



INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

Diversificación de la cadena apícola, a través de la valorización de pólenes apícolas producidos en Chile y la evaluación de sus propiedades biológicas específicas

PYT-2009-0118

Gloria Montenegro
Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal
Pontificia Universidad Católica de Chile



MAYO 2012



I. ANTECEDENTES GENERALES

- Código: FIA PYT2009-0118
- Nombre del Proyecto: Diversificación de la cadena apícola, a través de la valorización de pólenes apícolas producidos en Chile y la evaluación de sus propiedades biológicas específicas
- Región o Regiones de Ejecución: V, VI, VII, VIII, IX, X y RM
- Agente Ejecutor: Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal
- Agentes Asociados: Apilandia Ltda, MIPAGRO, Cooperativa Apícola Coapinort, Cooperativa Mielles del Sur, Red Apex Ag, Apiunisexta AG, Red de apicultores de la Región Metropolitana.
- Coordinador del Proyecto: Gloria Montenegro
- Costo Total (*Programado y Real*):
- Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total) (*Programado y Real*):
- Período de Ejecución: Fecha de inicio 01/05/2009, Fecha de término 30/04/2012.

II. RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto se orientó a generar nuevo conocimiento en relación al polen apícola y a sus propiedades de diferenciación, con el propósito de darle valor agregado vía diferenciación.

Para ello, el proyecto evaluó 1.021 muestras de polen en 3 temporadas en la zona central y sur del país, a objeto de evaluar las características químicas y biológicas del polen apícola e identificar selecciones que tengan potencialidad para aplicaciones de interés comercial.

Para la evaluación de sus propiedades de diferenciación fue necesario ajustar y validar los protocolos y verificar las propiedades del polen apícola según su origen botánico.

Los resultados del proyecto fueron continuamente difundidos a apicultores y empresarios exportadores de productos apícolas durante todo el proyecto, a quienes se les entregó material audiovisual especialmente diseñado en el contexto del proyecto, entre los que destacan las Fichas de Polen Apícola Chileno, primeras en su tipo a nivel nacional.

Un logro relevante del proyecto y como una forma de validar nacional e internacionalmente sus resultados, es que se generó la norma de certificación de polen diferenciado en conjunto con el Instituto de Normalización de Chile (INN), correspondiente a la Norma NCh3255-2011 "Polen apícola - Calidad de la colmena para polinización y diferenciación del polen según origen botánico", elaborada con la colaboración del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), específicamente, con la Entomóloga Sra. Patricia Estay.

III. INFORME TÉCNICO

1. Objetivos del Proyecto:

- **Objetivo general**

Aumentar la competitividad de la cadena apícola mediante el descubrimiento de nuevos productos naturales a partir del polen apícola y mediante el desarrollo tecnológico de nuevas oportunidades de negocios en la producción de polen apícola como insumo natural de alto valor agregado para el mercado nacional e internacional, contribuyendo a fortalecer y diversificar la industria agroalimentaria y la conservación de la biodiversidad de especies nativas utilizados por la abeja como fuente de polen.

El proyecto logra su propósito, debido a que ha generado un nuevo conocimiento científico-tecnológico del polen apícola chileno, sus características físicas, químicas (propiedades antioxidantes, pigmentos, proteínas), biológicas y atributos como potencial insumo alimentario.

Este nuevo conocimiento se logra validar y oficializar en una Norma de certificación reconocida nacional e internacionalmente, que abre oportunidades de reconocimiento objetivo al valor agregado vía diferenciación del polen.

- **Objetivos específicos**

- *Evaluar las características químicas y biológicas del polen apícola para establecer selecciones que tengan potencialidad para aplicaciones de interés comercial.*

Al término del proyecto (abril/2012) se logró coleccionar y analizar 1.021 muestras de polen apícola. En esta materia, se ha logrado superar las metas propuestas en colecta y evaluación de pólenes, especialmente al incluir las del ensayo de polen en sitio de especies nativas (Til Til).

Se establecieron 15 tipologías de polen apícola de especies nativas que se consideran relevantes según su origen botánico y propiedades bioactivas; éstas se sistematizaron en fichas que describen sus características físicas, químicas y atributos.

- *Desarrollar y validar nuevos usos para el polen apícola para su comercialización con valor agregado mediante la identificación de sus propiedades biológicas como insumos naturales.*

Para evaluar las propiedades del polen fue necesario elaborar extractos de polen en etanol y en agua. El procedimiento para elaborar extractos de polen apícola es radicalmente diferente al desarrollado por el grupo ejecutor para la elaboración de extractos de miel.

Los extractos de polen apícola que demuestran un mayor potencial tecnológico y comercial del polen apícola diferenciado, se refieren a su contenido de pigmentos (como posible aditivo natural en nutrición animal y humana) y capacidad antioxidante, algunas selecciones demuestran actividad biológica significativa a concentraciones mayores que extractos de miel.

- *Evaluar la potencialidad tecnológica y de mercado de los nuevos productos desarrollados mediante una estrategia de transferencia tecnológica hacia agentes estratégicos de la cadena productiva asociada a los productos generados.*

Para hacer viable la transferencia y adopción de los resultados del proyecto (pólene diferenciados), a las tipologías de polen seleccionadas además de las evaluaciones de sus propiedades biológicas, pigmentos, antioxidantes y nutritivas, se realizaron evaluaciones sensoriales, de color, aromas y toxicidad, ya que todos estos elementos forman parte de elementos que los propios asociados presentaron como aspectos a despejar a objeto que se pueda comercializar el polen diferenciado en nichos de mercado exigentes que hagan rentable la diferenciación.

- *Contribuir a la implementación de capacidades técnicas y asociativas en beneficiarios para asegurar la apropiabilidad de resultados.*

Los resultados del proyecto fueron continuamente difundidos a apicultores y empresarios exportadores de productos apícolas durante todo el proyecto, a quienes se les entregó material audiovisual especialmente diseñado en el contexto del proyecto, entre los que destacan las Fichas de Polen Apícola Chileno, primeras en su tipo a nivel nacional.

Los resultados se presentaron en APIMONDIA 2011 en Argentina, mediante posters científicos y ponencia de la Profesora Gloria Montenegro, logrando un alto interés por parte de científicos, profesionales y apicultores.

- *Generar un catastro geográfico dinámico de los pólenes chilenos y sus propiedades, según su origen geográfico y botánico, para el desarrollo de nuevas oportunidades de negocios*

Se elaboró una base de datos de propiedades de pólenes chilenos entre las regiones IV a la X, a partir de la colecta de 1.021 muestras de polen. Esta base de datos contiene la ubicación geográfica, código de muestra y origen botánico de cada una. Esta base de datos permitirá desarrollar nuevas investigaciones aplicadas en esta materia, como también, validar la información generada por el proyecto. Estos elementos son de gran importancia cuando el nuevo conocimiento y la innovación (en este caso vía diferenciación) se abren camino para impulsar nuevas líneas de negocios y/o emprendimientos innovativos en empresas apícolas o del sector agroalimentario. Fiel a la misión de la UC, toda esta información es pública y es la que se ha dado a conocer en cada Taller y Charla realizada en el marco de este proyecto.

2. Metodología del Proyecto:

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada (*aunque sea igual a la indicada en la propuesta de proyecto original*).
- Principales problemas metodológicos enfrentados.
- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.
- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad (*se pueden incluir como anexos*).

Clasificación y muestras de polen

A cada muestra de polen apícola recibida se le asignó un código, el cual indica la fecha de muestro, su procedencia y la colmena en la cual la trampa de polen fue puesta. El código está hecho de ésta manera debido a que se realizó una recolección diaria a una hora determinada durante varios días. A continuación se explica cómo leer éste código:

PEC2271110TiTi12C5

PEC2: indica que son muestras que provienen de INIA.

271110: Indica la fecha en que fue colectada la muestra, 27-11-2010.

TiTi: Lugar del muestreo, Til-Til.

12: Indica la hora de recolección, 12 hrs.

C5: Colmena en la que se colocó la trampa de polen para la posterior colecta.

Al momento de la recepción de las muestras y la asignación del código, se ingresa a una base de datos, donde se registra toda la información relacionada con la muestra, como: Código asignado, cantidad de muestra, nombre del productor que aportó con la muestra o pidió servicio de identificación y análisis, región y localidad donde fue recolectada, contacto del productor (mail, teléfono), la fecha de ingreso al laboratorio y la fecha de muestreo.

