensina-1 varían en sensibilidad y especificidad, siendo el método basado en HPLC con detector de fluorescencia el más selectivo para este analito.
5. La actividad antimicrobiana de las mieles de la V Región no está correlacionada con las variables determinadas, por lo que probablemente esté dada por otras variables no medidas en este estudio. En las mieles de colmenas tratadas con HO21, en cambio, estaría relacionada con la actividad de GOX, contenido de defensina-1 y su producción más tardía (mediados de verano).
6. La aplicación de HO21 se asoció a un incremento en los marcadores prolina libre, proteínas totales, fenoles totales y actividad de GOX, sin embargo, la variabilidad significativa entre las colmenas no permite asegurar que estimule el metabolismo y/o la inmunidad social.

REFERENCIAS

1. Afroz, R., Tanvir, E.M., Zheng, W., Little, P.J. (2016). Molecular Pharmacology of Honey. *Journal of Clinical & Experimental Pharmacology*, 6:212.
2. Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L. P. & Le Conte, Y. (2010a). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*, 12(3), 774-782.
3. Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010b). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology letters*, rsbl20090986.
4. Aliferis, K. A., Copley, T., Jabaji, S. (2012). Gas chromatography–mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of insect physiology*, 58(10), 1349-1359.
5. Álvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Fattorini, D., Regoli, F., Quiles, J.L., Battino, M. (2012). Radical-scavenging activity, protective effect against lipid peroxidation and mineral contents of monofloral Cuban honeys. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 31–38.
6. Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11, 2284-2290.
7. Ashraf, J. M., Ahmad, S., Choi, I., Ahmad, N., Farhan, M., Tatyana, G., & Shahab, U. (2015). Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches. *IUBMB life*, 67(12), 897-913.
8. Auerswald, L. U. T. Z., Schneider, P. E. T. E. R., y Gäde, G. E. R. D. (1998). Utilisation of substrates during tethered flight with and without lift generation in the African fruit beetle *Pachnoda sinuata* (Cetoniinae). *Journal of Experimental Biology*, 201(15), 2333-2342.
9. Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Vignes, B., Texier, C., Delbac, F., Blot, N. (2014). Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *Plos One*, 9(3), e91686
10. Badaoui, B., Fougeroux, A., Petit, F., Anselmo, A., Gorni, C., Cucurachi, M., ... & Mutinelli, F. (2017). RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *PloS one*, 12(3), e0173438.
11. Ball, D. W. (2007). The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education*, 84(10), 1643.
12. Barriga, G. P., Cifuentes-Muñoz, N., Rivera, P. A., Gutierrez, M., Shmaryahu, A., Valenzuela, P. D., & Engel, E. A. (2012). First detection and complete genome sequence of Deformed wing virus in Chilean honeybees. *Virus genes*, 45(3), 606-609.
13. Belitz, H. D., Grosch, W., y Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*, 4th revised and extended edn. Berlin (DE): Springer.
14. Bogdanov, S., & Martin, P. (2002). Honey authenticity. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93(3), 232-254.
15. Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., y Higes, M. (2013). *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary research*, 44(1), 1.

16. Bouseta, A., Scheirman, V., & Collin, S. (1996). Flavor and free amino acid composition of lavender and eucalyptus honeys. *Journal of food Science*, 61(4), 683-687.
17. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
18. Bruchhaus, I., Roeder, T., Rennenberg, A., y Heussler, V. T. (2007). Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends in parasitology*, 23(8), 376-383.
19. Brudzynski, K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian journal of microbiology*, 52(12), 1228-1237.
20. Brudzynski, K. Honey Melanoidins: Emerging Novel Understanding on the Mechanism of Antioxidant and Antibacterial Action of Honey. Majtan, J (Ed.), *Honey: Current Research and Clinical Applications*, Nova Science Publishers (2012), Chapter II.
21. Brudzynski, K., & Lannigan, R. (2012). Mechanism of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. *Frontiers in microbiology*, 3, 36.
22. Bucekova, M., Valachova, I., Kohutova, L., Prochazka, E., Kludiny, J., y Majtan, J. (2014). Honeybee glucose oxidase—its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften*, 101(8), 661-670.
23. Calderón, R. A., Sanchez, L. A., Yañez, O., y Fallas, N. (2008). Presence of *Nosema ceranae* in Africanized honey bee colonies in Costa Rica. *Journal of apicultural research*, 47(4), 328-329.
24. Candy, D. J., Becker, A., y Wegener, G. (1997). Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 117(4), 497-512.
25. Casteels, P. Immune response in Hymenoptera. P.T. Brey, D. Hultmark (Eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insect*, Chapman & Hall, London (1998), pp. 92-110
26. Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., Tempst, P. (1994). Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28569-28575.
27. Cebrero, G. (2018). Caracterización Analítica de Defensina-1 y Actividad de Glucosa Oxidasa en Miel como Indicadores de la Infección por *Nosema Ceranae* en abejas. (Tesis de Magíster). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
28. Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D. y Pettis, J.S. (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*, 58, 1090-1095.
29. Christensen, J., Nørgaard, L., Bro, R., y Engelsen, S. B. (2006). Multivariate autofluorescence of intact food systems. *Chemical reviews*, 106(6), 1979-1994.
30. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

