

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
CAMPUS LOS ÁNGELES  
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL**



**CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA Y ANTIMICROBIANA DE MIEL Y POLEN  
CORBICULAR PRODUCIDOS EN PLANTACIÓN DE QUILLAY EN EL SECANO  
INTERIOR DE YUMBEL, REGIÓN DEL BIOBÍO, CHILE.**

**PROYECTO DE TÍTULO PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE INGENIERO EN  
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

**JAVIER ANDRÉS MATAMALA MOYANO**

**LOS ÁNGELES-CHILE  
2025**

**“CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA Y ANTIMICROBIANA DE MIEL Y POLEN  
CORBICULAR PRODUCIDOS EN PLANTACIÓN DE QUILLAY EN EL SECANO  
INTERIOR DE YUMBEL, REGIÓN DEL BIOBÍO, CHILE”**

**Alumno**

**Javier Andrés Matamala Moyano  
Ingeniero en Biotecnología Vegetal**

**Profesor Guía**

**Dr. Mauricio J. Rondanelli Reyes  
Profesor Asociado  
Biólogo**

**Jefe de Carrera**

**Pedro Quiroz Hernández  
Profesor Instructor  
Ingeniero de Ejecución Forestal**

**Director de Departamento**

**Dr. Mauricio J. Rondanelli Reyes  
Profesor Asociado  
Biólogo**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de este camino.

A mis padres, quienes han sido mi pilar y apoyo incondicional a lo largo de estos años de carrera. Su amor, paciencia y sacrificios han sido fundamentales para que hoy alcance esta meta.

A mi polola, Francisca Contreras, por ser mi compañera en este proceso, entregándome siempre palabras de ánimo, consejos valiosos y creyendo en mí, incluso en los momentos más difíciles.

A mis abuelos, que ocupan un lugar especial en mi corazón. Sé que, desde algún lugar, me están apoyando y enviando fuerzas en cada paso de este proceso.

A las amigas que estuvieron conmigo este último tramo de mi vida universitaria, Gabriela García y María Carolina Iraira, por compartir conmigo los buenos momentos, también apoyo y consejos.

A mi profesor guía, Mauricio Rondanelli, por su constante apoyo, guía y confianza en mi trabajo. Su experiencia, conocimiento y consejos fueron fundamentales para lograr el objetivo de esta investigación. Gracias por creer en mí, por orientarme y darme los mejores consejos para culminar con este proceso académico.

A la profesora Angela Machuca, por su apoyo, consejos y sabiduría, además de facilitarme el acceso al Laboratorio de Biotecnología de Hongos para realizar parte de mis ensayos.

Agradezco al equipo del Laboratorio de Palinología y Ecología Vegetal, por acogirme y brindarme enseñanzas valiosas que enriquecieron mi formación. En especial, agradezco a Iván Lamas por aconsejarme y por alegrar mis días en el laboratorio.

También quiero agradecer al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, en especial al profesor Víctor Campos y a Macarena Deride, por facilitarme los espacios y herramientas necesarias para realizar los ensayos microbiológicos de mi tesis.

Finalmente, agradezco a la Universidad de Concepción por el apoyo entregado a través de los proyectos internos VRID N°2021000335 MUL y VRIM 23117, que financiaron el desarrollo de este proyecto de título, haciendo posible la realización de este proyecto.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Abeja melífera</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Productos de la colmena</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3. Composición botánica de miel y polen</b> .....	<b>13</b>
<b>2.4 Propiedades antimicrobianas de miel y polen</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5 Plantación de quillay en el predio Corderito</b> .....	<b>17</b>
<b>III. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>19</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b> .....	<b>21</b>
<b>5.1 Área de estudio</b> .....	<b>21</b>
<b>5.2 Obtención de muestras</b> .....	<b>21</b>
<b>5.3 Determinación botánica de miel</b> .....	<b>22</b>
5.3.1 Método melisopalinológico .....	22
5.3.2 Montaje y visualización de la muestra .....	23
<b>5.4 Determinación botánica de polen corbicular</b> .....	<b>24</b>
5.4.1 Separación por color de los cúmulos corbiculares .....	24
5.4.2 Visualización bajo microscopio de los cúmulos corbiculares .....	24
<b>5.5 Actividad antimicrobiana</b> .....	<b>25</b>

5.5.1 Preparación de disolución de miel .....	25
5.5.2 Preparación de extracto de polen corbicular .....	26
5.5.2.1 Extracto acuoso .....	26
5.5.2.2 Extractos etanólico y metanólico (sin secado previo).....	26
5.5.2.3 Extractos etanólico y metanólico (con secado previo) .....	26
5.5.3 Método de difusión de pozos de agar .....	27
5.5.4 Concentración mínima inhibitoria .....	28
<b>5.6 Análisis estadísticos .....</b>	<b>29</b>
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>6.1 Determinación botánica de miel .....</b>	<b>30</b>
<b>6.2 Determinación botánica del polen corbicular.....</b>	<b>31</b>
<b>6.3 Capacidad antimicrobiana de miel .....</b>	<b>33</b>
6.3.1 Actividad antibacteriana.....	33
6.3.2 Concentración mínima inhibitoria .....	34
<b>6.4 Capacidad antimicrobiana de polen corbicular .....</b>	<b>35</b>
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>7.1 Determinación botánica de miel .....</b>	<b>36</b>
<b>7.2 Determinación botánica del polen corbicular.....</b>	<b>37</b>
<b>7.3 Capacidad antimicrobiana de la miel.....</b>	<b>39</b>
<b>7.4 Capacidad antimicrobiana de polen corbicular .....</b>	<b>42</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>IX. REFERENCIAS .....</b>	<b>46</b>
<b>X. ANEXOS .....</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de la ubicación geográfica del ecosistema estudiado, correspondiente al predio Corderito, ubicado en la comuna de Yumbel, en la región del Biobío.....	21
<b>Figura 2.</b> Apiario experimental del cual se recolectaron las muestras de polen corbicular ubicado en el predio Corderito, comuna de Yumbel. (a) Instalación de trampas en colmenas. (b) Colmena con trampa de polen instalada. (c) Primera recolección de polen corbicular realizada el 4 de enero de 2024. (d) Segunda recolección de polen corbicular realizada el 23 de enero de 2024. ....	22
<b>Figura 3.</b> Separación por color de los cúmulos corbiculares bajo luz natural. ....	24
<b>Figura 4.</b> Imágenes de granos de polen de la muestra de miel, cosecha 2024 de Corderito, observados con un microscopio óptico (40x). (a) <i>Quillaja saponaria</i> . (b) <i>Galega officinalis</i> . (c) <i>Lotus pedunculatus</i> .....	31
<b>Figura 5.</b> Imágenes de granos de polen de las muestras de polen corbicular observados con un microscopio óptico (40x). (a) <i>Medicago sativa</i> . (b) <i>Galega officinalis</i> . (c) <i>Schinus polygamus</i> . (d) <i>Rubus ulmifolius</i> .....	33
<b>Figura 6.</b> Halos de inhibición observados en diferentes microorganismos con la aplicación de miel pura. (a) <i>Escherichia coli</i> cultivada en agar Mueller-Hinton con halo de inhibición. (b) <i>Staphylococcus aureus</i> cultivada en agar Mueller-Hinton con halo de inhibición. (c) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivada en agar Mueller-Hinton con halo de inhibición. (d) <i>Candida albicans</i> cultivada en agar Sabouraud sin halo de inhibición.....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Presencia polínica relativa de la miel procedente de Corderito, cosecha 2024. ** N: Nativa, E: Endémica e I: Introducida.....	30
<b>Tabla 2.</b> Presencia polínica relativa de la primera recolección de polen corbicular procedente de Corderito 2024. PMS: código de color asociado a los cúmulos corbiculares según la tabla estandarizada de colores PMS. Peso (g): peso total de los cúmulos corbiculares correspondientes a cada grupo de color. ** N: Nativa, E: Endémica e I: Introducida. ....	31
<b>Tabla 3.</b> Presencia polínica relativa de la segunda recolección de polen corbicular procedente de Corderito 2024. PMS: código de color asociado a los cúmulos corbiculares según la tabla estandarizada de colores PMS. Peso (g): peso total de los cúmulos corbiculares correspondientes a cada grupo de color. ** N: Nativa, E: Endémica e I: Introducida. ....	32
<b>Tabla 4.</b> Capacidad antimicrobiana de la miel producida en Corderito, cosecha 2024, frente a diferentes microorganismos patógenos (mm de diámetro de halo de inhibición incluye el pozo de 6 mm). **s.a: sin actividad.....	34
<b>Tabla 5.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de la miel de Corderito, cosecha 2024, expresado en porcentaje (m/v). ...	35

## RESUMEN

La miel y el polen corbicular son productos de la colmena de *Apis mellifera*, cuyas composiciones polínicas y propiedades bioactivas están influenciadas a partir del origen geográfico y floral. Ambos productos destacan por su creciente valor en la industria alimentaria y farmacéutica debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. En el predio Corderito, ubicado en Yumbel, Región del Biobío, se encuentra la mayor plantación de quillay (*Quillaja saponaria* Molina) en Chile, transformándose en un lugar experimental estratégico para investigaciones relacionadas con estos productos. El objetivo de este estudio fue identificar la composición botánica y evaluar la capacidad antimicrobiana de la miel y el polen corbicular producidos en la temporada 2024, en el predio Corderito. La determinación botánica de la miel se realizó mediante la norma chilena Nch2981 (2005), mientras que la composición del polen corbicular se determinó mediante la norma chilena Nch3255 (2011). La capacidad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en pozos de agar, determinando la concentración mínima inhibitoria frente a los patógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Los resultados revelaron que la miel es monofloral de quillay, mientras que el polen corbicular fue clasificado como monofloral no nativo de alfalfa (*Medicago sativa* L.). La miel mostró actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, siendo *S. aureus* el microorganismo más susceptible; sin embargo, no presentó actividad frente a *C. albicans*. En contraste, el polen corbicular no presentó actividad antimicrobiana frente a ningún patógeno bajo las condiciones experimentales utilizadas. Este último resultado puede atribuirse al almacenamiento prolongado de las muestras. Los resultados de la presente investigación subrayan la selectividad floral de *A. mellifera*, y confirman el potencial de la miel de quillay como un recurso con propiedades antimicrobianas.

## ABSTRACT

Honey and corbicular pollen are products of the *Apis mellifera* hive, whose pollen compositions and bioactive properties are influenced by their geographical and floral origins. Both products stand out for their growing value in the food and pharmaceutical industries due to their antioxidant and antimicrobial properties. The Corderito estate, located in Yumbel, Biobío Region, houses the largest quillay (*Quillaja saponaria* Molina) plantation in Chile, making it a strategic experimental site for research related to these products. The objective of this study was to identify the botanical composition and evaluate the antimicrobial capacity of honey and corbicular pollen produced during the 2024 season at the Corderito estate. The botanical determination of honey was carried out according to the Chilean standard NCh2981 (2005), while the composition of corbicular pollen was determined according to the Chilean standard NCh3255 (2011). Antimicrobial capacity was evaluated using the agar well diffusion method, determining the minimum inhibitory concentration against the pathogens *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. The results revealed that the honey is monofloral from quillay, while the corbicular pollen was classified as monofloral and non-native to alfalfa (*Medicago sativa* L.). Honey showed antimicrobial activity against *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*, with *S. aureus* being the most susceptible microorganism; however, it showed no activity against *C. albicans*. In contrast, corbicular pollen exhibited no antimicrobial activity against any pathogen under the experimental conditions used. This latter result may be attributed to the prolonged storage of the samples. The findings of this research highlight the floral selectivity of *A. mellifera* and confirm the potential of quillay honey as a resource with antimicrobial properties.

## I. INTRODUCCIÓN

*Apis mellifera* Linnaeus (1758), o abeja melífera, es un insecto ampliamente conocido por su papel en la polinización, un servicio ecosistémico esencial para la biodiversidad vegetal, la calidad de los productos vegetales y frutales (Papa et al 2022). La apicultura se originó aproximadamente en el 2400 a.C., en el antiguo Egipto (Crane 1999) y actualmente, se practica en todos los continentes, excepto la Antártica (Matsuzawa and Kohsaka 2021). En Chile, la introducción de la abeja melífera ocurrió en 1848 con el propósito principal de polinizar frutales (Rodríguez et al. 2022). Antes de finales del siglo XVIII, Chile importaba unos 15 mil kilogramos de miel, y solo 29 años después de su introducción, en 1873, se comenzó a exportar miel y cera a Europa (Cuevas 2021). Sin embargo, no fue sino hasta el año 2000, cuando se impulsó el desarrollo y profesionalización de la apicultura en Chile, incluyendo aspectos de institucionalización, fomento, exportaciones, certificaciones; además, de un creciente interés en patologías y parásitos apícolas, y en la caracterización y valorización de los productos apícolas (Cuevas 2021).

En la actualidad, en Chile se producen entre 7.000 y 11.000 toneladas de miel al año, lo que representa el 0,8 % de la producción mundial, ocupando el cuarto lugar entre los países productores de miel de Latinoamérica, detrás de México, Argentina y Brasil (INDAP 2021). En el año 2022 se exportaron 4.184 toneladas (equivalente a USD 16,85 millones FOB); sin embargo, la mayor parte de esa producción se exportó en formato a granel sin agregación de valor (Iturra 2023), limitando su competitividad en el mercado global. Gracias al fomento del rubro apícola se ha evidenciado un incremento no solo en el número de apicultores sino también en el volumen de exportación de miel; no obstante, se ha evidenciado una reducción en el volumen de miel producido (Tello 2024). Por su parte, el polen corbicular, otro producto de la colmena, solo se comercializa en el mercado interno como alimento proteico tanto apícola como para el ser humano, sin valor agregado (SAG 2024).