Estudio del color de cúmulos de polen apícola

Cada muestra fue separada de acuerdo al color y textura presentado por los cúmulos de polen (Hidalgo *et al.*, 1990; Montenegro *et al.*, 1992), de cada grupo de color se realizó una preparación para determinar el origen botánico de los granos de polen mediante observación microscópica y comparación de la muestra con preparaciones permanentes de la palinoteca del Laboratorio de Botánica de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

El color otorgado a cada grupo de cúmulos se realizó mediante comparación de colores entre la muestra y una guía de colores (Pantone Plus Series FORMULA Guides Solid Coated

& Uncoated), expresándose mediante un código particular atribuido a un color específico. La comparación de colores se realizó bajo luz blanca.

Posteriormente se seleccionaron aquellos grupos de cúmulos polínicos cuya fuente floral fue identificada a nivel de especie (20 especies). Además, se eligieron otros 11 grupos de cúmulos polínicos identificados sólo a nivel de género, debido a la importancia de éstos como fuente de polen para *A. mellifera*. Finalmente, se digitalizaron los colores de referencia seleccionados en el Pantone para cada especie y género con el fin de elaborar un rango de colores para cada uno de ellos con sus respectivos porcentajes de participación, la digitalización se llevó a cabo utilizando el escáner del equipo multifuncional Lexmark X 1250.

Determinación del color mediante colorímetro

Los grupos de cúmulos polínicos correspondientes a las especies y géneros seleccionados anteriormente, fueron analizados mediante un colorímetro, para esto, los cúmulos de cada color, fueron molidos en mortero hasta conseguir una mezcla homogénea, la cual fue aplastada entre dos hojas de papel blanco, procurando obtener una capa lisa, sin grietas en la superficie y de un espesor de 3 mm para que el color del papel no interfiriera en la medición (Telleria y Saralosa, 2003).

Algunas de las muestras separadas anteriormente no pudieron ser evaluadas mediante colorímetro debido a la escasa cantidad de material necesario para realizar esta prueba. Se utilizó un colorímetro Chroma Meter CR-400 KONICA MINOLTA con el cual se realizaron tres mediciones para cada color, aplicando el cabezal directamente sobre la superficie de polen y obteniendo un promedio para cada una de las tres coordenadas (L^* a^* b^*). Los valores promedio de cada coordenada fueron transformados al color correspondiente utilizando el software ADOBE In Design CS 5.5, con el fin de establecer una escala visual de colores para cada especie y género.

Las coordenadas L^* a^* y b^* pertenecen a un espacio de color tridimensional y uniforme y permiten identificar los colores de una forma precisa. El eje vertical L^* es una medida de la luminosidad y varía de negro (valor 0) a blanco (valor 100). Los valores positivos de a^* indican colores rojos y los valores negativos colores verdes, mientras que los valores positivos de b^* indican colores amarillos y los negativos colores azules.

Análisis de Origen Botánico o análisis Palinológico

Luego de ser rotulada, cada muestra fue analizada palinológicamente. A partir de la muestra homogenizada, se tomaron 10 gramos o un 25% en el caso de muestras con un peso inferior a los 20 gramos. A partir de ésta sub-muestra se separaron las corbículas de polen de acuerdo a su color (Ramírez, y otros, 2004; Montenegro, y otros, 1992) Una vez completada la separación, cada grupo de color fue pesado, almacenado y rotulado para poder determinar su proporción dentro de la muestra completa. Posteriormente se determinó el origen botánico, para lo cual se tomó una corbícula de polen de una

separación y se colocó en un portaobjetos, se le aplicó una gota de alcohol al 70% para disolver la capa exterior del cúmulo de polen, con ayuda de una pinza de disección. Una vez evaporado el alcohol se agregó una gota de solución Carberla para teñir los granos de polen, se aplicó una gota de gelatina glicerinada derretida y finalmente se cubrió con un cubreobjetos. Una vez secos los frotis se limpian los excedentes de gelatina, quedando listos para la observación al microscopio óptico bajo un aumento de 40X. La identificación del origen botánico se realiza con la ayuda de las muestras de la palinoteca, libros de referencia y fotografías de archivo (Montenegro, y otros, 1992) .

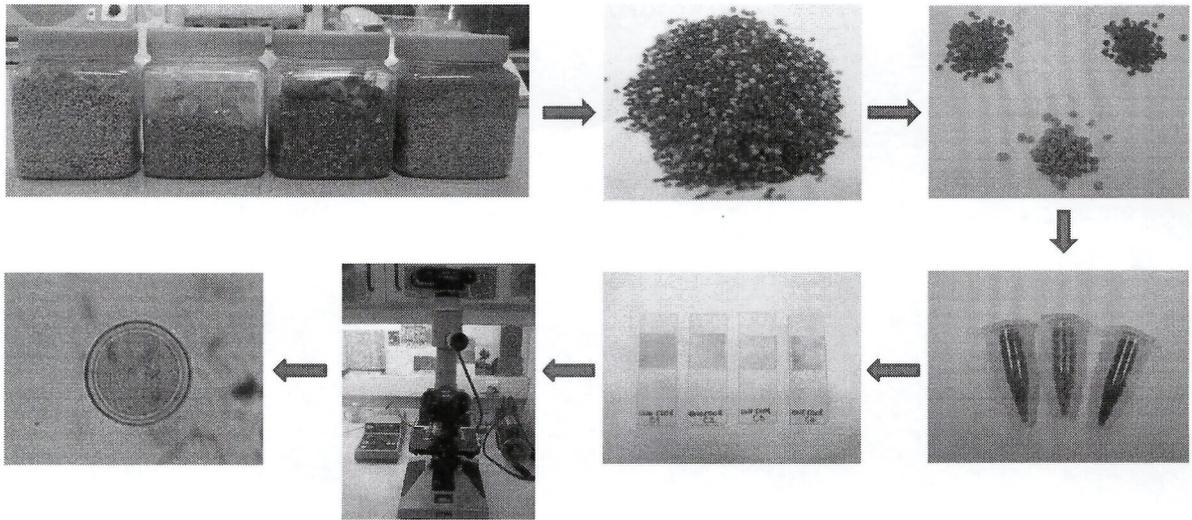


Figura: Proceso de determinación del origen botánico de las muestras de polen

Análisis de Actividad Microbiológica o de Propiedades Biológicas del Polen

Cepas de patógenos utilizados

Se utilizaron 4 cepas de bacterias patogénicas de las especies mencionadas que se adquirieron en el Laboratorio de Cepario del Instituto de Salud Pública de Chile, mientras que los hongos fueron aislados, identificados y cultivados en PDA en el Laboratorio de Patología de Cultivos de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Cepas originales de los microorganismos estudiados

Microorganismo	Cepa original
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ISP 364-00
<i>Botrytis cinerea</i>	--
<i>Alternaria solani</i>	--

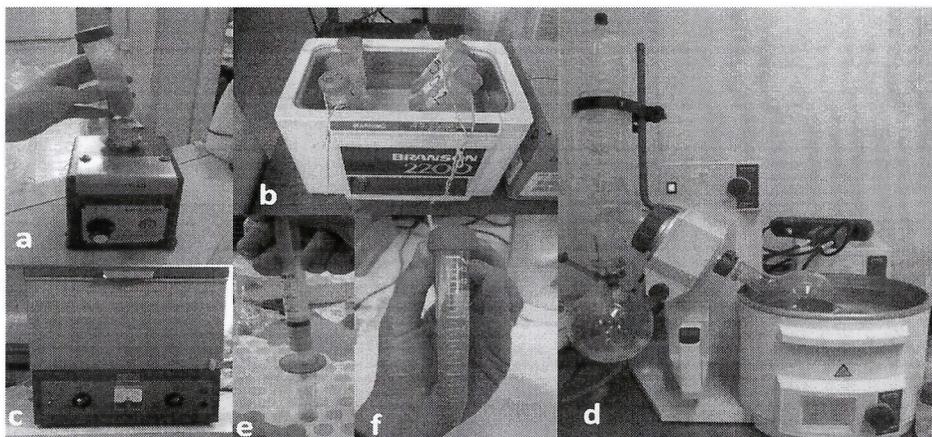
Preparación de Extractos de polen depara evaluar sus propiedades

Extractos etanólicos con sonicador

La preparación de los extractos de polen apícola de cada muestra fueron realizados bajo el siguiente protocolo, adaptado de Almaraz et al, 2004 y Almaraz et al, 2007.

Se tomaron 5 gramos de polen a los cuales se les agregó 10 mL de etanol al 70% y se homogenizó la muestra en el vórtex. La mezcla fue sometida a un baño en sonicador durante 1 hora, produciendo la disgregación de las corbículas pero sin romper la pared celular de los mismos. Luego se centrifugó durante 20 minutos a 6000 rpm para la decantación de las muestras, separando el sobrenadante del pellet. Al pellet resultante se le agregó nuevamente 10 mL de etanol al 70%.