31. Consorcio de Desarrollo Tecnológico Apícola S.A. (2014). Estudio de Mercado Industria Apícola Chilena.
32. Cotter, S. C. y Kilner R. M. (2010). Personal immunity versus social immunity. *Behavioral Ecology*, 21(4), 663-668.
33. Couquet, Y., Desmoulière, A., y Rigal, M. L. (2013). Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. *Actualités pharmaceutiques*, 52(531), 22-25.
34. Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848), 283-287.
35. Cremer, S., Armitage, S. A., y Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current biology*, 17(16), R693-R702.
36. da C Azeredo, L., Azeredo, M. A. A., De Souza, S. R., & Dutra, V. M. L. (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, 80(2), 249-254.
37. Danihlík, J., Aronstein, K. y Petřivalský, M. (2015). Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity: Physiology, biochemistry, and chemical ecology. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123-136.
38. de Juan, A., Jaumot, J., y Tauler, R. (2014). Multivariate Curve Resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem. *Analytical Methods*, 6(14), 4964-4976.
39. Di Gerónimo, J & Fritz, R. (2001). Proline in Argentine honeys. *Proc. 37th Int. Apic. Congr.*, 28 Oct – 1 Nov 2001, Durban, South Africa
40. Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., Kretzchmar, A., Le Conte, Y. (2013). Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *Journal of invertebrate pathology*, 113(1), 42-51.
41. Eardley, C., Roth, D., Clarke, J., Buchmann, S., y Gemmill, B. (2006). Pollinators and pollination: a resource book for policy and practice. Agricultural Research Council (ARC), págs. xi-xii.
42. Eiri, D. M., Suwannapong, G., Endler, M., & Nieh, J. C. (2015). *Nosema ceranae* Can Infect Honey Bee Larvae and Reduces Subsequent Adult Longevity. *PLoS ONE*, 10(5), e0126330. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0126330>
43. Engelkirk, P. G. y Duben-Engelkirk, J. (2008). *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases*. Baltimore, USA. Wolters Kluwer Health – Lippincott Williams and Wilkins. Pp. 134
44. Estay, P. (2013). Posibles causas del incremento de la mortalidad de abejas en Chile.
45. Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin– Ciocalteu reagent. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(14), 8139-8144.
46. Fraunhofer Chile. Monitoreo de colmenas de *Apis mellifera* en la zona central de Chile, 2015-2016. Recuperado de http://www.senado.cl/appsenado/index.php?mo=comisiones&ac=sesiones_celebradas&idcomision=192&tipo=3&legi=485&ano=2017&desde=0&hasta=0&idsesion=11535&idpunto=14700&listado=2

47. Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, 103, S73-S79.
48. Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of biological chemistry*, 265(19), 11333-11337.
49. Fussell, R. J., Murray, A., Kay, J. F., y Sharman, M. (2012). Towards the development of robust protocols for the establishment of MRLs in honey. In *Residues of veterinary drugs in food. Proceedings of the EuroResidue VII Conference, Egmond aan Zee, The Netherlands, 14-16 May 2012. Volume 1, 2 and 3 (pp. 191-195). Board of the EuroResidue Conferences Foundation.*
50. GhoshMoulick, R., Bhattacharya, J., Roy, S., Basak, S., & Dasgupta, A. K. (2007). Compensatory secondary structure alterations in protein glycation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1774(2), 233-242.
51. Gidamis, A.B., Chove, B.E., Shayo, N.B., Bangu, N.T. (2004). Quality evaluation of honey harvested from selected areas in Tanzania with special emphasis on hydroxymethyl furfural (HMF) levels. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 129–132.
52. Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957.
53. Helsel, D. R. (2005). More than obvious: better methods for interpreting nondetect data.
54. Hermosín, I., Chicon, R. M., & Cabezudo, M. D. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83(2), 263-268.
55. Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., & Martín-Hernández, R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 17-29.
56. Hinojosa, A., y Gonzalez, D. (2004). Prevalencia de parásitos en *Apis mellifera* L en colmenares del secano costero e interior de la VI Región, Chile. *Parasitología latinoamericana*, 59(3-4), 137-141.
57. Hodge, J. E. (1953). Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1(15), 928-943.
58. Holt, H.L., Aronstein, K.A. y Grozinger, C.M. (2013). Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* 14, 799.
59. Huaiquil, S., Sepúlveda, G., y Rebolledo, R. (2009). Honey bees health in Azapa valley, region of Arica and Parinacota, Chile. *IDESIA*, 27(2), 71-78.
60. Hurst, W. J. (2008). *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. Boca Raton, Estados Unidos. CRC Press. pp. 183.
61. Ivgin Tunca, R., Oskay, D., Gosterit, A., Tekin, O. K. (2016). Does *Nosema ceranae* Wipe Out *Nosema apis* in Turkey? *Iranian Journal of Parasitology*, 11(2), 259–264.
62. Jack, C. J., Uppala, S. S., Lucas, H. M., Sagili, R. R. (2016). Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *Journal of insect physiology*, 87, 12-19.

63. Jamróz, M.K., Paradowska, K., Zawada, K., Makarova, K., Kaźmierski, S., Wawer, I. (2014). ¹H and ¹³C NMR- based sugar profiling with chemometric analysis and antioxidant activity of herbhoney and honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 246–255.
64. Janakat, S., Al-Nabulsi, A. A. R., Allehdan, S., Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2015). Antimicrobial activity of amurca (olive oil lees) extract against selected foodborne pathogens. *Food Science and Technology*, 35(2), 259-265.
65. Kaškonienė, V., y Venskutonis, P. R. (2010). Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 620-634.
66. Kearns, C. A., Inouye, D. W., y Waser, N. M. (1998). Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual review of ecology and systematics*, 83-112.
67. Keeling, P. (2009). Five questions about microsporidia. *PLoS Pathogens*, 5(9), e1000489.
68. Kiselar, J. G., Wang, X., Dubyak, G. R., El Sanadi, C., Ghosh, S. K., Lundberg, K., & Williams, W. M. (2015). Modification of β -Defensin-2 by dicarbonyls methylglyoxal and glyoxal inhibits antibacterial and chemotactic function in vitro. *PLoS one*, 10(8), e0130533.
69. 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 biochemistry and molecular biology*, 35(1), 11-22.
70. Klauđiny, J., Bachanová, K., Kohútová, L., Džúrová, M., Kopernický, J., y Majtán, J. (2012). Expression of larval jelly antimicrobial peptide defensin1 in *Apis mellifera* colonies. *Biologia*, 67(1), 200-211.
71. Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., y Tscharrntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313.
72. Kurze, C., Mayack, C., Hirche, F., Stangl, G.I., Le Conte, Y., Kryger, P. y Moritz, R.F.A. (2016a). *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitology Research*, 115(6), 2381-2388.
73. Kurze, C., Routtu, J., & Moritz, R. F. (2016b). Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology (Jena)*, 119(4), 290-297.
74. Kwakman, P. H., Te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M., y Zaat, S. A. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), 2576-2582.
75. 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.
76. Li, W., Evans, J. D., Li, J., Su, S., Hamilton, M., y Chen, Y. (2017). Spore load and immune response of honey bees naturally infected by *Nosema ceranae*. *Parasitology research*, 116(12), 3265-3274.
77. Liao, L. H., Wu, W. Y., & Berenbaum, M. R. (2017). Impacts of Dietary Phytochemicals in the Presence and Absence of Pesticides on Longevity of Honey Bees (*Apis mellifera*). *Insects*, 8(1), 22.