Investigaciones científicas alrededor del mundo han reportado la capacidad antimicrobiana de la miel y el polen contra patógenos apícolas y humanos, atribuyendo sus efectos tanto al potencial nutritivo de estos elementos como a las

propiedades de los fitoquímicos asociados a su composición botánica (Gercek et al. 2022; Feknous and Boumendjel 2022). En Chile, la flora se caracteriza por ser muy diversa, abarcando una amplia variedad de ecosistemas, y presenta una alta tasa de endemismos, es decir, muchas especies de plantas son únicas del territorio chileno y no se encuentran de forma natural en ningún otro lugar del mundo, por lo que cada miel originaria de una zona geográfica específica podría contener distintas propiedades atribuidas a plantas nativas, como ha sido registrado para el quillay (*Quillaja saponaria* Molina), lo que aporta beneficios a la salud humana (Montenegro 2023); así también, estas propiedades podrían verse reflejadas en el polen colectado de apiarios ubicados en la misma zona geográfica de esas mieles particulares. De esta manera vemos que el poco valor agregado, tanto en la miel como en el polen, no solo disminuye el potencial económico para los apicultores locales, sino que también subestima las propiedades únicas de la miel y el polen chileno asociadas a la flora de nuestro país (Montenegro 2022).

Actualmente, en la región geográfica del secano interior de la comuna de Yumbel, en la Región del Biobío, Chile centro sur, se encuentra la plantación de quillay más grande del país (predio Corderito), en donde se han desarrollado investigaciones experimentales en cuanto a producción de miel monofloral (Rondanelli, Com. Pers.). En Chile no existen estudios sobre la composición botánica y la actividad antimicrobiana de miel y polen corbicular obtenidos de apiarios insertos en una plantación de quillay, por lo que aportar con este conocimiento puede contribuir a la valorización de dichos productos apícolas, aumentar la competitividad de la apicultura chilena en el mercado, a incrementar la sostenibilidad económica de los apicultores locales y a impulsar la innovación en productos apícolas con aplicaciones terapéuticas.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Abeja melífera**

La abeja melífera europea *Apis mellifera* L., es un insecto de comportamiento social, perteneciente al orden Hymenoptera, familia Apidae. Corresponde a la especie de abeja con mayor distribución geográfica del mundo, y se considera un polinizador generalista de plantas silvestres y cultivos agrícolas (Ramos et al. 2023).

*Apis mellifera*, la única abeja melífera nativa de Europa, fue domesticada durante la época romana (Crane 2004; Weber 2013) y no fue hasta los años 1600 que los humanos la introdujeron en América del Norte y en la mayoría de las zonas habitables del mundo (VanEngelsdorp and Meixner 2010). Actualmente, *A. mellifera* está presente en todo el planeta (excepto en la Antártica) gracias a la gestión antrópica (Geslin et al. 2017).

El comportamiento de búsqueda de alimento de la abeja o “pecoreo” es una de las conductas distintivas de *A. mellifera*, el cual representa el vínculo entre la colonia de abejas melíferas y el ambiente (Abou-Shaara 2014).

### **2.2 Productos de la colmena**

La colmena es el conjunto de elementos formado por un enjambre de abejas, la estructura que lo contiene y los elementos propios necesarios para la supervivencia de las abejas (Jean-Prost et al. 2007). Puede ser fija, cuyas colmenas permanecen todo el año en un mismo predio, y/o trashumantes, cuyas colmenas son desplazadas a otros predios, o lugares, a lo largo del año (Aguilera 2013).

Las abejas producen y almacenan diversos productos en las colmenas, donde se encuentra el propóleo, pan de abeja, jalea real, cera, polen y miel, siendo este último producto uno de los más conocido y apreciado (Vit 2004; Astolfi et al 2020). Estos productos se originan a partir de granos de polen, néctares y otros materiales vegetales, solos o mezclados con las secreciones de las glándulas salivales de las abejas y las secreciones de las plantas (Alvarez-Suarez 2017).

En Chile, existe un manual de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) descrito por el Ministerio de Agricultura, con especificaciones técnicas para la apicultura, el cual

contempla todas las acciones involucradas en su producción, desde el manejo del colmenar en el predio hasta la extracción y envasado de miel, orientados a asegurar la inocuidad de la miel, la protección del ambiente y de las personas que trabajan en el área (Vallette et al. 2004).

### **2.3. Composición botánica de miel y polen**

La producción melífera chilena se distingue por una variedad de mieles con cualidades únicas a nivel mundial gracias a la alta participación de especies vegetales nativas y endémicas, las que le otorgan cualidades organolépticas particulares, debido principalmente al alto endemismo de esta flora (Montenegro et al. 2008). A pesar de esta notable característica de la miel chilena cerca del 95% de la producción se exporta a granel, sin valor agregado, lo que equivale al 1% de participación en el mercado mundial, por lo que diferenciar la producción y darle características únicas, favorecería la competencia (Montenegro et al. 2008). Para contribuir a este objetivo se estableció un sistema de trazabilidad y se implementó la Norma Chilena Oficial (NCh2981.Of2005) “Miel de abejas - Denominación de origen botánico mediante ensayo melisopalinológico” la cual le otorga la denominación de origen botánico a las mieles, catalogándolas como monofloral, bifloral o multifloral.

Chile cuenta con una extensa geografía y diversidad de climas, además de ventajas ambientales, recursos melíferos y barreras sanitarias naturales, lo que le permite producir mieles de cualidades únicas (Montenegro 2000). La flora del país es diversa, con especies nativas, endémicas y exóticas, donde las nativas son aquellas que viven de forma natural en zonas determinadas, es decir, se cree que se originaron o llegaron naturalmente a dicha zona sin la intervención de las personas; las endémicas son aquellas que solamente habitan en un determinado territorio, ya sea un continente, un país, una región política administrativa, una región biogeográfica, una isla o una zona particular, siendo las especies endémicas un subconjunto de las especies nativas; mientras que las exóticas, son aquellas especies foráneas que han sido introducidas a nuestro país por los seres humanos, ya sea intencional o involuntariamente (Chester 2016). La miel se caracteriza por

tener polen en su composición, resultado de la recolección de las abejas pecoreadoras a partir de diversas especies florales, lo que permite establecer su origen botánico y geográfico a través de la melisopalinología, análisis que proporciona un perfil de polen que indica la diversidad de especies vegetales visitadas por las abejas para obtener néctar (Lobos y Silva 2020).

El néctar que recolectan las abejas es llevado a la colmena en una estructura llamada buche melario, en donde la abeja lo mezcla con su saliva, añadiendo enzimas como la invertasa, que tiene como función degradar la sacarosa (disacárido) a glucosa y fructosa (monosacáridos) (White 1975). Cuando llega a la colmena la abeja de pecoreo le entrega el néctar a sus compañeras obreras las cuales lo depositan en celdas destinadas a contener el néctar, para que posteriormente madure y se transforme en miel (Berenbaum y Calla 2021).

Al igual que el néctar, el polen también es atractivo para las abejas debido a su alto valor nutricional. Si el polen ofrece a las abejas los nutrientes necesarios esenciales con menos esfuerzo en comparación con la recolección de néctar, entonces será más atractivo para ellas y preferirán recolectar polen (Kostić et al. 2017; Denisow and Denisow-Pietrzyk 2016).

El polen colectado constituye cúmulos coloreados que son transportados a la colmena en canastillos especiales llamados cavidades corbiculares, ubicadas en el tercer par de patas y al que se le denomina polen corbicular o también polen apícola (Montenegro 2022). El polen corbicular es recolectado por el apicultor en la entrada de la colmena, por medio de trampas (Salamanca 2011). Dentro de la colonia al producto se le denomina “pan de abeja” y es considerado la principal fuente de proteínas de las abejas, siendo de vital importancia para su desarrollo (Valdés 2014).

El polen corbicular puede ser vendido como alimento, pero también se puede vender para uso terapéutico, para este último se debe contar con un etiquetado especial y también con respaldo científico, a través de la Food and Drug Administration (FDA) (Valdés 2014).

Hoy en día, no existe una normativa internacional que establezca los requisitos de composición del polen corbicular. Algunos países como Brasil, Bulgaria, Polonia, China, Corea del Sur y Suiza han desarrollado sus propios estándares que regulan este producto (Ghosh and Jung 2017). En Chile, el instituto de normalización cuenta con la normativa “Calidad de la colmena para polinización y diferenciación del polen según origen botánico” (Nch3255.Of2011).

#### **2.4 Propiedades antimicrobianas de miel y polen**

La resistencia a los antibióticos es uno de los problemas grandes que se está generando en el mundo, esto debido al uso indiscriminado de antibióticos en la medicina humana (Larsson and Flach 2021). Como respuesta a esta creciente amenaza, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2015 elaboró un plan de acción para combatir este problema, con la finalidad de asegurar que se pueda seguir previniendo y tratando enfermedades infecciosas por medio de fármacos eficaces y seguros (OMS 2016). Dentro de los objetivos de este plan de acción se contempla reforzar la vigilancia y la investigación generando alianzas donde se fomente la investigación y el desarrollo mediante colaboraciones público-privadas (Barrantes et al. 2022). Por esta razón, surge la necesidad de buscar alternativas de tratamientos, entre las cuales los productos elaborados por *A. mellifera* representan una excelente opción (Nader et al. 2021). Desde la antigüedad, los productos de la colmena han sido utilizados con fines medicinales y cada vez se tiene más conocimiento de sus potenciales usos (Bagdanov 2016).

La miel contiene alrededor de 200 tipos de compuestos diferentes, que incluyen agua, azúcares, aminoácidos libres, proteínas, enzimas, minerales esenciales, vitaminas y además, compuestos fenólicos y una gran variedad de compuestos volátiles (Alqarni et al. 2014; Escudero et al. 2013). Por otra parte, la miel se caracteriza por tener un bajo nivel de pH que oscila entre 3,4 y 6,1 (Moniruzzaman et al. 2013).

Cada tipo de miel muestra un grado diferente de actividad antimicrobiana debido a la gran cantidad de factores que pueden alterar la composición de los componentes bioactivos que se encuentran en la miel, como enzimas, contenido de azúcar,

péptidos como la defensina-1 derivada de las abejas y compuestos metabólicos (Nolan et al. 2019).

El efecto antimicrobiano está mediado por dos mecanismos: una vía dependiente del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que se forma a través de la acción de la glucosa oxidasa, una enzima metabolizadora de carbohidratos añadida al néctar por las abejas, el peróxido de hidrógeno es un compuesto químico que tiene propiedades antimicrobianas, lo que significa que puede matar o detener el crecimiento de bacterias (Bang et al. 2003). En estudios, se ha encontrado que cuando se elimina el  $H_2O_2$  de la miel utilizando una enzima llamada catalasa (que descompone el peróxido de hidrógeno), la capacidad de la miel para detener el crecimiento bacteriano disminuye (Brudzynski et al. 2012; Taormina et al. 2001). En cuanto a la vía independiente del peróxido de hidrógeno, las propiedades fisicoquímicas que consisten en una alta viscosidad y un alto contenido de azúcar son los dos factores que confieren a la miel su efecto antibacteriano; además, una baja cantidad de agua en la miel genera deshidratación bacteriana por presión osmótica (Nader et al. 2021).

La miel de quillay ha demostrado propiedades antimicrobianas contra diversos patógenos grampositivos y gramnegativos, incluyendo *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, y ha alcanzado hasta un 100% de inhibición en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Cabrero et al. 2020; Montenegro et al. 2009; Montenegro and Mejías 2013).

Por su parte, el polen contiene varios nutrientes y compuestos bioactivos como azúcares, lípidos, carbohidratos, proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales, carotenoides, macro y micronutrientes y es una fuente potencial de antioxidantes naturales debido a la abundancia de compuestos fenólicos. El polen de abeja es una buena fuente de compuestos polifenoles y flavonoides, que tienen la capacidad de eliminar los radicales libres y reducir el estrés oxidativo en el cuerpo. Al disminuir la oxidación celular, estos antioxidantes ayudan a mitigar la inflamación y proteger contra lesiones, reduciendo el riesgo por infecciones bacterianas. El polen de abeja

contiene flavonoides como la rutina, la quercetina, la isoquercetina, la naringenina, el kaempferol y la luteolina (Yang et al. 2020; Ares et al. 2018; Omar et al. 2018).

El agua, el etanol y el metanol son los disolventes más comúnmente utilizados para la obtención de extractos de polen de abeja. Los estudios han demostrado que los extractos obtenidos con etanol o agua contienen una mayor cantidad de compuestos bioactivos en comparación con el polen de abeja natural (Kroyer and Hegedus 2001).

El mecanismo antibacteriano del polen de abeja aún no se comprende completamente. Sin embargo, los estudios sugieren que su actividad antibacteriana está relacionada con la glucosa oxidasa, una enzima producida por las abejas melíferas y añadida al polen durante la formación de los cúmulos corbiculares (Campos et al. 2021).

El polen corbicular tiene actividad antimicrobiana contra muchas cepas patógenas, pero sorprendentemente, no afecta a los cultivos iniciadores de ácido láctico. Esto sugiere que el polen corbicular podría ser un candidato potencial más adecuado que los antibióticos, ya que inhibe el crecimiento de patógenos sin perjudicar a los probióticos beneficiosos para el ser humano (Kačániová et al. 2012).

En Chile, se evaluó la actividad antimicrobiana del polen de abeja contra varias bacterias patógenas humanas. Los estudios mostraron que el polen de abeja chileno fue efectivo contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Los extractos de etanol y metanol del polen de abeja también se investigaron, demostrando que el extracto de etanol fue efectivo contra *Staphylococcus aureus*, mientras que el extracto de metanol mostró efectividad contra *Salmonella enterica* (Valdivia-Olivares et al. 2023; Cabrera and Montenegro 2013).