Este procedimiento de extracción se repitió 5 veces. Una vez realizado esto, se juntaron las 5 fracciones obtenidas para ser concentradas en rotovapor a sequedad (a 40°C) y así eliminar de la muestra el etanol. Luego se resuspendió el residuo en 10 mL de agua destilada estéril. La suspensión obtenida fue centrifugada durante 20 minutos a 6000 rpm y finalmente el sobrenadante se separó del pellet con filtros de 0,45 µm *Orange Scientific* para su desinfección, obteniendo de esta manera el extracto final.



Materiales utilizado en el proceso de preparación de extractos de polen apícola a) Voltex b) Sonicador c) Centrifuga d) Rotovapor e) Filtro f) Extracto listo.

Extractos de la fracción citoplasmática del grano de polen

Para la preparación de los extractos se utilizó el primer paso de la metodología adaptada por Jara y López de Rozema et al., a través del cual se consigue la fracción citoplasmática del grano de polen. El procedimiento consistió en poner a baño maría 500 mg de polen por 1 ml de solución; formada por el solvente utilizado, agua destilada y ácido clorhídrico en la proporción 79:20:1, durante dos horas, llevándolo a sequedad. Para las pruebas antibacterianas se realizaron extracciones con etanol y metanol, en cambio, en las pruebas con hongos se empleó sólo etanol. Posteriormente se completa el volumen inicial con agua destilada y se centrifuga durante 15 minutos a 3500 rpm. Finalmente, se remueve el sobrenadante, se rotoevapora a sequedad, y se resuspende en agua destilada. Con respecto a las concentraciones de los extractos probados en bacterias, estos se resuspendieron en la misma cantidad de agua que de solvente utilizado en un principio para la extracción, en cambio para los hongos, se dividió este volumen por tres, con el fin de triplicar las concentraciones.

Extractos acuosos con sonicador

Se tomaron 5 gramos de polen a los cuales se les agregó 10 mL de agua destilada. La mezcla fue sometida a un baño en sonicador durante una hora y luego fue centrifugada a 6000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue separado del pellet resultante, al que se le agregó nuevamente 10 mL de agua destilada. Este proceso se repitió 5 veces. Una vez realizado esto se juntaron las cinco fracciones obtenidas para ser concentradas en rotovapor a sequedad (a 40°C). Luego se resuspendió el residuo en 10 mL de agua destilada estéril, y la solución fue preparada en dos partes (B1 y B2). La fracción B1 fue pasada por filtros de 0.45µm y posteriormente utilizada para realizar el ensayo microbiológico, mientras que la fracción B2 fue usada en el ensayo sin ser filtrada.

Evaluación de Pigmentos en Polen apícola

Para cada prueba de extracción de compuestos carotenoides, se utilizaron 50 gramos de polen apícola, el cual fue recolectado el año 2009. Varias de las muestras recibidas fueron mezcladas, hasta llegar a un peso total de 2 kilos. Esta mezcla de pólenes tenía los siguientes colores predominantes: blanco, café, amarillo y amarillo-café.

Además, mediante análisis palinológico se determinó el origen botánico de la mezcla, para poder determinar la proporción de las especies vegetales presentes en la mezcla de polen corbicular.

Se realizaron tres pruebas para la extracción de compuestos carotenoides en el Laboratorio de Botánica. Para llevar a cabo la primera extracción (E1), la cual se llevó a cabo de manera que los solventes actuaran conjuntamente, se utilizaron 50 gramos de polen apícola, los cuales fueron molidos en el molinillo del extractor y luego mezclados con 50 mL de agua destilada y 50 mL de n-hexano en la licuadora durante aproximadamente cinco minutos. Luego, la mezcla fue filtrada con ayuda de un embudo Büchner, un Kitasato y una bomba de vacío. El extracto filtrado fue depositado en un matraz aforado de 50 mL. Posteriormente se tomó una alícuota de mL y se rotaevaporó a sequedad (a 45°C). Una vez realizado este proceso, se resuspendió en agua destilada (4 mL), se filtró con filtro de membranas de nitrocelulosa (0,45 μ) y se llevaron a cabo los análisis de actividad antibacteriana.

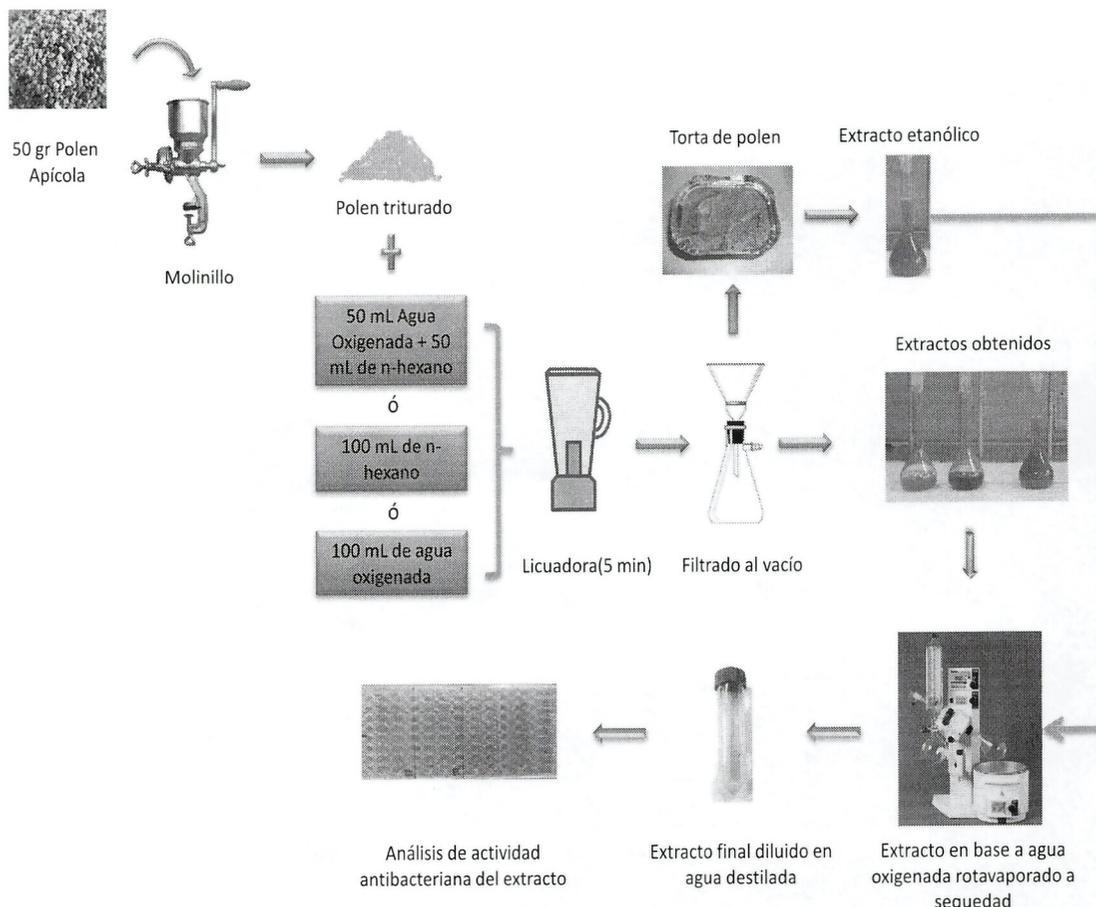
Para el segundo proceso de extracción (E2), en el cual los solventes se utilizaron de manera secuencial, se utilizaron 100 mL de n-hexano, 50 gramos de polen apícola y se siguió el mismo proceso mencionado anteriormente. Luego, de la filtración, la torta de polen apícola restante fue diluida en 100 mL de agua oxigenada y sometida al mismo proceso.

En el tercer proceso de extracción (E3) se utilizaron 50 gramos de polen apícola y 100 mL de agua oxigenada, mezcla que fue sometida al proceso de extracción.

Sin embargo, sólo el extracto preparado a partir de agua oxigenada puede ser rotaevaporado, ya que el solvente n-hexano no puede ser re-suspendido en agua destilada. Además, como los resultados de las pruebas de actividad antibacteriana fueron muy promisorios, se decidió repetir los extractos preparados a partir de agua oxigenada, para lo cual se probaron 2 formas:

- 50 gramos de polen diluidos en 100 mL de agua oxigenada y licuados durante 5 minutos (E4).
- 50 gramos de polen triturados en licuadora y luego mezclados con 100 mL de agua oxigenada durante 5 minutos en licuadora (E5).