78. Majtan, J., Klaudiny, J., Bohova, J., Kohutova, L., Dzurova, M., Sediva, M., Bartosova, M. & Majtan, V. (2012). Methylglyoxal-induced modifications of significant honeybee proteinous components in manuka honey: possible therapeutic implications. *Fitoterapia*, 83(4), 671-677.
79. Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 154.
80. Mao, W., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R. (2013). Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 8842-8846.
81. Martínez, J., Leal, G., Conget, P. (2012). *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitology research*, 111(2), 601-607.
82. Matiacevich, S. B., Santagapita, P. R., & Buera, M. P. (2005). Fluorescence from the Maillard reaction and its potential applications in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6), 483-495.
83. Mayack, C. y Naug, D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), 185-188.
84. Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*, 91(3), 571-577.
85. Micheu, S., Crailsheim, K., y Leonhard, B. (2000). Importance of proline and other amino acids during honeybee flight. *Amino acids*, 18(2), 157-175.
86. Molan, P. C., & Rhodes, T. (2015). Honey: a biologic wound dressing.
87. Morales, V., Sanz, M. L., Martín-Álvarez, P. J., & Corzo, N. (2009). Combined use of HMF and furosine to assess fresh honey quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8), 1332-1338.
88. Nagai, T., Kai, N., Tanoue, Y., & Suzuki, N. (2018). Chemical properties of commercially available honey species and the functional properties of caramelization and Maillard reaction products derived from these honey species. *Journal of food science and technology*, 55(2), 586-597.
89. Naug, D. (2009). Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*, 142(10), 2369-2372.
90. Nazarian, H., Taghavizad, R., Majd, A. (2010). Origin of honey proteins and method for its quality control. *Pak. J. Botany*, 42(5), 3221-3228.
91. Nazzi, F., y Pennacchio, F. (2014). Disentangling multiple interactions in the hive ecosystem. *Trends in parasitology*, 30(12), 556-561.
92. Neumann, P., y Carreck, N. L. (2010). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 1-
93. Ohashi, K., Natori, S., y Kubo, T. (1999). Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry*, 265(1), 127-133.
94. Ollerton, J., Winfree, R., y Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*, 120(3), 321-326.
95. Ough, C. S. (1969). Rapid determination of proline in grapes and wines. *Journal of Food Science*, 34(3), 228-230.
96. Özgör, E., Güzerin, E., & Keskin, N. (2015). Determination and Comparison of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in Terms of Geographic and Climatic Factors. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 43, 9-15.

97. Rees, J. A., Moniatte, M., & Bulet, P. (1997). Novel antibacterial peptides isolated from a European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea). *Insect biochemistry and molecular biology*, 27(5), 413-422.
98. Rodríguez, M. E. (2013). Detección e Identificación de Virus de la Abeja de Miel (*Apis Mellifera* L.)(Hymenoptera: Apidae), en apiarios de las Regiones del Maule y Biobío, Chile y su asociación con otras patologías apícolas (Doctoral Dissertation).
99. Rodríguez-Delgado, M. A., Malovaná, S., Perez, J. P., Borges, T., y Montelongo, F. G. (2001). Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of chromatography A*, 912(2), 249-257.
100. Rosenbalt, G., Angonnet, S., Goroshit, A., Tabak, M., Neeman, I. (1997). Antioxidant properties of honey produced by bees fed with medical plant extracts. En: Mizrahi, A. y Lensky, Y. *Bee products. Properties, applications and apitherapy*. Springer Science + Business Media, LLC págs. 49–55.
101. Ruoff, K., Luginbühl, W., Künzli, R., Bogdanov, S., Bosset, J.O., von der Ohe, K., von der Ohe, W., Amado, R. (2006). Authentication of the botanical and geographical origin of honey by front-face fluorescence spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(18), 6858-6866.
102. Sanhueza, O. (2016). Caracterización química multifactorial de miel en relación a la infección por *Nosema ceranae* en abejas, actividad antimicrobiana y origen geográfico del producto. (Tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
103. Sanmartín, E., Arbolea, J. C., Villamiel, M., & Moreno, F. J. (2009). Recent advances in the recovery and improvement of functional proteins from fish processing by-products: use of protein Glycation as an alternative method. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4), 332-344.
104. Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S. y Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC complementary and alternative medicine*, 10(1), 1.
105. Silva, T. M. S., dos Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., da Silva, E. M. S., da Silva, G. S., de Novais, J. S., Ribeiro, F y Camara, C. A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(1), 10-18.
106. Simone-Finstrom, M. y Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41(3), 295-311.
107. Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Fortuna, T. (2009). Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. *Food Chemistry*, 113, 568–574.
108. Sojka, M., Valachova, I., Bucekova, M., & Majtan, J. (2016). Antibiofilm efficacy of honey and bee-derived defensin-1 on multispecies wound biofilm. *Journal of medical microbiology*, 65(4), 337-344.
109. Starks, P. T., Blackie, C. A. y Seeley, T. D. (2000). Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, 87(5), 229-231.
110. Stebbing, A. (1982). Hormesis – The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of The Total Environment*, 22, 213-234.