## **2.5 Plantación de quillay en el predio Corderito**

El predio Corderito, está ubicado en el secano interior de la comuna de Yumbel, Región del Biobío, Chile. Es parte de un programa de reforestación de especies nativas impulsado por la empresa chilena Colbún, como parte de un plan de

compensación ambiental debido a la construcción de la Central Hidroeléctrica Angostura, ubicada en la cuenca del río Biobío entre Santa Bárbara y Quilaco, en la Región del Biobío. Es así como en este predio se encuentra la plantación de quillay más grande de Chile, con una extensión de 125 hectáreas dedicadas a esta especie en un 98%, acompañadas de otras como el roble, laurel y el maitén. Esta plantación forma parte del programa de Colbún “Apicultura Comunitaria: compartiendo la mejor energía de nuestros bosques”, una iniciativa que busca combinar la reforestación con la apicultura local. Desde la temporada 2019 la Cooperativa Campesina Apícola Santa Bárbara Ltda., COASBA, que reúne a apicultores de la comuna de Santa Bárbara, ha sido beneficiaria de este programa (Maragaño 2021). En este predio existe una ventaja para la producción de miel monofloral de quillay, dada la abundancia de la especie

El quillay (*Quillaja saponaria* Molina.) es un árbol siempreverde, endémico de la zona mediterránea de Chile, distribuido desde la Región de Coquimbo hasta la Región de La Araucanía. Puede alcanzar hasta 30 metros de altura, con flores estrelladas de color blanco amarillento que florecen entre diciembre y enero, aunque en ocasiones pueden aparecer desde el mes de octubre. Es una especie de rápido crecimiento, longeva y fundamental en el bosque esclerófilo chileno debido a su abundancia y amplia distribución. Además, destaca por su capacidad de adaptarse a climas secos y cálidos, lo que la convierte en un recurso clave para proyectos de reforestación y conservación (Benedetti et al. 2000).

El quillay es una especie que destaca en la producción de miel en Chile, no solo por su abundancia, sino también por sus características sensoriales únicas. La miel de quillay se distingue por su alto contenido de compuestos fenólicos, como flavonoides, que aportan significativamente a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Estas cualidades resaltan la importancia de esta especie tanto en la apicultura como en la elaboración de miel de alta calidad (Bridi et al. 2017).

### III. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La actividad antimicrobiana de la miel y el polen corbicular, atribuida a la presencia de fitoquímicos, varía dependiendo de la composición botánica presente en cada uno de estos productos, lo que influye en la capacidad para inhibir el crecimiento de distintos patógenos. En Chile, existen estudios previos en miel de quillay que indican la presencia de esta capacidad inhibitoria sobre bacterias patógenas.

En el predio Corderito, ubicado en el secano interior de Yumbel, Región del Biobío, se encuentra la plantación de quillay más grande en Chile, en donde se han obtenido en temporadas sucesivas resultados de producción de miel monofloral de quillay.

De acuerdo con lo anterior, los supuestos de trabajo para la presente investigación son:

- 1) La producción de miel del predio Corderito, de la temporada 2024, será monofloral de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.).
- 2) La miel asociada a los apiarios experimentales establecidos en el predio Corderito presentará actividad antimicrobiana contra patógenos que afectan al ser humano.
- 3) El polen corbicular asociado a los apiarios experimentales establecidos en el predio Corderito presentará actividad antimicrobiana contra patógenos que afectan al ser humano.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Identificar la composición botánica y medir la capacidad antimicrobiana de la miel y polen corbicular producidos en la temporada 2024, en el predio Corderito, Yumbel, Región del Biobío.

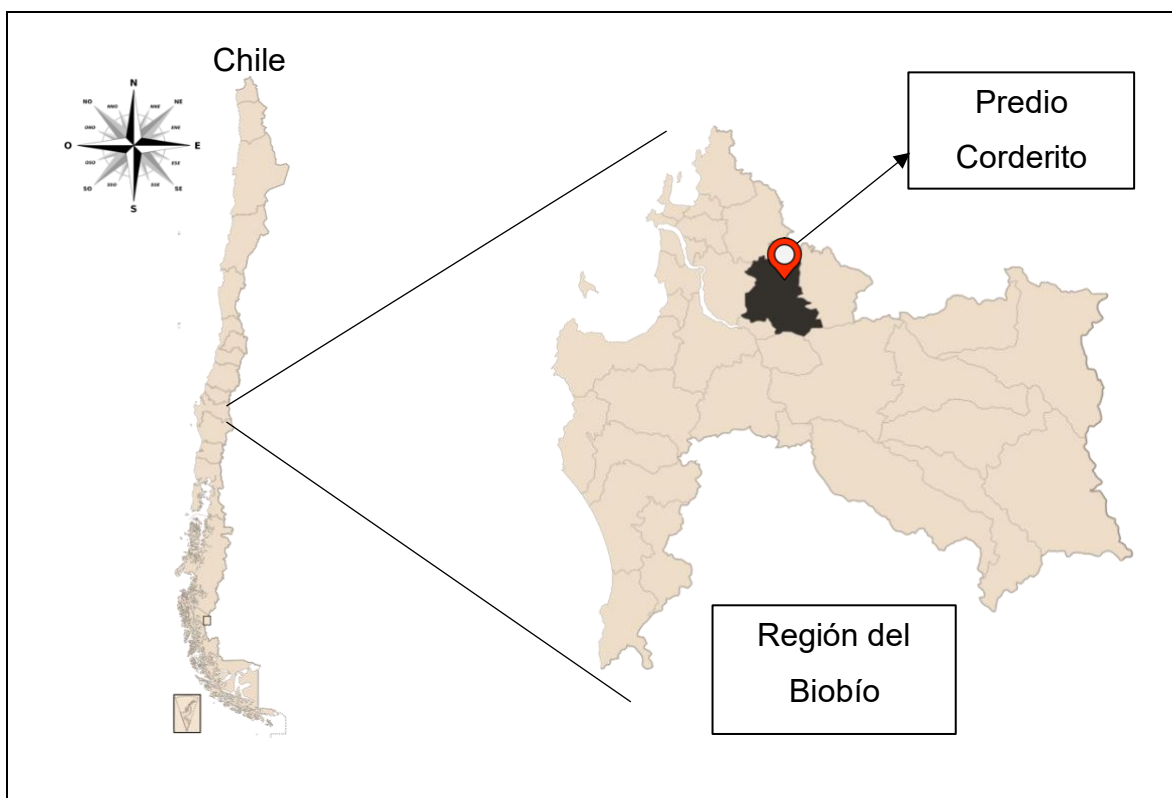
### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar la composición botánica de la miel y polen corbicular, producidos en Corderito 2024, de acuerdo con la Nch2981.Of2005 y Nch3255.Of2011.
- Evaluar la actividad antibacteriana de la miel y polen corbicular producidos en Corderito 2024, contra patógenos mediante el método de difusión en pozos de agar.
- Identificar la concentración mínima inhibitoria contra patógenos, de la miel y polen corbicular producidos en Corderito 2024, mediante el método de microdilución en caldo.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 Área de estudio

El área de estudio corresponde a la plantación de *Q. saponaria* ubicada en el predio Corderito (Latitud -37.027499, Longitud -72.671934) situado en la comuna de Yumbel, Región del Biobío (Figura 1).

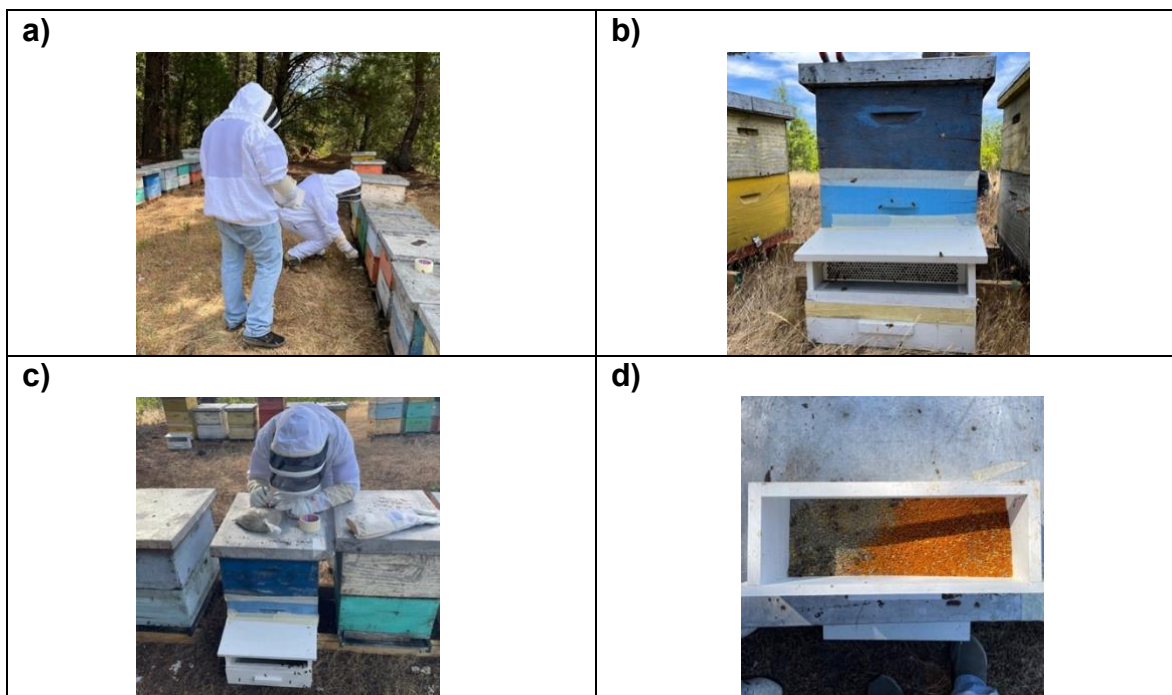


**Figura 1.** Mapa de la ubicación geográfica del ecosistema estudiado, correspondiente al predio Corderito, ubicado en la comuna de Yumbel, en la región del Biobío.

### 5.2 Obtención de muestras

El material de polen corbicular se obtuvo de apiarios experimentales instalados en el predio Corderito, perteneciente a la empresa chilena de energía, Colbún. En este predio se encuentra una plantación de 125 hectáreas de quillay, establecida como parte de un plan de compensación ambiental debido a la construcción de la Central Hidroeléctrica Angostura, ubicada en la cuenca del río Biobío entre Santa Bárbara y Quillaco, en la Región del Biobío. Las trampas de polen corbicular, diseñadas para recolectar el polen que las abejas depositan en las corbículas de sus patas traseras, fueron colocadas el 15 de diciembre de 2023, a inicio de la floración de quillay, por

el equipo del Laboratorio de Palinología y Ecología Vegetal de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. La primera recolección de polen corbicular se realizó el 4 de enero de 2024, 21 días después de la instalación de las trampas. La segunda recolección se realizó el 23 de enero de 2024, 20 días después de la primera recolección (figura 2). La cosecha de miel de los apiarios experimentales fue realizada una vez finalizada la floración de quillay, el 21 de enero de 2024.



**Figura 2.** Apiario experimental del cual se recolectaron las muestras de polen corbicular ubicado en el predio Corderito, comuna de Yumbel. (a) Instalación de trampas en colmenas. (b) Colmena con trampa de polen instalada. (c) Primera recolección de polen corbicular realizada el 4 de enero de 2024. (d) Segunda recolección de polen corbicular realizada el 23 de enero de 2024.

### 5.3 Determinación botánica de miel

#### 5.3.1 Método melisopolinológico

La determinación polínica de la miel cosechada en la temporada 2024 procedente de Corderito, se realizó de acuerdo con la Norma Chilena Nch2981 (2005). Para esto se aplicó el método de mezcla acetolítica descrito por Erdtman (1960) modificado. Se pesaron 40 g de miel en un vaso precipitado previamente rotulado, luego se añadió agua destilada en proporción 1:1 para disolver y se agitó hasta conseguir una solución homogénea. A continuación, se agregaron 15 mL de la

muestra en un tubo Falcon, el cual se centrifugó por 15 minutos a 4.400 rpm. Se descartó el sobrenadante y se realizaron centrifugaciones sucesivas hasta concentrar la muestra.

Al concentrado de polen obtenido se le añadieron 5 mL de ácido acético glacial para deshidratar la muestra. Luego, se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 4.400 rpm y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se preparó una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico en proporciones 9:1, respectivamente, en un vaso precipitado de 100 mL. La reacción se realizó en un baño María a 80°C. Una vez enfriada la mezcla, se transfirió nuevamente a los tubos Falcon y se añadió 5 mL de ácido acético glacial para neutralizar la reacción. La muestra se centrifugó durante 15 minutos a 4.400 rpm y se descartó el sobrenadante. Luego, se lavó con agua destilada y se centrifugó nuevamente por 15 minutos a 4.400 rpm (este proceso se repitió dos veces). El residuo final se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.

### **5.3.2 Montaje y visualización de la muestra**

La muestra se montó en un portaobjetos añadiendo una alícuota de glicerina y una de miel acetolizada. Luego, se cubrió con un cubreobjetos y se selló por los bordes con esmalte transparente.