Posteriormente, los extractos fueron filtrados y rotaevaporados de la misma manera descrita anteriormente, y luego se realizaron las pruebas de actividad antibacteriana.



Proceso de extracción de compuestos carotenoides a partir de polen apícola y preparación de extractos fenólicos a partir de torta de polen sobrante.

Preparación de las bacterias y hongos para evaluar actividad biológica del polen apícola

Para el caso de las bacterias se prepararon las bacterias a utilizar, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, 24 horas antes de proceder a realizar las dos pruebas. Se diluyó una unidad de masa de células de cada una de las bacterias en suero fisiológico, ajustado con la escala de 0,5 MacFarland.

Para determinar la capacidad antifúngica de los extractos, se utilizó la técnica del envenenamiento del alimento (Food Poison Technic) (Groover and Moore, 1962; Shahi et al, 1999 citado en Shahi, 2003) en PDA. Para esto, se emplearon placas Petri de 35x10 mm, con un volumen de 3 mL de extracto y PDA, en las dosis v/v adecuadas a los tratamientos correspondientes. Posteriormente se inoculó un disco de micelio de 6 mm de diámetro en el centro de cada placa a partir de un cultivo de 7 días, y se incubó a 25°C en oscuridad; se realizaron 3 repeticiones por tratamiento en todos los experimentos. Se registró el diámetro micelial cada 24 hrs. desde la inoculación, hasta que el control alcanzara los bordes de la placa petri.

Antibiograma

La medida de actividad antibacteriana de extractos de polen a partir de antibiogramas se llevó a cabo a partir de dos pruebas. La primera con el objetivo de evaluar la mínima concentración inhibitoria (MIC) y la segunda para determinar la mínima concentración bactericida (MCB) y así valorar si el efecto de control de los extractos de polen apícola tienen carácter bacteriostático o bactericida.

Mínima concentración inhibitoria (MIC)

Se usaron placas ELISA de 92 pocillos para la realización del ensayo, empleando 1 placa ELISA por cada 2 extractos y bacteria distribuido de la siguiente forma: la primera fila se utilizó como control de la bacteria y el caldo de soya y el resto de la placa se dividió para hacer la prueba con dos extractos. En todos los pocillos utilizados se aplicaron 150 µl de caldo de soya (Difco TMTrypticase Soy Broth). En el primer pocillo de la 2^a, 4^a, 5^a y 6^a fila se añadieron 150 µl de extracto de polen que se fue diluyendo a la mitad sucesivamente con una micropipeta hasta el último pocillo de cada fila llegando a tener la muestra diluida hasta 128 veces (0,78125%), tomando 150 µL de extracto mezclado con caldo de soya del primer pocillo depositándolo en el siguiente pocillo. Esta operación se repitió para el segundo extracto en las filas 8^a, 10^a, 11^a y 12^a. Una vez terminado este proceso se incorporó en los cuatro primeros pocillos de la 1^a fila, así como en las filas 2^a, 4^a, 5^a, 6^a, 8^a, 10^a, 11^a y 12^a, 5 µl de la bacteria correspondiente con una repetidora. Todos estos procedimientos se hicieron dentro de una cámara de flujo laminar para evitar cualquier contaminación. Una vez realizadas las placas se colocaron en una estufa de incubación a 37 °C y se leyeron los resultados 24 horas después. (Montenegro et al, 2009).

Mínima concentración bactericida (MCB)

El cálculo de la mínima concentración bactericida (MCB) se realizó sobre placas de petri con agar soya (Difco TM Tryptic Soy Agar). Se tomó una alícuota de 4,5 µl de las filas donde se encuentra el extracto a distintas concentraciones y la bacteria las placas ELISA y se depositaron las gotas sobre las placas de petri. Se utilizó una placa petri para dos extractos. Las placas se colocaron en una estufa de incubación a 37°C y después de 24 horas se observaron los resultados.

Actividad fungicida/fungistático

En los tratamientos en que hubo inhibición absoluta del crecimiento micelial, se realizó la prueba fungicida/fungistático, método descrito por Feng and Zheng (2007), que consiste en transferir el disco de micelio del tratamiento a una placa petri con PDA puro, e incubarlo a 25°C en oscuridad, para observar si el hongo reanuda su crecimiento. Si este se reanuda, el efecto es fungistático, en caso contrario, si no hay crecimiento micelial, el efecto es fungicida.

Discos de papel de filtro esterilizado.

Se realizó una prueba complementaria para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de polen. Se pusieron discos de papel de filtro esterilizado sobre placas petri que contenían unos 25 ml de agar soya (Difco™ Tryptic Soy Agar) y 100 µL de cada suspensión de bacteria, que se distribuyó sobre la placa utilizando un rotaplate. Los filtros fueron repartidos en la placa en cuatro filas y cuatro columnas. Cada una de las filas se usó para un extracto distinto aplicando 5 µL del mismo en el 2º, 3º y 4º filtro de la fila, dejando el primero como control al cual se le añadió 5 µL de agua destilada esterilizada. Las placas petri se colocaron en una estufa de incubación a 37 °C y se leyeron los resultados 24 horas después (Basim E. et al, 2006).

Análisis de Características Químicas del polen apícola

De cada muestra de polen se tomaron 0,5 gramos los cuales fueron disueltos en agua ácida (pH:2) y se utilizó vórtex para ayudar al proceso de disgregación de las corbículas. El mismo procedimiento fue utilizado para la caracterización de especies nativas (*Cryptocarya alba*, *Kageneckia oblonga*, *Echinopsis chiloensis*, *Schinus sp.*, *Azara sp.*).

Medición de Compuestos Fenólicos

Las muestras previamente disueltas fueron diluidas en agua desmineralizada mil veces, debido a su alta concentración. Posteriormente se realizó la medición mediante el método de Folin-Ciocalteu y espectrofotometría. Para esto se tomó 200µL de la dilución, al que se le adicionaron 150µL de carbonato de sodio al 20%, preparado anteriormente, y 50µL de reactivo de Folin- Ciocalteu. La preparación se midió con espectrofotómetro bajo una longitud de onda de 765 nm. A partir de los valores de absorbancia que se obtuvieron, se cuantificó la concentración de compuestos fenólicos. Para esto se empleó una curva de calibración construida a partir de ácido gálico.

Medición de Pigmentos

1. Licopeno

A la muestra de 0,5 gramos de polen disuelta en 2 mL de agua a pH: 2, se le adicionó ordenadamente 5mL de BHT (Butil hidroxitolueno) al 0,05%. Una vez que se homogenizó al usar vórtex, se agregaron 2 mL de Etanol y 8 mL de n-Hexano. Se dejó enfriar por 10 a 15 minutos en hielo picado, y luego se tomó la fase superior para medir en espectrofotómetro bajo una longitud de 503nm. Con los valores de absorbancia que se obtuvieron, se cuantificó la concentración de licopeno, para lo que se utilizó una curva de calibración basada en licopeno.

2.- Betacaroteno

A los 0,5 gramos de la muestra de polen disuelta en 2 mL de agua ácida (pH: 2), se adicionó 3 mL de Acetona y 10 mL de Éter de Petróleo, luego de 10 minutos se tomó una alícuota de la fase superior, para medir en espectrofotómetro bajo una longitud de onda de 436nm. Los valores de absorbancia obtenidos se utilizaron para la cuantificación de betacaroteno, mediante el uso de una curva de calibración construida con betacaroteno.

Actividad Antioxidante

La capacidad antioxidante fue evaluada mediante el ensayo de FRAP, cuantificando mediante la equivalencia milimolar de ion Ferroso por Kilogramo de muestra homogenizada. (Bertoncelj, y otros, 2007).

Se evaluó la capacidad antirradicalaria mediante el ensayo de DPPH, cuantificando mediante los gramos equivalentes de Ácido Ascórbico por Kilogramo de muestra (Meda, y otros, 2005).

Caracterización química

1. HPLC

A los extractos 3.2 y 4.1, formados por polen corbicular de las especies *E. pulverulenta* y *C. alba* respectivamente, se les realizó un Perfil de polifenoles por HPLC, en el Laboratorio de Nutrición Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

2. Perfil Aromático

Para la detección, identificación y cuantificación de los posibles compuestos aromáticos presentes en el extracto número 3.2 (*E.pulverulenta*), se realizó un Perfil Aromático mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (GS/MS), en el Centro de Aromas y Sabores (CEAS), DICTUC S.A.

Análisis y evaluaciones de toxicidad de polen apícola

Se realizaron pruebas de evaluación de la capacidad desinfectante e INO (índice de neutralización orgánica) sobre varios tipos de bacterias (*E. coli*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*). También se realizaron pruebas de hipoalergenicidad y toxicidad de los extractos de polen, específicamente de toxicidad dérmica, inhalatoria, test de sensibilidad cutánea irritación ocular y dérmica. Estas pruebas fueron realizadas en el laboratorio externo Salimax.