111. Switanek, M., Crailsheim, K., Truhetz, H., & Brodschneider, R. (2017). Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate. *Science of The Total Environment*, 579, 1581-1587.
112. Thakur, M. (2012). Bees as pollinators—Biodiversity and Conservation. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*, 2(1), 1-7.
113. Timperman, A. T., Oldenburg, K. E., & Sweedler, J. V. (1995). Native fluorescence detection and spectral differentiation of peptides containing tryptophan and tyrosine in capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, 67(19), 3421-3426.
114. Tomás-Barberán, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S., y Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 485-496.
115. Tomasik, P. (2003). *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides*. CRC Press. pp. 74.
116. Valachová, I y Majtán, J. (2015). Bee defensin-1 seasonal quantitative variability in honeys and its role in bee health protection. In *Honeybees: Biology, Behavior and Benefits* (pp. 53-70). Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc.
117. Valachová, I., Bučeková, M., & Majtán, J. (2016). Quantification of Bee-Derived Peptide Defensin-1 in Honey by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, a New Approach in Honey Quality Control. *Czech Journal of Food Science*, 34(3).
118. Van der Steen, J. J. M. (2015). The foraging honey bee. *BBKA News-The British Bee Journal*, 2015(February), 43-46.
119. vanEngelsdorp, D. y Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S80-S95.
120. vanEngelsdorp, D., Caron, D. J., Hayes, R., Underwood, K. R. M., Henson, A., Spleen, M., Andree, R., Snyder, K., Lee, K., Roccacacca, M., Wilson, J., Wilkes, E., y Pettis, J. (2012). A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research*, 51(1), 115-124.
121. vanEngelsdorp, D., Evans, C., Saegerman, C., Mullin, E., Haubruge, B. K., Nguyen, M., Frazier, J., Frazier, D., Cox-Foster, Y., Chen, R., Underwood, D. R., y Pettis, J. (2009). Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*. 4: e6481.
122. VICH. (2015). GL49: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies.
123. Vivian, J. T., & Callis, P. R. (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophysical journal*, 80(5), 2093-2109.
124. Von Der Ohe, W., Dustmann, J. H; Von Der Ohe, K (1991). Prolin Als Kriterium Der Reife Des Honings. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 87 (12), 383-386.
125. White Jr, J. W., Subers, M. H. (1963b). Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay. *Journal of Apicultural Research*, 2(2), 93-100.
126. White, J. W., Subers, M. H. y Schepartz, A. I. (1963a). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects*, 73(1), 57-70.

127. Woyke, J. (1984). Correlations and interactions between population, length of worker life and honey production by honeybees in a temperate region. *Journal of Apicultural Research*, 23(3), 148-156.
128. Wünsch, U. J., Murphy, K. R., & Stedmon, C. A. (2015). Fluorescence quantum yields of natural organic matter and organic compounds: Implications for the fluorescence-based interpretation of organic matter composition. *Frontiers in Marine Science*, 2, 98.
129. 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.
130. Yaniv, Z. y Rudich, M. (1997). Medicinal herbs as a potential source of high-quality honeys. In: Mizrahi A, Lensky Y (ed) *Bee products. Properties, applications and apitherapy*. Springer Science + Business Media, LLC pp 77–81.
131. Zainol, M. I., Yusoff, K. M., & Yusof, M. Y. M. (2013). Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 129.