El conteo de polen al microscopio siguió la metodología clásica de área mínima utilizado en palinología (Bianchi y D'Antoni 1986). La visualización de la muestra se realizó en un microscopio óptico utilizando el objetivo 40x, y el conteo se realizó en triplicado. Los granos de polen contabilizados fueron expresados en porcentajes, calculados por regla de tres simple, que representa la proporción relativa de las especies dentro del total de la muestra. El análisis palinológico de la miel consistió en la determinación de los granos de polen a nivel de familia, género y/o especie, basándose en las características morfológicas de la pared celular del grano de polen (exina). Para ello, se utilizó bibliografía especializada en palinología (Heusser, 1971; Beug, 2004) y se empleó la palinoteca de referencia del Laboratorio de Palinología y Ecología Vegetal de la Universidad de Concepción, campus Los Ángeles

## 5.4 Determinación botánica de polen corbicular

### 5.4.1 Separación por color de los cúmulos corbiculares

Para la separación por colores, primero se limpió la muestra para eliminar impurezas. A continuación, se extrajeron 10 gramos de cúmulos corbiculares, diferenciados por colmena y fecha de recolección. La separación inicial de los cúmulos por color se realizó bajo luz natural (Figura 3). Luego, se llevó a cabo una separación final bajo lupa con fondo negro. A cada grupo de cúmulos corbiculares se le asignó un color de acuerdo con la escala de colores Pantone® Matching System Color Chart (PMS). Luego, se pesó cada grupo resultante para obtener el peso correspondiente de cada grupo en relación con el peso total de la muestra (Nch3255 2011).



**Figura 3.** Separación por color de los cúmulos corbiculares bajo luz natural.

### 5.4.2 Visualización bajo microscopio de los cúmulos corbiculares

Para la visualización de los cúmulos corbiculares, se aplicó la técnica de acetólisis descrita por Erdtman (1960) modificada. Esta técnica consistió en depositar los distintos grupos de colores de los cúmulos corbiculares en tubos Falcon de 15 mL, añadir 5 mL de ácido acético glacial y homogenizar en vortex. Luego, se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 4.400 rpm y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente, se prepararon mezclas de anhídrido acético y ácido

sulfúrico en proporciones 9:1, respectivamente, en vasos precipitados de 100 mL. La reacción se realizó en un baño María a 80°C. Una vez enfriadas las mezclas, se transfirieron nuevamente a los tubos Falcon y se le añadieron 5 mL de ácido acético glacial para neutralizar las reacciones. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4.400 rpm y se descartó el sobrenadante. Luego, se lavaron con agua destilada y se centrifugaron nuevamente por 15 minutos a 4.400 rpm (este proceso se repitió dos veces). El residuo final se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Las muestras se montaron en portaobjetos añadiendo una alícuota de glicerina y una de polen corbicular acetolizado. Luego, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron por los bordes con esmalte transparente.

Este procedimiento se realizó de acuerdo con la Norma Chilena Oficial Nch2981 (2005) “Miel de abejas - Denominación de origen botánico mediante ensayo melisopalinológico”. La técnica se adaptó según la Norma Chilena Oficial Nch3255 (2011) “Calidad de la colmena para polinización y diferenciación del polen según origen botánico”, suprimiendo la tinción de los granos de polen con fucsina y reemplazándola por el uso de una mezcla acetolítica. Este ajuste optimiza la identificación y posterior determinación polínica.

La visualización de la muestra se realizó en un microscopio óptico utilizando un objetivo de 40x. El análisis palinológico de los cúmulos corbiculares consistió en la determinación de éstos a nivel de familia, género y/o especie, basándose en las características morfológicas de la pared celular del grano de polen (exina). Para ello, se utilizó bibliografía especializada en palinología (Heusser, 1971; Beug, 2004) y se empleó la palinoteca de referencia del Laboratorio de Palinología y Ecología Vegetal de la Universidad de Concepción, campus Los Ángeles

## **5.5 Actividad antimicrobiana**

### **5.5.1 Preparación de disolución de miel**

Se pesaron 5 g de miel y se diluyeron en 5 ml de agua destilada estéril, obteniendo una solución con una concentración de 100% m/v (1 g mL<sup>-1</sup>). La solución resultante se esterilizó utilizando un sistema de filtración por contrapresión con jeringas

equipadas con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Montenegro et al. 2009). El extracto filtrado se almacenó en una botella marrón a una temperatura de  $4 \pm 2$  °C.

### **5.5.2 Preparación de extracto de polen corbicular**

Se prepararon tres tipos de extractos de polen corbicular utilizando diferentes métodos: extracto acuoso, extracto etanólico y extracto metanólico.

#### **5.5.2.1 Extracto acuoso**

El polen corbicular se trituró en un mortero hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se pesaron 5 g del polvo obtenido y se mezcló con 5 mL de agua destilada. La mezcla se llevó a ebullición a 100°C. A continuación, la mezcla fue sometida a agitación continua a una temperatura constante de 60°C por una hora aproximadamente utilizando un agitador magnético con calentador. A continuación, la mezcla se filtró con papel Whatman No.1 (Bridi et al. 2019). El extracto obtenido se almacenó en una botella marrón a temperatura de  $4 \pm 2$ °C (Bildir et al. 2023).

#### **5.5.2.2 Extractos etanólico y metanólico (sin secado previo)**

El polen corbicular se trituró en un mortero hasta obtener un polvo fino. De este, se pesaron 2 g y se mezclaron con 10 ml de etanol en una muestra y con 10 ml de metanol en otra. Ambas muestras se dejaron en maceración durante 24 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, cada muestra fue sometida a ultrasonido durante 30 minutos para facilitar la extracción de compuestos bioactivos. Luego, se colocaron en un agitador magnético a 150 rpm durante 1 hora. El líquido resultante fue filtrado utilizando papel filtro junto con un sistema de filtración al vacío. Este proceso se repitió una vez más, y los filtrados obtenidos se combinaron en un matraz.

Los extractos combinados se concentraron utilizando un evaporador rotativo a 45 °C y 80 rpm hasta completar la evaporación del disolvente. Los extractos finales se almacenaron en botellas marrones a una temperatura de  $4 \pm 2$  °C.

#### **5.5.2.3 Extractos etanólico y metanólico (con secado previo)**

El polen corbicular fue secado en una estufa a 36 °C durante 48 horas. Una vez seco, se trituró en un mortero hasta obtener un polvo fino. De este polvo, se pesaron

2 g y se mezclaron con 10 ml de etanol en una muestra y con 10 ml de metanol en otra.

El procedimiento de maceración, ultrasonido, agitación magnética, filtración y concentración siguió el mismo protocolo descrito en los extractos etanólico y metanólico sin secado previo. Los extractos finales se almacenaron en botellas marrones a una temperatura de  $4 \pm 2$  °C.

### **5.5.3 Método de difusión de pozos de agar**

La actividad antimicrobiana de la miel y polen corbicular se determinó mediante el método de difusión de pozo de agar. Para esto se seleccionaron las siguientes cepas de referencia: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Candida albicans* ATCC 10231. Las cepas bacterianas se cultivaron en agar Mueller-Hinton, mientras que el hongo se cultivó en agar Sabouraud, incubándose a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se tomaron colonias individuales y se suspendieron en tubos que contenían suero fisiológico estéril y se midió la turbidez hasta obtener el estándar de 0,5 en la escala de McFarland confirmada por lectura espectrofotométrica a 580 nm (equivalente a una concentración de aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml) (Matuschek et al. 2014).

Para evaluar la actividad antibacteriana, se prepararon pozos de 6 mm de diámetro en placas de agar Mueller-Hinton (para bacterias) y agar Sabouraud (para levadura). Las suspensiones bacterianas y fúngicas ajustadas a 0,5 de turbiedad estándar de McFarland se sembraron sobre las placas para cubrir toda la superficie utilizando un hisopo estéril. A continuación, utilizando una micropipeta se tomaron 50 µL de los extractos de polen corbicular y se transfirieron a los pozos. En el caso de la miel, se utilizó en estado puro y se añadió directamente hasta llenar el pozo. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. Luego de finalizada la incubación, con la ayuda de un pie de metro se midieron las zonas de inhibición alrededor de los pozos. Todas las pruebas fueron realizadas en triplicado. Como control positivo de bacterias se utilizó levofloxacino, mientras que para la levadura se empleó

fluconazol y como control negativo se utilizó el disolvente utilizado en la preparación del extracto (Gercek et al. 2022; Campos et al. 2021).

#### **5.5.4 Concentración mínima inhibitoria**

La concentración mínima inhibitoria se determinó utilizando una técnica estándar de microdilución en caldo (Cavaliere et al. 2005). Las bacterias a evaluar fueron *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC25923, *P. aeruginosa* ATCC 9027.

En microplacas estériles de 96 pozos, se colocaron 200 µL de la disolución de miel en la primera columna (pozo 1). En los pozos de las columnas 2 a la 12, se añadieron 100 µL de caldo Mueller-Hinton. Se realizaron diluciones seriadas de los extractos en los pozos de la columna 1 a la 10, transfiriendo 100 µL de una columna a la siguiente y mezclando bien antes de pasar a la siguiente columna.

Se prepararon suspensiones bacterianas ajustadas a una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland. A cada pozo, excepto los de la primera columna (extracto puro) y la columna 11 (control negativo), se añadieron 100 µL de inóculo bacteriano. La columna 12 se utilizó como control positivo (bacterias sin extracto).

La microplaca se cubrió con papel Parafilm y se incubó a 37 °C por 24 horas. Después del periodo de incubación inicial, se añadieron 20 µL de resazurina al 1 % a todos los pozos, excepto en los de la primera columna. La microplaca se incubó durante 3 horas adicionales a 37 °C. Se evaluó el cambio de color en los pozos. La aparición de un color rojo o rosa indica actividad microbiana, lo que sugiere crecimiento bacteriano. Los pozos que no mostraron cambio de color (lectura negativa) se consideraron como aquellos donde la concentración del extracto inhibió el crecimiento bacteriano.

De cada pozo que mostró una lectura negativa y del último pozo con crecimiento bacteriano, se sembraron 20 µL en placas de agar Mueller-Hinton. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se realizó la lectura final. Un recuento de <10 UFC indica actividad bactericida del extracto (mata las bacterias), mientras que un recuento de >10 UFC sugiere actividad bacteriostática (inhibe el crecimiento sin matar completamente a las bacterias).

## 5.6 Análisis estadísticos

Se analizó estadísticamente los resultados de la capacidad inhibitoria de la miel (mm) sobre los cuatro patógenos estudiados. Debido a la ausencia de inhibición en *Candida albicans*, este microorganismo fue excluido del análisis, enfocándose únicamente en *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*. Para determinar diferencias significativas en la capacidad de inhibición de la miel de quillay sobre los patógenos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey, considerando un nivel de significancia de  $p = 0,05$  (95% de confianza), luego de una previa comprobación de supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

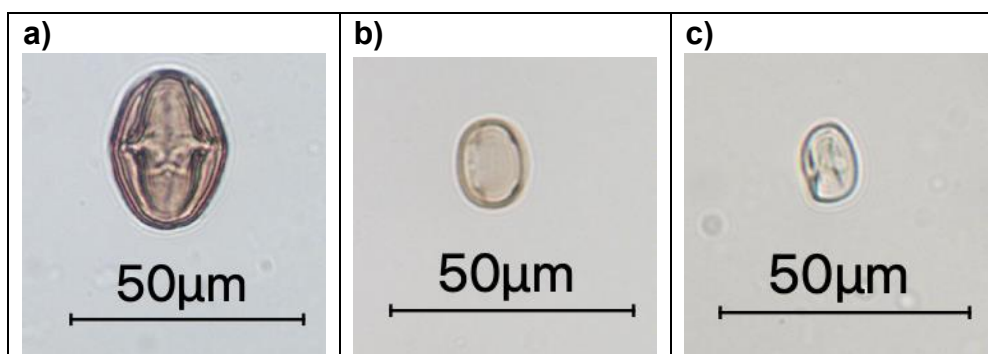
## VI. RESULTADOS

### 6.1 Determinación botánica de miel

El análisis melisopalinológico realizado a la miel producida en el predio Corderito, temporada 2024, determinó que esta corresponde a una miel monofloral de *Quillaja saponaria* (quillay), especie endémica de Chile, clasificada según la Norma Chilena Nch2981 (2005) “Miel de abejas – Denominación de origen botánico mediante ensayo melisopalinológico”, dado que los granos de polen de esta especie representaron el 46,73% del espectro polínico total, como se observa en la Tabla 1, superando la proporción del 45% establecido por la Norma para la determinación botánica de mieles monoflorales. La segunda especie más representativa fue *Galega officinalis* (galega), cuyos granos de polen alcanzaron un 14,05% del espectro polínico. Las observaciones microscópicas de los granos de polen predominantes en la muestra de miel (*Quillaja saponaria*, *Galega officinalis* y *Lotus pedunculatus*) se muestran en la Figura 4.

**Tabla 1.** Presencia polínica relativa de la miel procedente de Corderito, cosecha 2024. \*\* N: Nativa, E: Endémica e I: Introducida.

Familia	Espectro polínico	Nombre común	Estatus **	N° Granos	Porcentaje
Apiaceae	<i>Conium maculatum</i>	Cicuta	I	22	1,80%
Asteraceae	<i>Taraxacum officinale</i>	Diente de león	I	13	1,06%
Asteraceae	<i>Proustia pyrifolia</i>	Tola blanca	N/E	19	1,55%
Boraginaceae	<i>Echium vulgare</i>	Hierba azul	I	51	4,17%
Brassicaceae	-	-	-	15	1,23%
Escalloniaceae	<i>Escallonia pulverulenta</i>	Madroño	N/E	18	1,47%
Fabaceae	<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	I	64	5,23%
Fabaceae	<i>Galega officinalis</i>	Galega	I	172	14,05%
Fabaceae	<i>Lotus pedunculatus</i>	Alfalfa chilota	I	77	6,29%
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i>	Castaño	I	55	4,49%
Lamiaceae	<i>Mentha pulegium</i>	Poleo	I	22	1,80%
Myrtaceae	<i>Luma sp.</i>	-	-	72	5,88%
Quillajaceae	<i>Quillaja saponaria</i>	Quillay	N/E	572	46,73%
Rosaceae	<i>Rubus ulmifolius</i>	Zarzamora	I	24	1,96%
Vitaceae	<i>Clematicissus striata</i>	Voqui colorado	N/E	19	1,55%
-	Otros	-	-	9	0,74%
<b>Total</b>				1224	100%



**Figura 4.** Imágenes de granos de polen de la muestra de miel, cosecha 2024 de Corderito, observados con un microscopio óptico (40x). (a) *Quillaja saponaria*. (b) *Galega officinalis*. (c) *Lotus pedunculatus*.