Análisis y evaluaciones sensoriales

Se realizaron pruebas de aceptabilidad, diferencia y preferencia de alimentos, específicamente yogurt y leche con extractos de polen en un 0.5 y 1%. Estas pruebas fueron realizadas por el Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA).

3. Actividades del Proyecto:

- *Carta Gantt o cuadro de actividades comparativos entre la programación planteada en la propuesta original y la real.*

No hubo cambios significativos en la carta Gantt original versus la realizada.

- *Razones que explican las discrepancias entre las actividades programadas y las efectivamente realizadas.*

La única excepción a la carta Gantt original versus la aplicada, es que los análisis de propiedades de los pólenes colectados, comenzaron desde el inicio del proyecto, debido a que se aprovecharon muestras colectadas en los meses previos a la puesta en marcha del proyecto, mientras se realizaba la reformulación del proyecto y para no perder la temporada de colecta.

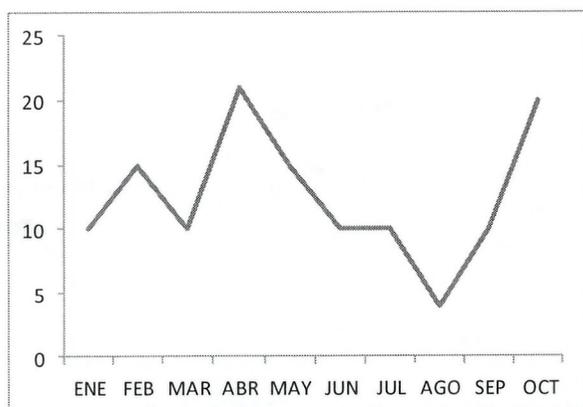
4. Resultados del Proyecto:

- Descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión utilizando gráficos, tablas, esquemas, figuras u otros, que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones relevantes del desarrollo del proyecto.

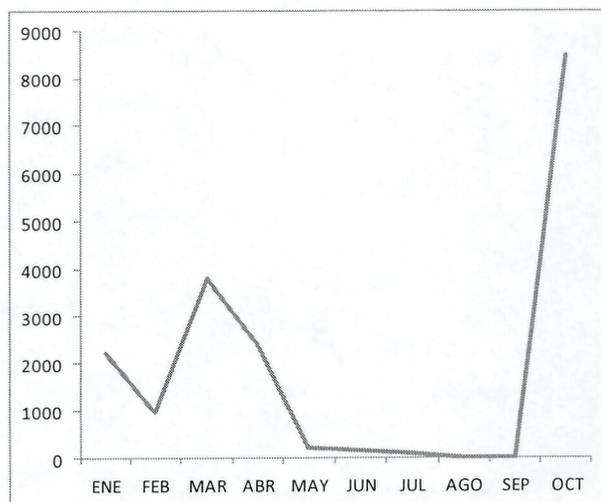
A continuación se presenta un detalle de los resultados más relevantes del proyecto, y que no habían sido abordados en profundidad en el último Informe (5º) Técnico.

Colecta de polen

Se recibió un total de 1.021 muestras de polen corbicular durante el proyecto, las que fueron ingresadas a la base de datos para posteriormente ser preparadas para realizar los distintos tipos de análisis. Como se puede apreciar la cantidad de muestras recibidas disminuye de manera importante desde el mes de Junio hasta Agosto, repuntando en Septiembre y Octubre.



Cantidad de muestras recibidas por mes



Cantidad (gr) de polen colectado por mes



Se observa que la cantidad de polen colectado por colmena es de 2 a 4 kg en los meses de Enero y Marzo, teniendo una baja en Febrero, y bajando definitivamente en Mayo, manteniéndose una baja recolección hasta el mes de Septiembre y Octubre donde nuevamente hay una gran cantidad de polen colectado, llegando a los 8,5 kg.

Este hecho se explica por el particular ciclo de vida de la abeja. El primer peak de Enero es debido a las altas cantidades de polen que necesita la abeja para desarrollar los huevos y alimentar las larvas existentes en ese momento particular, las que serán las futuras abejas pecoreadoras. Si bien existe solo 2 kg de polen por colmena, estas muestras sólo fueron recolectadas a partir de la segunda quincena de Enero, lo que nos da un período de muestreo de sólo medio mes. Si el comportamiento mensual es más o menos uniforme, se puede deducir que el total mensual fue de 4 kg, similar al mes de Marzo.

La baja en Febrero es explicada por las necesidades energéticas de la abeja. La crianza de larvas ya ha disminuido bastante y se hace más importante la recolección de miel para alimentar a la gran cantidad de pecoreadoras producidas.

El segundo peak de Marzo se puede entender por la necesidad de la abeja de consumir alimento proteico que es necesario para preparar a las abejas nodrizas de invierno. En éste sentido la disponibilidad de polen es fundamental en ésta época, puesto que si éstas nodrizas no son bien alimentadas, no serán capaces de cuidar bien de la reina ni de sobrevivir los 3 a 4 meses de invierno, además de alimentar deficientemente las nuevas larvas de la siguiente temporada. Luego de este período, la abeja entra en invernada, por lo que los requerimientos por parte de la colmena, la disponibilidad floral de las especias vegetales y por tanto la recolección de productos disminuyen al mínimo, justamente lo que sucede con los meses de Mayo, Junio, Julio y Agosto.

Una vez ha terminado la invernada y las temperaturas comienzan a subir, entrando la primavera, la actividad de la colmena comienza a aumentar. Es por ello que tanto las muestras como la recolección de polen aumenta desde Septiembre, y llegando al peak mas alto en Octubre. La alta demanda de alimento proteico en ésta época, demanda que el polen suple, es debido a la gran cantidad de huevos que la abeja Reina comienza a colocar, y la gran cantidad de larvas que van naciendo. Es un crecimiento explosivo que da a inicio de la temporada apícola, disminuyendo eventualmente en meses posteriores, pero manteniéndose en cantidades altas para sustentar la gran población que la colmena conserva durante los días de verano, hasta la siguiente invernada.

Estudio del color de cúmulos de polen apícola

Determinación del color del polen a través de observación visual.

Los resultados de la determinación visual de los colores del polen apícola mostraron que los cúmulos polínicos de un mismo género o especie presentaron una gama de colores y en ningún caso un color único. Estos resultados concuerdan con otros encontrados en la literatura cuando analizan cúmulos polínicos y los diferencian por color (Hidalgo and Botello, 1990; Hodges, 1984; Ramirez y Montenegro, 2004; de Sá-Otero et al, 2002).

El total de colores obtenidos para todas las muestras analizadas fue 110, la mayoría de estos, correspondieron a amarillos, cafés, naranjos y verdes, en muy pocos casos a colores azules y grises. El color de los granos de polen está dado por la presencia de los pigmentos flavonoides y carotenoides dispuestos en la exina (Lunau, 2000). Estos pigmentos le otorgan tonalidades amarillas y anaranjadas y además estarían relacionados con la protección de los granos al absorber la radiación ultravioleta dañina y reflejar las longitudes de onda larga que podrían provocar sobrecalentamiento de los mismos. De igual forma, el color amarillo derivado de la presencia de flavonoides podría ser la principal señal de atracción en las flores para las abejas, mientras que el color amarillo derivado de los carotenoides correspondería a pigmentos secundarios del polen que suplementan la reflexión del color (Heuschen *et al.*, 2005). Estos antecedentes podrían explicar la mayor frecuencia de estas tonalidades en los cúmulos polínicos.

Los colores que abarcaron un mayor rango de muestras correspondieron al 110 U y al 117 U, encontrados ambos en los géneros *Brassica* y *Eucalyptus* y en las especies *Senna candoleana*, *Trifolium pratense* y *Trifolium repens* y exclusivamente en *Acacia*, *Tristerix*, *Lotus uliginosus* y *Melilotus indicus* el primero y en *Plantago*, *Prunus*, *Puya* y *Cissus striata* el segundo. Aunque son los colores presentes en mayor número de muestras, estas no superan el 30% del total analizado y corresponden sólo a dos colores de los 110 encontrados, lo cual de todas maneras serviría para acotar el rango de búsqueda si se quisiera determinar el origen floral de los cúmulos polínicos por medio de su color, ante esta posibilidad se recomienda el uso de otras características físicas como el tamaño y la forma de las cargas de polen para lograr una mejor aproximación.