## 6.2 Determinación botánica del polen corbicular

En la primera recolección de polen corbicular de Corderito 2024, se identificaron nueve taxones pertenecientes a ocho familias botánicas (Tabla 2). La especie dominante fue *M. sativa* (alfalfa), de la familia Fabaceae, con una proporción del 66,32% del total de la muestra. La especie secundaria fue *Schinus polygamus* (huingán), de la familia Anacardiaceae, con una proporción del 12,54%.

**Tabla 2.** Presencia polínica relativa de la primera recolección de polen corbicular procedente de Corderito 2024. PMS: código de color asociado a los cúmulos corbiculares según la tabla estandarizada de colores PMS. Peso (g): peso total de los cúmulos corbiculares correspondientes a cada grupo de color. \*\* N: Nativa, E: Endémica e I: Introducida.

Muestras primera recolección 04 de Enero 2024						
Cod. Pantone (PMS)	Familia	Espectro polínico	Nombre común	Estatus **	Peso (g)	Porcentaje
PMS 1255	Anacardiaceae	<i>Schinus polygamus</i>	Huingán	N	1,2082	12,54%
PMS 1505	Asteraceae	<i>Taraxacum officinale</i>	Diente de león	I	0,1827	1,90%
PMS 4985	Asteraceae	<i>Cynara cardunculus</i>	Cardo	I	0,0615	0,64%
PMS 5185	Boraginaceae	<i>Echium vulgare</i>	Hierba azul	I	0,0372	0,39%
PMS 107	Brassicaceae	-	-	-	0,0500	0,52%
PMS 4525	Fabaceae	<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	I	6,3890	66,32%
PMS 469	Fabaceae	<i>Galega officinalis</i>	Galega	I	0,3819	3,96%
PMS 1405	Myrtaceae	<i>Luma apiculata</i>	Arrayán	N/E	0,5213	5,41%
PMS 610	Rosaceae	<i>Rubus ulmifolius</i>	Zarzamora	I	0,8022	8,33%
<b>Total</b>					9,6339	100%

Otras especies identificadas incluyen *Rubus ulmifolius* (zarzamora; 8,33%), *Luma apiculata* (arrayán; 5,41%), y *Galega officinalis* (galega; 3,96%), que contribuyeron en menor medida al espectro polínico del polen corbicular. Los resultados también mostraron la presencia de especies como *Taraxacum officinale* (diente de león), *Cynara cardunculus* (cardo), y *Echium vulgare* (hierba azul), con porcentajes inferiores al 2%.

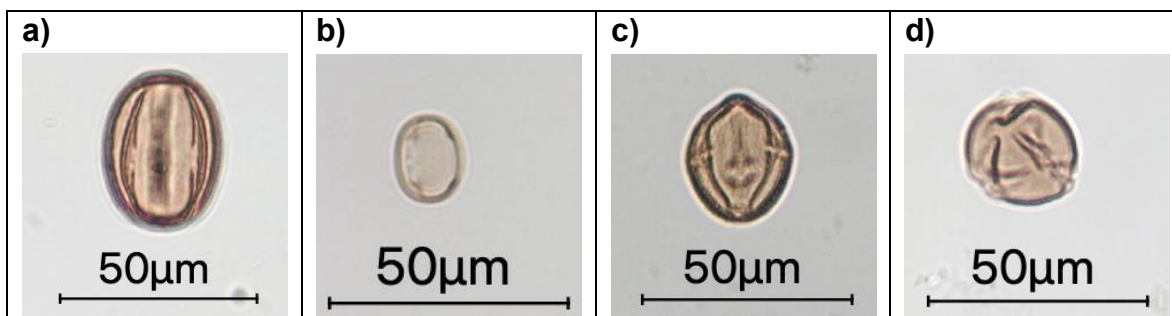
En la segunda recolección de polen corbicular de Corderito 2024, se identificaron siete taxones pertenecientes a seis familias botánicas (Tabla 3). Al igual que en la primera colecta, la especie dominante fue *Medicago sativa* (alfalfa), de la familia Fabaceae, con una proporción del 65,39% del total de la muestra. La especie secundaria fue *Galega officinalis* (galega), también de la familia Fabaceae, con una proporción del 20,21%.

**Tabla 3.** Presencia polínica relativa de la segunda recolección de polen corbicular procedente de Corderito 2024. PMS: código de color asociado a los cúmulos corbiculares según la tabla estandarizada de colores PMS. Peso (g): peso total de los cúmulos corbiculares correspondientes a cada grupo de color. \*\* N: Nativa, E: Endémica e I: Introducida.

Muestras segunda recolección 23 de Enero 2024						
Cod. Pantone (PMS)	Familia	Espectro polínico	Nombre común	Estatus	Peso (g)	Porcentaje
PMS 1255	Anacardiaceae	<i>Schinus polygamus</i>	Huingán	N	0,2088	2,23%
PMS 1505	Asteraceae	<i>Taraxacum officinale</i>	Diente de león	I	0,1172	1,25%
PMS 467	Asteraceae	-	-	-	0,0459	0,49%
PMS 4525	Fabaceae	<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	I	6,1289	65,39%
PMS 469	Fabaceae	<i>Galega officinalis</i>	Galega	I	1,8944	20,21%
PMS 197	Lamiaceae	<i>Mentha pulegium</i>	Poleo	I	0,1755	1,87%
PMS 109	Myrtaceae	<i>Luma apiculata</i>	Arrayán	N/E	0,8021	8,56%
<b>Total</b>					9,3728	100%

En la segunda recolección se identificaron especies que no estuvieron presentes en la primera colecta, como *Mentha pulegium* (poleo) de la familia Lamiaceae, y una especie no identificada de la familia Asteraceae. Por otro lado, en la primera colecta se identificaron especies que no se encontraron en la segunda colecta,

como *Cynara cardunculus* (cardo) de la familia Asteraceae, *Echium vulgare* (hierba azul) de la familia Boraginaceae, *Rubus ulmifolius* (zarzamora) de la familia Rosaceae y una especie no identificada de la familia Brassicaceae. Las observaciones microscópicas de los granos de polen predominantes de ambas cosechas en las muestras de polen corbicular se muestran en la Figura 5.



**Figura 5.** Imágenes de granos de polen de las muestras de polen corbicular observados con un microscopio óptico (40x). (a) *Medicago sativa*. (b) *Galega officinalis*. (c) *Schinus polygamus*. (d) *Rubus ulmifolius*.

### 6.3 Capacidad antimicrobiana de miel

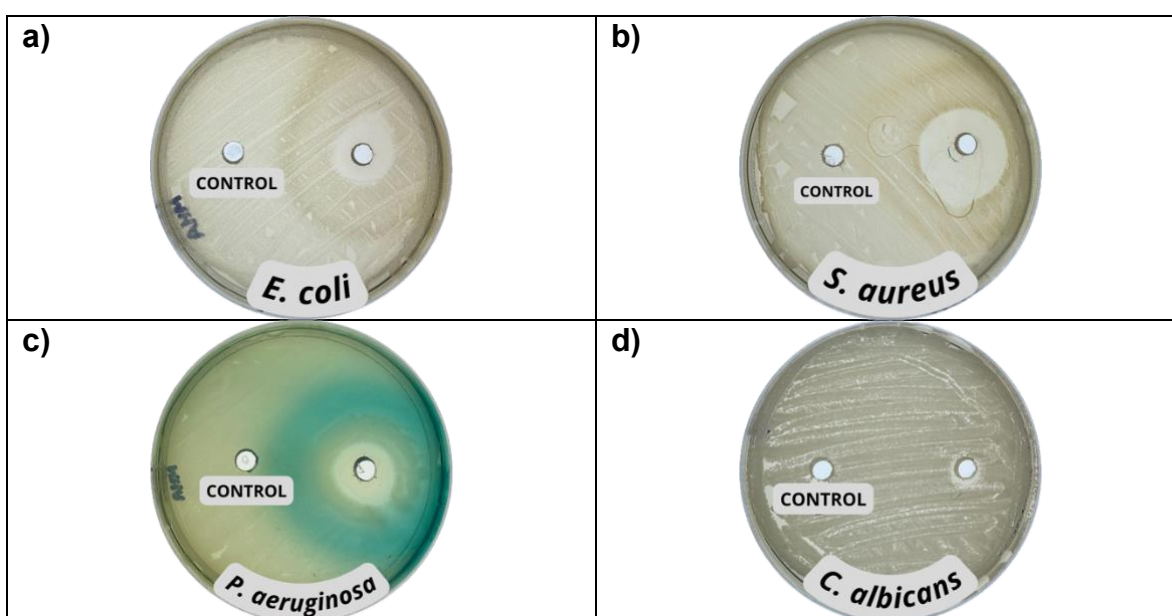
#### 6.3.1 Actividad antibacteriana

En el estudio de capacidad antimicrobiana de la miel producida en el predio Corderito, cosecha 2024, se observó actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Frente a *S. aureus* la miel presentó la mayor inhibición, con un promedio de  $29,17 \pm 1,04$  mm, presentando diferencias significativas con los otros microorganismos analizados en el presente experimento. Por otro lado, *P. aeruginosa* y *E. coli* presentaron zonas de inhibición de  $15,67 \pm 1,76$  mm y  $14,5 \pm 1,32$  mm, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas (Tabla 4).

En el caso de *C. albicans*, no se observó actividad inhibitoria bajo las condiciones evaluadas. Los halos de inhibición observados en los diferentes microorganismos analizados se muestran en la Figura 6.

**Tabla 4.** Capacidad antimicrobiana de la miel producida en Corderito, cosecha 2024, frente a diferentes microorganismos patógenos (mm de diámetro de halo de inhibición incluye el pozo de 6 mm). \*\*s.a: sin actividad.

Microorganismo	Halo de inhibición (mm)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	14,5±1,32 b
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25922)	29,17±1,04 a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	15,67±1,76 b
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	**s.a.



**Figura 6.** Halos de inhibición observados en diferentes microorganismos con la aplicación de miel pura. (a) *Escherichia coli* cultivada en agar Mueller-Hinton con halo de inhibición. (b) *Staphylococcus aureus* cultivada en agar Mueller-Hinton con halo de inhibición. (c) *Pseudomonas aeruginosa* cultivada en agar Mueller-Hinton con halo de inhibición. (d) *Candida albicans* cultivada en agar Sabouraud sin halo de inhibición.

### 6.3.2 Concentración mínima inhibitoria

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de la miel fueron los siguientes: para *S. aureus*, la CMI fue de 3,13% m/v y la CMB de 6,25% m/v; para *E. coli*, la CMI fue de 12,5% m/v y la CMB de 25% m/v; y para *P. aeruginosa*, la CMI fue de 25% m/v y la CMB de 50% m/v (Tabla 5).

**Tabla 5.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de la miel de Corderito, cosecha 2024, expresado en porcentaje (m/v).

<b>Microorganismo</b>	<b>CMI</b>	<b>CMB</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25922)	3,13	6,25
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	12,5	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	25	50

#### **6.4 Capacidad antimicrobiana de polen corbicular**

La actividad antimicrobiana del polen corbicular recolectado en el predio Corderito, cosecha 2024, fue evaluada mediante el método de pozos en agar frente a *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, donde, bajo las condiciones experimentales utilizadas, no se observaron halos de inhibición en ninguna de las réplicas para ninguno de los microorganismos evaluados, indicando la ausencia de actividad antimicrobiana. Debido a que no hubo inhibición, no se realizó la determinación de concentración mínima inhibitoria para el polen corbicular.

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1 Determinación botánica de miel

Las condiciones climáticas que presenta la comuna de Yumbel favorecen la presencia de una vegetación natural caracterizada, entre otras especies, por el espino, el boldo, el peumo y el quillay (CIREN 2024), pero también en esta comuna, en el predio Corderito, se encuentra la plantación de quillay más grande de Chile (Maragaño 2021), un bosque artificial de quillay hecho por el hombre. El quillay fue la especie más representativa, a nivel de polen, en la miel de Corderito cosechada en 2024, la cual se clasificó como una miel monofloral de *Quillaja saponaria* (quillay), con un 46,73% de representación en el espectro polínico. En total, para la mencionada cosecha de miel, se identificaron 15 especies vegetales, pertenecientes a 11 familias botánicas, en donde Quillajaceae (46,73%), Fabaceae (25,57%) y Myrtaceae (5,88%) fueron predominantes, representando un 78,18% del total de las especies determinadas. Estos resultados reflejan la contribución de las características climáticas, de la vegetación natural y de la plantación de quillay, presentes en este ecosistema del secano interior de Biobío, en la composición floral de la miel evaluada.

El Laboratorio de Palinología y Ecología Vegetal de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles, ha estado realizando estudios previos en el predio Corderito, donde para las temporadas de cosecha de 2020, 2022 y 2023, circunscritas al período de floración del quillay, se obtuvo miel monofloral de quillay (García 2024). En la temporada 2024, también se produjo miel monofloral de esta especie, lo que evidencia la preferencia de la abeja melífera por el quillay. Esta preferencia podría deberse principalmente a la abundante disponibilidad de néctar que posee la flor del quillay (Montenegro et al 2010).

Estudios en la miel monofloral de esta especie indican la presencia de propiedades beneficiosas para la salud de los humanos, tales como actividad antimicrobiana, antioxidante y propiedades antiinflamatorias, gracias a la presencia de compuestos como fenoles, flavonoides y peróxido de hidrógeno (Poulsen-Silva et al. 2023; Núñez-Pizarro et al. 2024)

Por otra parte, la segunda especie vegetal más representativa del análisis melisopalínológico fue *G. officinalis* (galega), cuyos granos de polen alcanzaron un 14,05% de representación en el espectro polínico. Según estudios previos en el predio Corderito, realizados por el mismo laboratorio, se identificó *G. officinalis* como polen secundario en las temporadas 2020, 2022 y 2023, asociado posiblemente, a la larga floración de la especie y su adaptabilidad a las condiciones ambientales, siendo utilizada por las abejas en la medida de su disponibilidad (Montenegro et al. 2010).

Los resultados indican que el predio Corderito ofrece un entorno ideal para la producción direccionada de miel monofloral de quillay, debido a la abundancia de esta especie en la zona, producto de las 125 ha de plantación de la especie. Esto contribuye a la generación de un producto único, reconocido por sus beneficios para la salud. En Chile, la producción de miel monofloral de quillay se concentra principalmente en la zona central del país, de clima mediterráneo, que abarca desde la región de Coquimbo hasta la región del Biobío (Montenegro 2022).

## **7.2 Determinación botánica del polen corbicular**

En el presente estudio el polen corbicular, recolectado durante el período de floración del quillay, fue caracterizado como monofloral no nativo de *Medicago sativa* (Alfalfa) según la Norma Chilena Oficial Nch3255 (2011) “Calidad de la colmena para polinización y diferenciación del polen según origen botánico”. Durante la primera y segunda cosecha de polen corbicular en el predio Corderito, en enero de 2024, *M. sativa* fue la especie con mayor predominancia, lo cual coincide con su periodo de floración para la región del Biobío, el cual inicia en septiembre, de manera paulatina, y se mantiene de manera continuada hasta febrero o marzo (SAG 2007).

Nuestros resultados muestran que la composición botánica del polen corbicular y de la miel, recolectados en Corderito 2024 durante el período de floración del quillay, son distintas, hallazgo que es consistente con el hecho documentado de que las plantas utilizadas por *A. mellifera* para la recolección de néctar difieren de aquellas seleccionadas para la colecta de polen corbicular. (McMinn-Sauder et al., 2022). Es

decir, aunque las abejas recolecten néctar y polen en el mismo periodo, pueden preferir diferentes especies para cada tarea. Además, se ha documentado previamente la presencia de polen corbicular de quillay (Montenegro 2013), lo que sugiere que esta especie también es recolectada por las abejas para la formación de su polen corbicular, lo que reafirma que las actividades de recolección de néctar y polen son distintas.

García (2024), realizó una determinación botánica de polen corbicular recolectado en el mismo predio Corderito, para la temporada 2023 durante la floración de quillay; en dicho estudio se reportó una predominancia de polen de *G. officinalis*, evidenciando, en comparación con el presente estudio, un cambio en la composición dominante del polen corbicular entre ambas temporadas. Aun así, la familia botánica dominante sigue siendo Fabaceae, ya que *M. sativa* y *G. officinalis* pertenecen a este grupo taxonómico. Los cambios en la dieta de la abeja melífera observados pueden atribuirse a los cambios en las condiciones climáticas, cambios en la composición botánica del área circundante a las colmenas (traslape del calendario floral), nutrición y/o estado sanitario previo de las colmenas (Tsuruda et al. 2021).

Diversos factores influyen en las preferencias de las abejas hacia ciertas especies vegetales. Gosh et al. (2020) indican que el contenido nutricional de proteínas es el principal criterio para la preferencia de alimentación de polen por parte de las abejas, pero si las fuentes florales con alto contenido proteico son limitadas o menos accesibles, las abejas se ven obligadas a recolectar polen de fuentes menos nutritivas que estén más disponible en su entorno. Por su parte, Nicholls y Hempel de Ibarra (2017) señalan que no hay evidencia de la capacidad de las abejas para discriminar entre el polen de las flores basándose únicamente en el contenido de proteína cruda, y que existen otros macronutrientes, como los lípidos, que son igual o más importantes en este aspecto. Se ha observado también que las abejas pueden evitar ciertos tipos de polen si éstos contienen toxinas o compuestos que les resulten desagradables, lo que implica que no solo buscan nutrientes, sino que también evitan componentes potencialmente dañinos (Sculfort et al. 2021). Sin

embargo, también se ha demostrado que las preferencias por polen no solo se ven afectadas por la calidad y disponibilidad de este, sino también por la experiencia previa de búsqueda de alimento, tal como observaron Cook et al. (2003), donde las abejas preferían especies de polen que contenían una mayor concentración de aminoácidos esenciales, pero sólo cuando tenían experiencia previa de búsqueda de este tipo de polen.

En la presente investigación, se determinó que el polen corbicular cosechado es monofloral de *M. sativa*, el cual en otros estudios se ha caracterizado por un alto contenido de proteína cruda, cenizas y niveles significativos de minerales como Ca, Na, K, Mg, P, Mn y Zn (Taha 2015). Además, contiene aminoácidos esenciales, incluyendo histidina, lisina, leucina, fenilalanina, treonina y valina, en concentraciones suficientes para satisfacer los requerimientos mínimos de las abejas (Taha et al., 2019). Estas propiedades nutricionales del polen de alfalfa podrían explicar la preferencia observada, posiblemente influenciada también por la experiencia previa de las abejas en la recolección de este recurso floral.

La importancia de la composición botánica del polen corbicular, ya sea monofloral o multifloral, es que puede influir en la salud y el comportamiento de las abejas. El polen monofloral, al tener menor diversidad específica, podría asociarse con efectos negativos, como una menor supervivencia por un menor consumo de polen diverso (Muturi et al. 2022). Sin embargo, Alaux et al. (2010) encontraron que la diversidad polínica no afectó la supervivencia de abejas sanas. Sin embargo, en presencia de parásitos, las abejas alimentadas con polen polifloral tuvieron mayor supervivencia que aquellas alimentadas con polen monofloral, excepto cuando este último era rico en proteínas. Por tanto, la preferencia por polen monofloral no compromete necesariamente la salud de las abejas, especialmente si su valor nutricional es adecuado, como en el caso del polen estudiado.

### **7.3 Capacidad antimicrobiana de la miel**

En el presente estudio se analizó la capacidad antimicrobiana de la miel de quillay (100% m/v), cosechada en el predio Corderito, en la temporada 2024, frente a cuatro patógenos humanos. Esta capacidad antimicrobiana de la miel de quillay ya ha sido

demostrada en estudios previos; sin embargo, estas investigaciones han sido limitadas en número de publicaciones y no existe un análisis enfocado en miel monofloral de la especie proveniente de un predio con una plantación artificial de quillay, como lo que ocurre con el predio Corderito.

Montenegro et al. (2009) evaluaron la capacidad antimicrobiana de dos muestras de mieles monoflorales de quillay provenientes de Río Clarillo (región Metropolitana) y de la cordillera de la costa de Curicó (región del Maule), a partir de extractos fenólicos de miel. Los extractos de ambas localidades inhibieron el crecimiento *in vitro* de *P. aeruginosa* (CMI=1,26 y 1,35 mg mL<sup>-1</sup>; diluciones 50%) y *S. aureus* (CMI=0,32 y 0,68 mg mL<sup>-1</sup>; diluciones 12,5 y 25 %), pero no tuvieron efecto sobre *E. coli* y la levadura *C. albicans*. Si bien en la presente investigación no se emplearon extractos de miel, sino miel pura, los resultados son similares a los de Montenegro et al. (2009), ya que en ambos casos se observó que *S. aureus* pudo ser inhibido con una menor concentración que *P. aeruginosa*; así mismo, en ninguno de los casos se observó una inhibición de *C. albicans*. Sin embargo, a diferencias del estudio de Montenegro et al. (2009), en el presente estudio sí se observó una inhibición de *E. coli*.

Por otra parte, Montenegro et al. (2023) reportó que la miel monofloral de quillay presenta actividad antimicrobiana variable según el patógeno evaluado. En el presente estudio, la actividad antibacteriana de la miel del predio Corderito mostró un comportamiento similar, con un mayor efecto sobre *S. aureus* (29,17±1,04 mm), un resultado comparable con el rango reportado por Montenegro (2023) (12-29 mm). Esto sugiere que la miel de quillay puede ser altamente efectiva contra *S. aureus*. Para *E. coli*, el presente estudio mostró un halo de inhibición de 14,5±1,32 mm, dentro del rango de 10-19 mm informado por Montenegro (2023). En *P. aeruginosa*, la inhibición observada en este estudio (15,67±1,76 mm) fue superior al valor mínimo reportado por Montenegro (2023) (9 mm) y se encuentra dentro del rango máximo (20 mm). Estos resultados reafirman que la actividad antimicrobiana de la miel monofloral de quillay es variable según la especie microbiana evaluada y que

su efectividad puede estar influenciada por la composición química y el origen geográfico de la miel.

La actividad antimicrobiana observada de la miel proveniente del predio Corderito, de la cosecha 2024, frente a los microorganismos patógenos estudiados, puede atribuirse a su contenido de compuestos fenólicos. Según Nuñez-Pizarro et al. (2024) existe una correlación significativa entre el porcentaje de polen de quillay en mieles y su contenido fenólico total, lo que sugiere que los metabolitos secundarios derivados del quillay podrían contribuir a las propiedades antimicrobianas observadas en la miel analizada. El quillay es reconocido por su abundante composición de saponinas y polifenoles, conocidos por su capacidad para alterar la membrana celular de los microorganismos y generar estrés oxidativo, lo que podría explicar la susceptibilidad de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* a la miel (Copaja et al. 2003; Sewlikar and D'Souza 2017; Fleck et al. 2019).

La actividad antimicrobiana de la miel no solo está asociada con su contenido de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), como se ha demostrado en estudios previos, sino que también depende de otros factores presentes en la miel, como su baja actividad de agua, acidez, osmolaridad y compuestos fenólicos. Estos componentes, en conjunto, contribuyen a su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos (Osés et al., 2024).

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la miel de Corderito 2024 presentó una actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* de  $29,17 \pm 1,04$  mm, notablemente superior al promedio reportado por Carrasco (2023) para la miel monofloral de quillay procedente de la región del Biobío ( $7,3 \pm 0,6$  mm). En ambas investigaciones se empleó miel en estado puro, por lo que las diferencias observadas podrían deberse a la composición botánica de ambas mieles, ya que si bien ambas son monoflorales de quillay, las especies secundarias de estas mieles son distintas y se encuentran en distintas proporciones. En cuanto a *E. coli* y *P. aeruginosa*, la actividad observada en este estudio ( $14,5 \pm 1,32$  mm y  $15,67 \pm 1,76$  mm, respectivamente) también supera los valores reportados por Carrasco ( $1,3 \pm 0,6$  mm en *P. aeruginosa* y  $10,0 \pm 1,0$  mm en *E. coli*) (2023).

En cuanto a la CMI y CMB frente a *S. aureus*, los valores obtenidos en este estudio (3,13% m/v y 6,25% m/v, respectivamente) fueron mayores que los reportados por Carrasco (2,19% m/v y 4,38% m/v). Por otro lado, los resultados obtenidos para *E. coli* mostraron una CMI de 12,5% m/v y una CMB de 25% m/v, valores que fueron mayores que los reportados por Carrasco (8,75% m/v tanto para la CMI como para la CMB) (2023), quien utilizó una concentración inicial de 70% m/v en comparación con el 100% m/v empleado en este estudio. Esta diferencia metodológica podría influir en la determinación de la CMI, ya que una concentración inicial más alta podría resultar en una distribución diferente de los compuestos activos en las diluciones sucesivas, afectando la actividad antimicrobiana detectada (CLSI 2018).

#### **7.4 Capacidad antimicrobiana de polen corbicular**

El polen corbicular analizado estaba compuesto predominantemente por polen de *M. sativa* (alfalfa) presente en ambas fechas de colecta, con un 66,32% y 65,39%, respectivamente. Estos resultados sugieren que los compuestos bioactivos presentes en el polen de esta especie, como los compuestos fenólicos, de acuerdo con la literatura, podrían presentar actividad antimicrobiana (El-Desoukey 2015; Abouzeid et al. 2023). Sin embargo, actualmente no se dispone de estudios específicos que evalúen la actividad antimicrobiana del polen de *M. sativa*.

No obstante, se ha investigado la presencia de compuestos con propiedades antimicrobianas en otras partes de la planta. Un estudio de Ghani and Rehman (2021) indica que la alfalfa posee actividad antibacteriana derivada de extractos de solventes de las hojas, raíces, y tallo, contra los patógenos clínicos de origen humano *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. Además, la actividad antibacteriana del extracto de *M. sativa* aumentó con el incremento de la concentración de los extractos crudos y la polaridad de los solventes utilizados para la extracción. Asimismo, Abouzeid et al. (2023) también analizaron los exudados de plántulas de alfalfa, encontrando compuestos como la canavanina y el hiperósido, que mostraron actividad antibacteriana y antibiofilm contra *E. coli*.

Aunque los compuestos mencionados están presentes en la planta, no hay evidencia directa que confirme su presencia o actividad antimicrobiana en el polen

corbicular de *M. sativa*. Además, la composición química del polen puede diferir de otras partes de la planta.