Los colores más frecuentes del total de colores encontrados fueron el 110 U el 131U. En ambos casos fueron uno de los colores más repetidos en las especies y géneros con más muestras, como *Brassica*, *Eucalyptus*, *Lotus uliginosus*, *T. repens* y *T. pratense*. Dentro de las 12 muestras que presentaron estos colores la mitad de ellas correspondió a la familia Fabaceae.

El color 131U, fue también uno de los más frecuentes en un estudio realizado en Málaga, España en 1989 por Hidalgo y Bootello (1990). Ninguna de las especies utilizadas como fuente de polen por *A. mellifera* en el mencionado trabajo coincide con las especies analizadas en esta investigación, por lo tanto podría deducirse que este color es frecuente de encontrar en especies utilizadas como fuente de polen por las abejas melíferas, o al menos en climas similares, como es el de tipo mediterráneo presente en ambas áreas de estudio.

Especies como *Echium vulgare*, *Escallonia pulverulenta*, *Hypochaeris radicata* y *Luma apiculata* presentaron rangos de color estrechos y diferenciables respecto de las otras especies y géneros (Anexo 17), aunque sin duda *E. vulgare*, proporciona el polen apícola con el color más diferente del grupo, los tonos azulados y morados que presenta esta especie podrían estar determinados por la presencia de antocianinas al igual que en *Echium plantagineum* (Di Paola *et al.* 2004).

Los rangos de color más amplios correspondieron a los cúmulos polínicos identificados sólo a nivel de género, estas diferencias de colores podrían ser el resultado de la presencia de más de una especie en las muestras de ese género. Las especies *Lotus uliginosus*, *T. pratense* y *T. repens* también presentaron un amplio rango de color. Hodges (1984) considera que algunas diferencias de color en las cúmulos de polen de una misma especie podrían deberse a: las condiciones ambientales al momento de la colecta, madurez de la flor, cantidad de humedad usada por la abeja al elaborar el cúmulo, presencia de contaminantes como polvo o esporas de hongos y color y naturaleza de los materiales humectantes usados. También podría deberse a diferencias de color intraespecíficas debidas a la existencia de mutantes dentro de la misma especie (Lister *et al.*, 1998), o a la expresión de genes recesivos (Coe *et al.*, 1981). Por otro lado, las diferencias de color podrían también deberse a las condiciones a la que es expuesto el polen apícola después de su cosecha y durante su análisis, por ejemplo, contenido de humedad, temperatura de almacenamiento, tiempo transcurrido, calidad de la fuente de luz, percepción visual del observador.

La determinación del color del polen apícola mediante colorímetro indican que las cargas de polen casi en su totalidad presentan un componente de color rojo, las únicas especies en las que se observó valores negativos y por lo tanto que presentaron un componente de color verde frecuente fueron *Raphanus sativus*, *R. ulmifolius* y *Senna candolleana*.

Todos los pólenes analizados con colorímetro presentaron en su totalidad un componente de color amarillo. Los valores promedio más bajos para este parámetro fueron los de *R. ulmifolius* (22,37) y *Eucryphia cordifolia* (25,65) mientras que los valores promedio más altos se encontraron en *Eschscholzia californica* (73,66) y *Cissus striata* (68,85). Los resultados numéricos obtenidos mediante este método no generaron rangos de valores exclusivos para las distintas muestras analizadas y por lo tanto no son de gran utilidad para la identificación específica del origen floral de los cúmulos.

La transformación de los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) a un color específico por medio del software ADOBE In Design CS 5.5 permitió obtener rangos de colores más estrechos y homogéneos respecto a la metodología anterior, probablemente debido a la homogenización del color que se produjo al moler y mezclar los cúmulos polínicos y a la exclusión de la subjetividad generada por la percepción visual del analista.

Sólo para *E. californica* e *H. radicata* se consiguieron rangos de color más diferenciables respecto de las otras muestras. Aunque con este método se observó una discrepancia de color respecto a la observación visual, el color derivado del colorímetro resultó de la transformación de medidas objetivas que no fueron alteradas por la percepción del observador, de este modo se puede decir que los resultados son mucho más confiables.

Evaluación de actividad biológica de Polen Apícola chileno

Se probó la efectividad contra el crecimiento bacteriano del tercer extracto (E3) para con los patógenos *S. aureus* y *S. pyogenes*. Los resultados con E3 demuestran que fue más efectivo en el control del crecimiento de *S. pyogenes* que controlando el crecimiento de *S. aureus*. Estos resultados fueron evaluados a las 24 y 48 horas, por lo que además de inhibir el crecimiento por 24 horas, también hay actividad bactericida, la cual es medida a las 48 horas.

A continuación se resumen los resultados de la mínima concentración inhibitoria (MCI), donde (-) indica que no hubo crecimiento bacteriano, mientras que (+) indica crecimiento bacteriano. Resultados de la evaluación a 24 horas, en antibiogramas realizados en placas ELISA.

N° Extracto	Bacteria	N° Pocillo placa Elisa												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
E3	<i>S. pyogenes</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
E3	<i>S. aureus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

Como los resultados obtenidos con E3 fueron muy prometedores, se realizaron pruebas con los extractos E4 y E5, para corroborar los resultados obtenidos con E3. Además, se llevaron a cabo tratamientos control con agua oxigenada diluida al 10% y con agua oxigenada pura, para determinar si la actividad biológica está dada por que los extractos son elaborados con agua oxigenada o bien por los compuestos presentes en el polen apícola que son liberados al utilizar este tipo de solventes. Es importante destacar que el agua oxigenada es conocida por sus propiedades antisépticas, por lo que es importante determinar a qué se debe la actividad.

Los resultados de la mínima concentración inhibitoria (MCI) de los extractos E3 y E4, además de los resultados de los tratamientos control realizados con agua oxigenada diluida al 10% y de agua destilada pura, donde (-) indica que no hubo crecimiento bacteriano, mientras que (+) indica crecimiento bacteriano. Resultados de la evaluación a las 24 horas, en antibiogramas realizados en placas ELISA.

N° Extracto	Bacteria	N° Pucillo placa Elisa												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
E4	<i>S. pyogenes</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
E4	<i>S. aureus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
E5	<i>S. pyogenes</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
E5	<i>S. aureus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
Agua oxigenada (10%)	<i>S. pyogenes</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Agua oxigenada (10%)	<i>S. aureus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Agua oxigenada	<i>S. pyogenes</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
Agua oxigenada	<i>S. aureus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Al comparar los resultados obtenidos, E3, E4 y E5 arrojaron los mismos resultados cuando fueron probados contra *S. pyogenes*. Sin embargo, cuando los mismos extractos fueron probados contra *S. aureus*, sólo E4 y E5 arrojaron los mismos resultados, mientras que E3 mostró un menor grado de inhibición. Nuevamente ocurre que los extractos son más efectivos contra *S. pyogenes* que contra *S. aureus*, lo cual podría estar dado por la pared celular de cada bacteria evaluada.

Por otra parte, al realizar las pruebas con agua oxigenada diluida al 10% se buscaba que ésta tuviera la misma concentración de agua destilada que los extractos y que diera una menor actividad biológica que los extractos. Lo anterior se cumple a cabalidad, por lo que podría atribuirse el efecto antibacteriano a los compuestos presentes en el polen apícola más que a la actividad antiséptica del agua oxigenada. Sin embargo, al evaluar la actividad del agua oxigenada pura, se determinó que el grado de inhibición es aún mayor que el de los extractos elaborados.



Resumen de Análisis Palinológico, Microbiológico y Químico

Según las repeticiones realizadas, se puede decir que al igual que en años anteriores y coincidiendo con la literatura (Fonegra, G., 2007; Takahashi y otros, 2004), muestras que contaban con la presencia de *Eucalyptus sp.* presentaron un alto contenido de compuesto fenólicos y además presentaron algún nivel de actividad biológica sobre la bacteria *Streptococcus pyogenes* en la mayoría de los casos y, en algunas muestras, sobre *Staphylococcus aureus*.

Muestras que contenían *Tristerix tetandrus*, *Baccharis/Gnaphalium* y *Gutierrezia/Haplopappus*, se asociaron un mayor contenido de compuestos fenólicos y actividad biológica, junto con una baja capacidad antioxidante. Por otro lado al encontrarse de manera predominante parecieran no tener mayor actividad, por lo que sería el efecto conjunto el que estaría dando la capacidad de inhibir o destruir bacterias.

Del mismo modo, muestras que en su origen botánico se encontró *Azara celastrina* presentaron una mayor capacidad antioxidante, lo que se debe a que especies de este género presentan elevados contenidos de pigmentos, como licopeno y betacaroteno, en sus granos de polen. Debido a los anterior, muestras analizadas para evaluar el contenido de pigmentos, resultaron asociadas a una capacidad antioxidante más elevada.