Por otro lado, sí se han estudiado los perfiles fenólicos del polen corbicular de otras especies de la familia Fabaceae (Rocchetti et al. 2018), lo que sugiere que el polen corbicular de *M. sativa* podría contener compuestos fenólicos. En promedio, los autores reportaron una alta concentración de compuestos fenólicos (10,2 mg GAE g<sup>-1</sup>), donde el contenido más alto se registró en una especie del género *Gleditsia spp.* (15,4 mg g<sup>-1</sup>) y el más bajo en una especie del género *Trifolium spp.* (5 mg g<sup>-1</sup>). Los compuestos fenólicos más comunes en estas fabáceas estudiadas fueron ácidos fenólicos, tirasinas y antocianinas. Los autores sugieren que el origen botánico podría tener una influencia en la distribución fenólica del polen de abeja.

Considerando estos antecedentes, los resultados del presente estudio, respecto de la capacidad antimicrobiana de polen corbicular, no coinciden con la tercera hipótesis puesta en juego, de que el polen corbicular analizado, compuesto principalmente por polen de *M. sativa*, presentará actividad antimicrobiana contra los patógenos evaluados.

Esta discrepancia podría explicarse por la influencia de factores relacionados con el almacenamiento, los cuales afectan la estabilidad de los compuestos bioactivos presentes en el polen corbicular y, por ende, su capacidad antimicrobiana. Estos factores corresponden a la composición del polen, temperatura de almacenamiento, tiempo de almacenamiento, contenido de humedad, presencia de luz, técnica de secado, y tiempo desde recolección hasta almacenamiento (Dias et al. 2016).

De acuerdo con Cortés et al. (2015), la recolección de polen corbicular debe realizarse en forma diaria para prevenir su descomposición y garantizar la frescura del producto apícola. Posterior a la recolección debe someterse a un proceso de desecación utilizando aire caliente a 40 °C, reduciendo su contenido de humedad del 12% al 8%, para así evitar procesos de fermentación. En el presente estudio los periodos de recolección del polen corbicular fueron a 21 días de iniciada la floración del quillay y a 20 días después de la primera cosecha de polen. Este periodo prolongado puede haber ocasionado que el polen corbicular perdiera sus

componentes bioactivos que permiten que este producto de la colmena tenga actividad antimicrobiana.

Estudios previos como el de Friedle et al. (2021) han demostrado que la composición del polen y, principalmente, el alto contenido de humedad en el almacenamiento, favorecen el desarrollo de microorganismos, lo que disminuye sus propiedades bioactivas incluida la actividad antimicrobiana.

Diversos estudios han destacado que el tiempo de almacenamiento es un factor determinante en la preservación de las propiedades bioactivas del polen apícola. Rzepecka-Stojko et al. (2012) observaron que el almacenamiento prolongado disminuye significativamente el contenido de polifenoles, especialmente en condiciones de temperatura ambiente y exposición a la luz, siendo el almacenamiento en frío y oscuridad una alternativa para minimizar estas pérdidas. De manera complementaria, Fernández et al. (2020) reportaron que los compuestos volátiles del polen disminuyen considerablemente tras nueve meses de almacenamiento a temperatura ambiente, lo que sugiere una progresiva degradación de sus componentes bioactivos. Por su parte, Campos et al. (2021) resaltaron cómo la humedad alta durante el almacenamiento favorece la proliferación de microorganismos, lo que podría comprometer aún más la calidad del polen. En conjunto, estos hallazgos subrayan que las condiciones de almacenamiento no solo afectan la estabilidad de los compuestos bioactivos, sino que también pueden influir en su funcionalidad, reforzando la necesidad de implementar prácticas de conservación adecuadas para preservar la calidad del polen apícola durante períodos prolongados.

Por lo tanto, aunque las condiciones de almacenamiento empleadas en el presente ensayo favorecían la conservación del polen corbicular, factores como la presencia de humedad y el periodo transcurrido entre la recolección y el almacenamiento del polen podrían haber contribuido a la degradación de compuestos bioactivos, lo que explicaría la ausencia de actividad antimicrobiana en nuestra experimentación.

## VIII. CONCLUSIONES

La miel cosechada en el predio Corderito, en 2024, es monofloral de quillay (*Quillaja saponaria* Molina), clasificada según la Norma Chilena Oficial Nch2981 (2005).

El polen corbicular recolectado en el predio Corderito, en 2024, durante la floración de quillay, fue clasificado como monofloral no nativo de Alfalfa (*Medicago sativa* L.) según la Norma Chilena Oficial Nch3255 (2011).

La miel cosechada en el predio Corderito, en 2024, presentó actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y no mostró actividad frente a *Candida albicans*.

El polen corbicular recolectado en el predio Corderito, en 2024, no mostró actividad antimicrobiana bajo las condiciones experimentales utilizadas.

Se aceptan las hipótesis 1 y 2 establecidas para la presente investigación, dado que la miel resultó ser monofloral de quillay y ésta presentó actividad antimicrobiana.

Se rechaza la hipótesis 3 del presente estudio, debido a que el polen corbicular no presentó actividad antimicrobiana.

Finalmente, como consideración final, de acuerdo con estos resultados y a la experiencia adquirida, se sugiere que para futuros estudios de polen corbicular, éste no sea almacenado por un periodo extenso de tiempo, ya que esto podría afectar negativamente sus propiedades bioactivas.

## IX. REFERENCIAS

- Abou-Shaara H (2014) The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: a review. *Veterinarni medicina* 59:1-10. <https://doi.org/10.17221/7240-vetmed>
- Abouzeid S, Beutling U, Elekhawy E, Selmar D (2023) Antibacterial and Antibiofilm Effects of Allelopathic Compounds Identified in *Medicago Sativa* L. Seedling Exudate against *Escherichia Coli*. *Molecules* 28:2645. <https://doi.org/10.3390/molecules28062645>
- Aguilera T (2013) Colmena para polinización y traslado. Tesis Pregrado, Universidad de Chile. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/112767>
- Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* 6:562–565. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Aloisi, P, Ruppel S (2014) Propiedades bioactivas y nutricionales del polen apícola de la provincia del Chubut, Argentina. *Revista de investigaciones agropecuarias* 40: 296-302
- Alqarni A, Owayss A, Mahmoud A, Hannan M (2014) Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society* 18:618–625. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.11.009>
- Alvarez-Suarez JM (2017) Bee products-chemical and biological properties. Springer, Cham, Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1>
- Ares AM, Valverde S, Bernal JL, Nozal MJ, Bernal J (2018). Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 147: 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.009>
- Astolfi ML, Conti M, Marconi E, Massimi L, Canepari S (2020) Effectiveness of Different Sample Treatments for the Elemental Characterization of Bees and Beehive Products. *Molecules* 25:4263–4263. <https://doi.org/10.3390/molecules25184263>
- Bang L, Buntting C, Molan P (2003) The Effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxide Production in Honey and Its Implications for Wound Healing. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 9:267–273. <https://doi.org/10.1089/10755530360623383>
- Barrantes K, Chacón L, Arias M (2022) El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. *Población y Salud en Mesoamérica* 19. <https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.47590>
- Benedetti S, Delard C, Roach F, González M (2000) Monografía de Quillay, Quillaja saponaria, 1 ED. FIA-INDAP-INFOR

- Berenbaum M, Calla B (2021) Honey as a functional food for *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology* 66:185-208. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-040320-074933>
- Beug H-J (2004) *Leitfaden der Pollenbestimmung für Mitteleuropa und angrenzende Gebiete*, 1 ed. Verlag Dr. Friedrich Pfeil
- Bianchi M, D'Antoni H (1986) Depositación del polen actual en los alrededores de Sierra de la Padres (Prov. Buenos Aires). IV Congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía. Apéndice de las Actas: 16-27. Mendoza.
- Bildir B, Nur Çobanoğlu D, Kaya B (2023) Antioxidant, antimicrobial, and neurotoxicity (in Sh-Sy5y Cell Lines) properties of Mg nanoparticle system (BP@ MgNPs) prepared by green synthesis with bee pollen. *Chemistry & Biodiversity* 20(6):e202201093. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202201093>
- Bogdanov S (2016) *Pollen, Nutrition, Functional Properties, Health/The Pollen Book*.
- Bridi R, Atala E, Núñez P, Montenegro G (2019) Honeybee Pollen Load: Phenolic Composition and Antimicrobial Activity and Antioxidant Capacity. *Journal of Natural Products* 82:559–565. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00945>
- Bridi R, Nuñez-Quijada G, Aguilar P, Martínez P, Lissi E, Giordano A, Montenegro G (2017) Differences between phenolic content and antioxidant capacity of quillay Chilean honeys and their separated phenolic extracts. *Ciencia e investigación agraria* 44:251–250. <https://doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1756>
- Brudzynski K, Abubaker K, Miotto D (2012) Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chemistry* 133:329–336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.035>
- Cabrera C, Montenegro G (2013) Pathogen control using a natural Chilean bee pollen extract of known botanical origin. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 40:223-230.
- Campos M, Anjos O, Chica M, Campoy P, Nozkova J, Almaraz-Abarca N, Barreto L, Nordi JC, Estevinho L, Pascoal A, Paula V, Chopina A, Dias LG, Tešić Ž, Mosić M, Kostić A, Pešić M, Milojković-Opsenica D, Sickel W, Ankenbrand M (2021) Standard methods for pollen research. *Journal of Apicultural Research* 60:1–109. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1948240>
- Campos MG, Frigerio C, Bobiş O, Urcan AC, Gomes NGM (2021) Infrared Irradiation Drying Impact on Bee Pollen: Case Study on the Phenolic Composition of *Eucalyptus Globulus* Labill and *Salix Atrocinerea* Brot. *Pollens. Processes* 9:890. <https://doi.org/10.3390/pr9050890>
- Carrasco D (2023) Estudio de la capacidad antibacteriana y propiedades fisicoquímicas en mieles monoflorales chilenas. Tesis pregrado, Universidad de Concepción

- Cavaliere S, Harbeck R, Mccarter Y, Ortez J, Rankin I, Sautter R, Sharp S, Spiegel C (2005) Manual of antimicrobial susceptibility testing. In M. B. Coyle (Ed.), American Society for Microbiology (pp. 1–236)
- Cabrero G, Sanhueza O, Pezoa M, Báez M, Martínez J, Báez M, Fuentes E (2020) Relationship among the minor constituents, antibacterial activity and geographical origin of honey: a multifactor perspective. *Food Chemistry* 315:126296-126296. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126296>
- Chester S (2016) Flora y fauna de Chile. Guía de identificación. Lynx Ediciones
- CIREN (2024) Recursos naturales comuna de Yumbel. Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN)
- CLSI (2018) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee For Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania
- Cook S, Awmack C, Murray D, Williams I (2003) Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology* 28:622–627. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2003.00548.x>
- Copaja SV, Blackburn C, Carmona R (2003) Variation of saponin contents in *Quillaja saponica* Molina. *Wood Science and Technology* 37:103–108. <https://doi.org/10.1007/s00226-002-0150-8>
- Cortés M, Boza S, Dinamarca P, Espinoza M (2015) Informe Final Estudio Estratégico de la Cadena Apícola de Chile. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA)
- Crane E (2004) A short history of knowledge about honey bees (*Apis*) up to 1800. *Bee World* 85:6–11. <https://doi.org/10.1080/0005772x.2004.11099604>
- Crane E. 1999. The world history of beekeeping and honey hunting. Routledge.
- Cuevas M (2021) Capítulo 1. Sobrevuelo por la historia del Chile apícola, Apicultura en el Territorio Patagonia Verde, Región de Los Lagos, INIA
- Denisow B, Denisow-Pietrzyk M (2016) Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96:4303–4309. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>
- Dias L, Tolentino G, Pascoal A, Estevinho L (2016) Effect of processing conditions on the bioactive compounds and biological properties of bee pollen. *Journal of Apicultural Research* 55:357–365. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1248109>
- El-Desoukey R (2015) Phytochemical and antimicrobial activity of *Medicago sativa* (alfalfa) as source of animal food against some animal pathogens. *Global Veterinaria* 14:136–141. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2015.14.01.92109>
- Erdtman G (1960) The acetolysis method—a revised description. *Journal of food science* 54:516–564

- Escuredo O, Míguez M, Fernández-González M, Carmen Seijo M (2013) Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry* 138:851–856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.015>
- Feknous N, Boumendjel M (2022) Natural bioactive compounds of honey and their antimicrobial activity. *Czech Journal of Food Sciences* 40:163–178. <https://doi.org/10.17221/247/2021-cjfs>
- Fernández LA, Rodríguez MA, Sánchez RM, Pérez M, Gallez LM (2020) Long-term Microbiological and Chemical Changes in Bee Pollen for Human consumption: Influence of Time and Storage Conditions. *Journal of Apicultural Research* 60:319–325. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1728867>
- Fleck J, Betti A, da Silva F, Troian E, Olivaro C, Ferreira F, Verza S (2019) Saponins from *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis*: Particular Chemical Characteristics and Biological Activities. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24010171>
- Friedle C, D'Alvise P, Schweikert K, Wallner K, Hasselmann M (2021) Changes of microorganism composition in fresh and stored bee pollen from Southern Germany. *Environmental Science and Pollution Research* 28:47251–47261. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13932-4>
- García G (2024) Análisis comparativo entre carga polínica corbicular y melisopalínología en apiarios del secano interior y precordillera andina de la provincia del Biobío, Chile. Tesis pregrado, Universidad de Concepción
- Gercek Y, Celik S, Bayram S (2022) Screening of Plant Pollen Sources, Polyphenolic Compounds, Fatty Acids and Antioxidant/Antimicrobial Activity from Bee Pollen. *Molecules* 27:117. <https://doi.org/10.3390/molecules27010117>
- Geslin B, Gauzens B, Baude M, Dajoz I, Fontaine C, Henry M, Ropars L, Rollin O, Thébault E, Vereecken NJ (2017) Massively Introduced Managed Species and Their Consequences for Plant–Pollinator Interactions. *Networks of Invasion: Empirical Evidence and Case Studies* 57:147–199. <https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2016.10.007>
- Ghani A, Rehman A (2021) Determination of Antibacterial Properties of *Medicago sativa* L. (Alfalfa) Extracts. *Scientific Research Journal* 9:27–42. <https://doi.org/10.31364/SCIRJ/v9.i03.2021.P0321848>
- Ghosh S, Jeon H, Jung C (2020) Foraging Behaviour and Preference of Pollen Sources by Honey Bee (*Apis mellifera*) Relative to Protein Contents. *Journal of Ecology and Environment* 44. <https://doi.org/10.1186/s41610-020-0149-9>
- Ghosh S, Jung C (2017) Nutritional value of bee-collected pollens of hardy kiwi, *Actinidia arguta* (Actinidiaceae) and oak, *Quercus* sp. (Fagaceae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20:245–251. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.01.009>

- Heusser C (1971) *Pollen and Spores of Chile*. University of Arizona Press
- INDAP (2021) La pandemia aumentó el consumo de miel entre los chilenos: 700 gramos per cápita al año. INDAP, Chile.
- INN (Instituto Nacional De Normalización) (2005) Norma Chilena Oficial. Miel de abejas-Denominación de origen botánico mediante ensayo melisopalínológico. NCh2981-2005. Instituto Nacional de Normalización, Santiago, Chile.
- INN (Instituto Nacional De Normalización) (2011) Norma Chilena Oficial. Polen apícola - Calidad de la colmena para polinización y diferenciación del polen según origen botánico. NCh3255-2011. Instituto Nacional de Normalización, Santiago, Chile.
- Iturra C (2023) Temporada apícola 2022-23. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA).
- Jean-Prost P, Médori P, Le Conte Y (2007) *Apicultura: Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena*, 4ª edición. Ediciones Mundi-Prensa.
- Kacániová M, Vukovic N, Chlebo R, Hascík P, Rovná K, Cubon J, Dzugan M, Pasternakiewicz A (2012) The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Archives of Biological Sciences* 64:927–934. <https://doi.org/10.2298/abs1203927k>
- Kostić AŽ, Pešić MB, Trbović D, Petronijević R, Dramićanin AM, Milojković-Opsenica DM, Tešić Ž (2017) The fatty acid profile of Serbian bee-collected pollen – a chemotaxonomic and nutritional approach. *Journal of apicultural research* 56:533–542. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1356206>
- Kroyer G, Hegedus N (2001) Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2:171–174. [https://doi.org/10.1016/s1466-8564\(01\)00039-x](https://doi.org/10.1016/s1466-8564(01)00039-x)
- Larsson D, Flach C-F (2021) Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology* 20:257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Lobos I, Silva M (2020) Caracterización botánica de las mieles producidas en el Territorio Patagonia Verde. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS - Informativo N° 237
- Maragaño C (2021) Yumbel: reforestación de Quillay potencia producción mielífera de Biobío. In: La Tribuna. <https://www.latribuna.cl/desarrollo/2021/01/04/yumbel-reforestacion-de-quillay-potencia-produccion-mielifera-de-biobio.html>. Accessed 4 Dec 2024
- Matsuzawa T, Kohsaka R (2021) Status and Trends of Urban Beekeeping Regulations: A Global Review. *Earth* 2:933–942. <https://doi.org/10.3390/earth2040054>

- Matuschek E, Brown D, Kahlmeter G (2014) Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 20:O255–O266. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>
- McMinn-Sauder H, Lin C-H, Eaton T, Johnson R (2022) A Comparison of Springtime Pollen and Nectar Foraging in Honey Bees Kept in Urban and Agricultural Environments. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.825137>
- Moniruzzaman M, Khalil MI, Sulaiman SA, Gan SH (2013) Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-43>
- Montenegro G (2000) Chile nuestra flora útil: Guía de Plantas Apícola en Medicina Folclórica Artesanal y Ornamental. Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Montenegro G (2022) “Un país, un producto prioritario”: La miel chilena. FAO-UC Informe Producto 1.
- Montenegro G (2023) Mieles chilenas para el mundo - Atributos, propiedades e innovación. Santiago, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc7995es>
- Montenegro G, Gómez M, Díaz-Forestier J, Pizarro R (2008) Aplicación de la Norma Chilena Oficial de denominación de origen botánico de la miel para la caracterización de la producción apícola. *Ciencia e investigación agraria* 35:181–190. <https://doi.org/10.4067/s0718-16202008000200007>
- Montenegro G, Mejías E (2013) Biological applications of honeys produced by *Apis mellifera*. *Biological Research* 46:341–345. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602013000400005>
- Montenegro G, Pizarro R, Mejías E, Rodríguez S (2013) Evaluación biológica de polen apícola de plantas nativas de Chile. *Phyton (Buenos Aires)* 82:7–14
- Montenegro G, Rodríguez S, Vío S, Gómez M, Mujica AM, Ortega X (2010) Investigación científica y tecnológica en Productos Apícolas. Gráfica LOM
- Montenegro G, Salas F, Peña R, Pizarro R (2009) Antibacterial and antifungic activity of the unifloral honeys of *Quillaja saponaria*, an endemic Chilean species. *Phyton* 78:141–146. <https://doi.org/10.32604/phyton.2009.78.141>
- Muturi M, Bargul JL, Lattorff MG (2022) Influence of the Type of Pollen Diet on the Survival, Body Weight, and Immune Response in the African Honeybee. *Journal of Apicultural Science* 66:29–43. <https://doi.org/10.2478/jas-2022-0003>
- Nader RA, Mackieh R, Wehbe R, El Obeid D, Sabatier JM, Fajloun Z (2021) Beehive Products as Antibacterial Agents: A Review. *Antibiotics* 10:717. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060717>

- Nicholls E, Hempel de Ibarra N (2016) Assessment of pollen rewards by foraging bees. *Functional Ecology* 31:76–87. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12778>
- Nolan VC, Harrison J, Cox JAG (2019) Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey. *Antibiotics* 8:251. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040251>
- Núñez-Pizarro P, Montenegro G, Núñez G, Andia ME, Espinosa-Bustos C, de Camargo AC, Oyarzún JE, Bridi R (2024) Comparative Study of Phenolic Content and Antioxidant and Hepatoprotective Activities of Unifloral Quillay Tree (*Quillaja saponaria* Molina) and Multifloral Honeys from Chile. *Plants* 13:3187–3187. <https://doi.org/10.3390/plants13223187>
- Omar W, Yahaya N, Ghaffar Z, Fadzilah N (2018) GC-MS Analysis of Chemical Constituents in Ethanolic Bee Pollen Extracts from Three Species of Malaysian Stingless Bee. *Journal of Apicultural Science* 62:275–284. <https://doi.org/10.2478/jas-2018-0022>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2016) Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos.
- Osés SM, Rodríguez C, Valencia O, Fernández-Muiño MA, Sancho MT (2024) Relationships among Hydrogen Peroxide Concentration, Catalase, Glucose Oxidase, and Antimicrobial Activities of Honeys. *Foods* 13:1344. <https://doi.org/10.3390/foods13091344>
- Papa G, Maier R, Durazzo A, Lucarini M, Karabagias IK, Plutino M, Bianchetto E, Aromolo R, Pignatti G, Ambrogio A, Pellecchia M, Negri I (2022) The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. *Biology* 11:233. <https://doi.org/10.3390/biology11020233>
- Poulsen-Silva E, Gordillo-Fuenzalida F, Velásquez P, Llancahuen F, Carvajal R, Cabaña-Brunod M, Otero MC (2023) Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Properties of Monofloral Honeys from Chile. *Antioxidants* 12:1785. <https://doi.org/10.3390/antiox12091785>
- Ramos-Cuellar A, De La Mora A, Morfin N, Tapia-González JM, Macías-Macías JO, Petukhova T, Correa-Benítez A, Guzman-Novoa E (2023) Efectos altitudinales en la africanización de las colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en Jalisco, México. *Ecosistemas y recursos agropecuarios* 10. <https://doi.org/10.19136/era.a10n3.3457>
- Rocchetti G, Castiglioni S, Maldarizzi G, Carloni P, Lucini L (2018) UHPLC-ESI-QTOF-MS Phenolic Profiling and Antioxidant Capacity of Bee Pollen from Different Botanical Origin. *International Journal of Food Science & Technology* 54:335–346. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13941>
- Rodríguez S, Acuña I, Escanilla C (2022) Polinización Sostenible: Adaptación al cambio climático para la producción de fruta en Chile. Centro de Biotecnología de Sistemas (CSB) UNAB.

- Rzepecka-Stojko A, Stec M, Kurzeja E, Gawrońska E, Katarzyna Pawłowska-Góral (2012) The Effect of Storage of Bee Pollen Extracts on Polyphenol Content. *Polish Journal of Environmental Studies* 21
- SAG (2007) Protocolo ensayos de valor agronómico de las nuevas variedades/cultivares de alfalfa (*Medicago sativa* L.) que postulan al registro de variedades aptas para la certificación. MINISTERIO DE AGRICULTURA SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO
- SAG (2024) Boletín Apícola. División de Protección Pecuaria-SAG.
- Salamanca G, Osorio P, Gutiérrez M (2011) Sistema trazable en el proceso de extracción y beneficio del polen corbicular colectado por *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae) en la zona Altoandina de Boyacá, Colombia. *Zootecnia Tropical/Zootecnia tropical* 29:127–138
- Sculfort O, Gérard M, Gekière A, Nonclercq D, Gerbaux P, Duez P, Vanderplanck M (2021) Specialized Metabolites in Floral Resources: Effects and Detection in Buff-Tailed Bumblebees. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.669352>
- Sewlikar S, D'Souza D (2017) Antimicrobial Effects of Quillaja saponaria Extract Against *Escherichia coli* O157:H7 and the Emerging Non-O157 Shiga Toxin-Producing *E. coli*. *Journal of Food Science* 82:1171–1177. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13697>
- Taha E-K (2015) Chemical Composition and Amounts of Mineral Elements in Honeybee-Collected Pollen in Relation to Botanical Origin. *Journal of Apicultural Science* 59:75–81. <https://doi.org/10.1515/jas-2015-0008>
- Taha E-K, Al-Kahtani S, Taha R (2019) Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26:232–237. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.06.003>
- Taormina P, Niemira BA, Beuchat L (2001) Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology* 69:217–225. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00505-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00505-0)
- Tello C (2024) Boletín Interactivo Apícola. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA)
- Tsuruda J, Chakrabarti P, Sagili R (2021) Honey Bee Nutrition. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 37:505–519. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.06.006>
- Valdés P (2014) Polen apícola: una alternativa de negocio. ODEPA, Reporte N° 1
- Valdivia-Olivares R, Martínez-González E, Montenegro G, Bridi R, Álvarez-Figueroa M, González-Aramundiz J (2023) Innovative multiple nanoemulsion (W/O/W) based on Chilean honeybee pollen improves their permeability, antioxidant

and antibacterial activity. *Food research international* 168:112767–112767. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112767>

Vallette A, Molina JP, Neira M, Cuevas M, Danty J, Cancino P, Meza L, Campos M, Castillo C, Miranda M, Echávarri V, Acuña D, Niño de Zepeda A (2004) Especificaciones técnicas de buenas prácticas agrícolas para la apicultura. Comisión de buenas prácticas agrícolas.

VanEngelsdorp D, Meixner MD (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. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>

Vit P (2004) Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* 35 32-39










Weber E (2012) *Apis mellifera*: the domestication and spread of European honey bees for agriculture in North America. *University of Michigan Undergraduate Research Journal* 20–23

White J (1975) Composition of honey. In Crane, E. (ed.), *Honey: A Comprehensive Survey*. Heinemann, London, England, pp. 180-194








Yang Y, Liu M, Wang K, Yang Y, Su N, Huang W, Wu Y (2020) Chemical and cytological evaluation of honeybee pollen antioxidant ability. *Journal of food science* 85:824–833. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15047>

## X. ANEXOS

**Anexo 1.** Identificación de colores de los cúmulos corbiculars de acuerdo a la escala de colores Pantone PMS de muestras de la primera recolección realizada el 04 de Enero de 2024.

Espectro polínico	Cumulo corbicular	Color Escala PMS
<i>Medicago sativa</i>		PMS 4525
<i>Schinus polygamus</i>		PMS 1255
<i>Taraxacum officinale</i>		PMS 1505
<i>Echium vulgare</i>		PMS 5185
<i>Cynara cardunculus</i>		PMS 4985
Brassicaceae		PMS 107
<i>Galega officinalis</i>		PMS 469
<i>Luma apiculata</i>		PMS 1405
<i>Rubus ulmifolius</i>		PMS 610

**Anexo 2.** Identificación de colores de los cúmulos corbiculares de acuerdo a la escala de colores Pantone PMS de muestras de la segunda recolección realizada el 23 de Enero de 2024.

Espectro polínico	Cumulo corbicular	Color Escala PMS
<i>Schinus polygamus</i>		PMS 1255
<i>Taraxacum officinale</i>		PMS 1505
Asteraceae		PMS 467
<i>Medicago sativa</i>		PMS 4525
<i>Galega officinalis</i>		PMS 469
<i>Mentha pulegium</i>		PMS 197
<i>Luma apiculata</i>		PMS 109