Muestras que presentaron cierto contenido de *Quillaja saponaria*, a su vez evidenciaron una capacidad antioxidante más elevada, lo que se relaciona con el estudio de la capacidad antioxidante de tejidos de esta planta (Fidan y otros, 2009) y mieles monoflorales de esta especie (Montenegro, G. y otros 2009)

Si bien un alto contenido de compuestos fenólicos no se encuentra siempre asociado a la actividad biológica y/o capacidad antioxidante, si se encuentran inversamente relacionados, es decir, muestras que destacan por su mayor actividad antioxidante también se encuentran asociadas a un alto contenido de compuestos fenólicos y muestras que presentan actividad biológica también se encuentran asociadas a un elevado contenido de fenoles. Esto se condice con lo propuesto en la temporada pasada y que se vuelve a dar con las muestras del año 2011, lo que coincide con lo propuesto por Morais et al. (2011) y Silva et al. (2009).

Actividad de pólenes de especies nativas

A partir de la actividad microbiológica presentada por extractos de seis muestras completas de polen apícola de la temporada anterior, se seleccionaron aquellas que mostraron mayor actividad antibacteriana. Se separaron en sus especies constituyentes, a partir de las cuales se hicieron nuevos extractos en base al protocolo de adaptado de Rozema et al (2001). El extracto más efectivo fue el de la especie nativa *Escallonia pulverulenta*.

Valores de concentración mínima bactericida de extractos etanólicos. ¹Concentración mínima expresada en (mg de extracto/mL), ²Factor de dilución expresado en porcentaje (%)

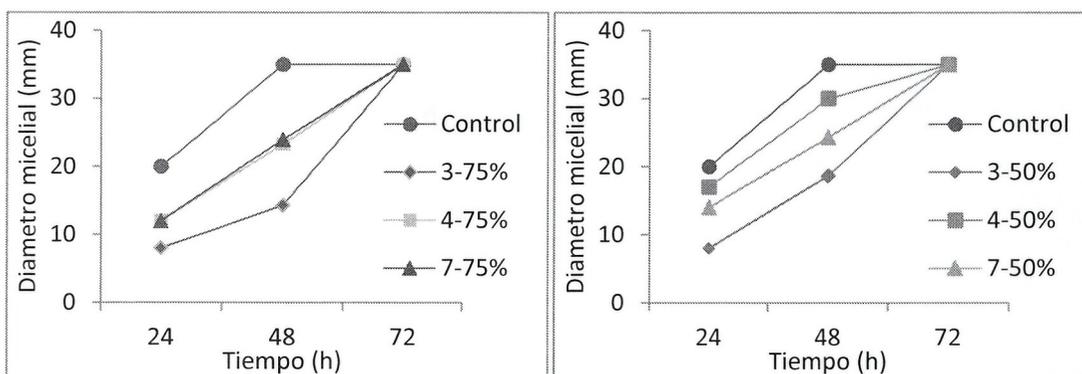
Origen Botánico	Concentración (mg extracto/mL)	Fenoles totales (mg /g)	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Pseudomona syringae</i>
Muestra completa 1	152,38	6,54	76,19 ¹ 50 ²	76,191 50 ²	38,10 ¹ 25 ²	76,19 ¹ 50 ²
<i>Brassica sp.</i>	138,43	23,46	-	-	69,215 ¹ 50 ²	69,22 ¹ 50 ²
<i>Escallonia pulverulenta</i>	184,18	5,33	92,09 ¹ 50 ²	-	92,09 ¹ 50 ²	92,09 ¹ 50 ²
<i>Prunus sp. y otras spp.</i>	161,57	2,90	-	-	80,79 ¹ 50 ²	-
Muestra completa	141,18	6,27	70,59 ¹ 50 ²	-	35,29 ¹ 25 ²	70,59 ¹ 50 ²
<i>Cryptocarya alba</i>	185,35	5,74	92,68 ¹ 50 ²	-	-	-
<i>Schinus sp. y otras spp.</i>	134,13	3,01	-	-	67,06 ¹ 50 ²	67,064 ¹ 50 ²

Al comparar los resultados obtenidos para la muestra completa con las submuestras separadas, se observa que existe un efecto de complementariedad entre las especies en la actividad antibacteriana. Para el patógeno *S. Typhi* ninguna de las submuestras presentó acción bactericida, sin embargo, sí hay actividad de la muestra completa. Probablemente las especies por separado son incapaces de suprimir al patógeno, pero esto es factible si actúan en conjunto. Otro ejemplo, se presenta para *E. carotovora*, en que las tres submuestras son bactericidas al 50%, y la muestra completa lo es al 25%, posiblemente debido a la suma de la acción bactericida de cada extracto, lo que disminuye la MCB para la muestra completa.

C. alba sólo tiene actividad contra la bacteria gram positiva *B. cereus*, y *Schinus sp. y otras spp.* es bactericida sobre las bacterias gram negativas *E. carotovora* y *P. syringae*. Al comparar la MCB de la muestra completa n°4 con sus submuestras, no se observa acción conjunta como en el caso de la muestra n° 3, porque las submuestras no actúan sobre los mismos patógenos. Por otra parte, en el control de *Pseudomona syringae* existe una diferencia de MCB entre la muestra completa y el extracto de *Schinus sp. y otras spp.*, lo que probablemente se debe a una menor concentración de este último.

Actividad Fungicida

Botrytis cinérea



Efecto antifúngico de extractos etanolicos de muestras 3, 4 y 7 al 50 y 75% de concentración v/v, sobre *Botrytis cinerea*

El tratamiento control creció rápidamente, completando la placa petri en dos días; los tratamientos con extracto lo hicieron en 3 días. Por lo tanto, los extractos no presentan actividad fungistática sobre *B.cinerea*, es decir, no hay inhibición absoluta del micelio del hongo, pero sí retrasan el crecimiento micelial en un día.

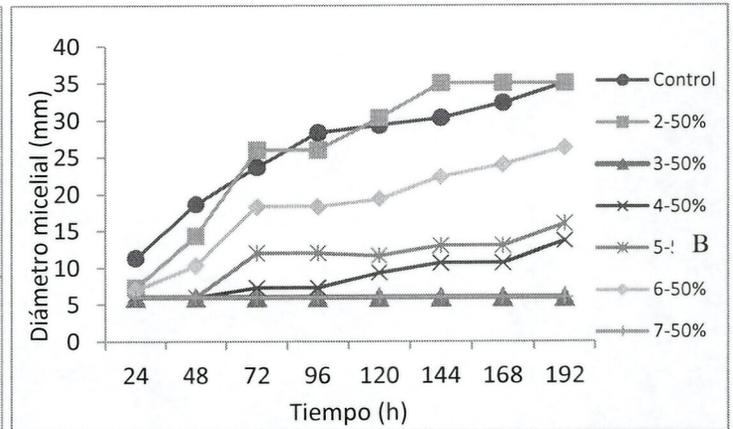
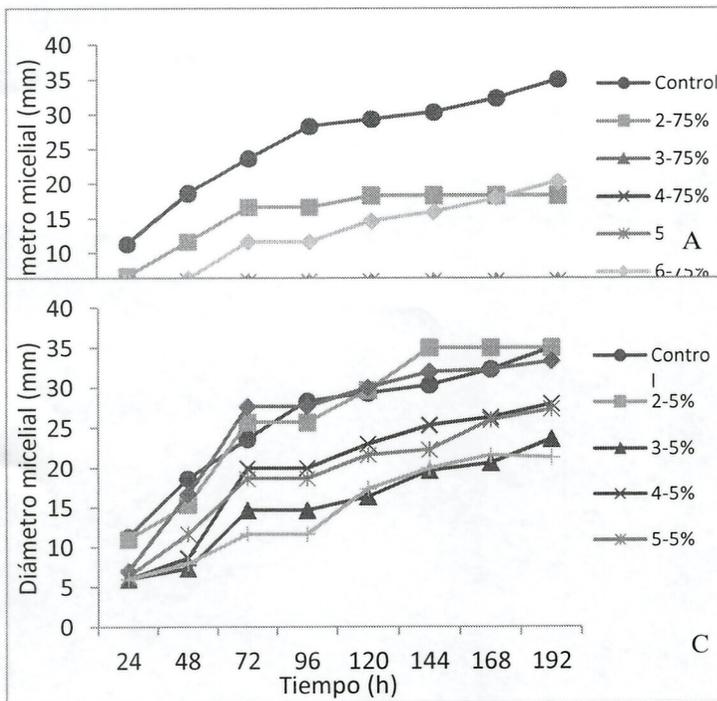
La reducida actividad que manifiestan los extractos sobre *B.cinerea* se puede deber a la naturaleza del hongo, pues es un organismo de difícil control, con una gran plasticidad genética, capaz de generar nuevas cepas resistentes a los fungicidas tradicionales (Daoubi, Durán-Patrón, Hmamouchi, Hernández-Galán, Benharref, & Collado, 2004) (WILLIAMSON, TUDZYNSKI, TUDZYNSKI, & VAN KAN, 2007). Con productos de origen natural, Montenegro et al. (2009) observa que el hongo requiere de mayores concentraciones de extractos fenólicos de mieles para inhibir su crecimiento micelial que *Alternaria alternata*.

El extracto n° 3 es el que presentó mayor efecto antifúngico, diferenciándose de forma significativa de los otros extractos, y registrando un porcentaje de inhibición promedio para los dos días de un 74,8%. Se observa una diferencia significativa entre las dosis 50 y 75% v/v al 2° día, aumentando su efecto a mayor dosis, por lo cual, se prevé que a mayores concentraciones sería más efectivo.

El comportamiento de los extractos n° 4 y 7 es idéntico a dosis altas (75% v/v), sin embargo, a dosis menores (50% v/v) el extracto n° 4 disminuye su efecto antifúngico. Es posible, que esto se deba a la similitud en el origen botánico de las muestras de polen. Ambos pólenes están constituidos en gran parte por la especie *C. alba*, la que contribuye en un 34,7% y un 62,6 % a las muestras n° 4 y 7, respectivamente. *C. alba* posee actividad biológica sobre hongos fitopatógenos (López, Apablaza, & Montenegro, 2010), por lo tanto, es posible que sea esta especie la que confiera parte de la capacidad de retardar el crecimiento micelial a estos extractos. A partir de esto, se deduce que la menor proporción de la especie en la muestra n° 4, reduce la cantidad de compuestos activos, disminuyendo su control a dosis menores. Al contrario, en la muestra n° 7, no se presenta diferencia significativa entre las dosis, probablemente porque a una cantidad determinada de compuestos activos el sistema se satura y no hay respuesta a un aumento de la concentración. También es preciso indicar que el extracto n°7 además de tener una mayor proporción de la especie de la cual se sospecha actividad, también presenta una mayor concentración de mg de extracto/mL, características que determinan una mayor efectividad que el extracto n° 4.

Alternaria solani

A. solani presentó un crecimiento más lento, completando la placa en un total de 8 días. Y los extractos exhibieron buenos efectos inhibitorios.



Efecto antifúngico de EPEs 2, 3, 4, 5, 6 y 7 sobre *Alternaria solani*, a dosis del 75 (A), 50 (B) y 5% (C) v/v. Diámetro micelial de 6 mm corresponde al disco de micelio inoculado.

Al observar el comportamiento de los extractos a través del tiempo y a distintas dosis, los más efectivos son los extractos n° 3, 4 y 7, con los mayores porcentajes de inhibición promedio del periodo completo y del 8° día. Los extractos n° 3 y 7 son los únicos que presentan actividad fungistática a dosis de 50% v/v, inhibiendo totalmente el crecimiento micelial del hongo. Asimismo, los extractos n° 4 y 5 presentan actividad fungistática, pero sólo a dosis de 75% v/v. A dosis considerablemente menores (5% v/v) los extractos 3, 4, 5 y 7 muestran actividad antifúngica, pero sólo retardando el crecimiento micelial.

Al contrario, los extractos 2 y 6, promueven el crecimiento del hongo a dosis bajas. El extracto 2, es el menos efectivo, estimulando el crecimiento micelial a dosis de 50 y 5 % v/v. Y el extracto 6 sólo genera este efecto en dosis de 5% v/v.

Actividad fungicida por especie

Para probar el efecto de cada especie sobre el crecimiento de los hongos, se seleccionaron las n° 3 y 4; que presentaron resultados positivos, y de las cuales había disponibilidad de polen corbicular, para realizar un ensayo sobre *A. solani* con extractos de polen de las especies que conforman estas muestras.

Adicionalmente, para determinar la mínima concentración inhibitoria (MCI) de los extractos n° 3 y 4 se realizaron ensayos a dosis menores. El extracto n° 3 se probó en las dosis 40, 30, 20 y 10% v/v, y el extracto n° 4 al 70,65, 60 y 55% v/v. No hubo actividad fungistática para ninguno de los tratamientos, por lo tanto, la MCI corresponde a la dosis con actividad fungistática en el ensayo anterior. Es decir, el extracto n° 3 presenta una MCI de 288,5 mg/mL a una dosis del 50% v/v, y el extracto n° 4 registra una MIC de 470,8 mg/mL a una dosis de 75% v/v.

Por otra parte, en las pruebas con extractos de especies se emplearon las mismas dosis a las que se obtuvo actividad fungistática en la muestra completa correspondiente, es decir, para los extractos de especies que conforman la muestra 3 se utilizó una dosis de 50% v/v y para los extractos de especies de la muestra 4 se empleó una dosis de 75% v/v.

El tratamiento control completó la placa petri en un tiempo menor a la prueba anterior, alcanzando 35 mm de diámetro sólo en 5 días. Probablemente, porque antes de cultivarlo durante 7 días, este se renovó constantemente a PDA nuevo, siendo quizás un hongo de hifas más jóvenes con un crecimiento más acelerado.



A diferencia de las muestras completas, los extractos de las submuestras no generaron una inhibición absoluta del micelio del hongo, sin embargo, retardaron su crecimiento.

Algunas especies presentaron mejor actividad antifúngica que otras. De los extractos elaborados a partir de la muestra de polen n°3, el extracto de la especie endémica *E.pulverulenta* mostro mayor actividad, con un 65,8% de inhibición promedio para los 8 días, siendo la única que inhibió al hongo al octavo día, con un 27,6% de inhibición. El extracto de *Brassica sp.* no muestra diferencias significativas con el extracto de *Escallonia* hasta el tercer día, sin embargo, a partir del cuarto día su efecto comienza a decaer, diferenciándose, y apareciendo sin efectos de control al 8° día. El extracto de *Prunus sp.* y otras spp. es el menos efectivo, con un 40,3% de inhibición promedio para el periodo total, y sin inhibición al 8° día.

Los extractos de la muestra de polen n° 4, de las especies endémicas *C. alba* y *Schinus sp.* y otras spp. no presentan diferencias significativas a lo largo de todo el periodo de medición, sin embargo, el extracto de *C. alba* posee un efecto antifúngico levemente mayor con un 65,6% de inhibición promedio para los 8 días en contraste al 61,8%. del extracto de *Schinus spp.*

Las especies nativas fueron las que presentaron mayor efecto antifúngico. Además es preciso añadir que estas especies tienen un efecto de inhibición más duradero, pues ejercieron inhibición en el hongo hasta el día doce, a diferencia de los extracto *Brassica sp.* y *Prunus sp.*

La MCI de la muestra completa n° 3 es de 288,46 mg/mL, y las concentraciones de los extractos 3.1, 3.2, y 3.3 en la placa petri al 50% v/v son 208,48, 277,385 y 243,33, respectivamente. La muestra completa n° 4 tiene una MCI de 470,8 mg de extracto/mL, y las concentraciones de los extractos 4.1 y 4.2 en la placa petri al 75% v/v son 425 y 303 mg/mL, respectivamente. Si bien las concentraciones de los extractos de especies son menores a la de la muestra completa, esta diferencia es muy pequeña en la mayoría de los casos. Por lo tanto, la menor eficacia de los extractos de especies, no se debería a la concentración de los tratamientos, sino que a la ausencia del efecto complementario de las especies, que se presento igualmente en las pruebas antibacterianas; se indica complementariedad, pues no hay certeza de un efecto sinérgico entre los compuestos de las especies.

Al respecto, una investigación en actividad antibacteriana registra sinergia entre flavonoides (Arima et. al, 2002 citado en Cushnie & Lamb, 2005) y varios estudios demuestran sinergia entre flavonoides y otros agentes antibacterianos (Hamilton-Milller & Shas.S, 2000 y Stapleton et. al, 2004 citados en Cushnie & Lamb, 2005). Asimismo, el efecto se da entre varias combinaciones de flavonas y flavonoides contra virus. Por ejemplo, el kaempferol y la luteolina muestran sinergia contra el virus HSV (Cushnie & Lamb, 2005).

En productos apícolas también se ha documentado este efecto; se han intentado aislar los compuestos activos presentes en el propóleo, sin embargo, las investigaciones concluyen que es el efecto sinérgico de sus componentes el más efectivo (Amoros et. al, 1992 citado en Cushnie & Lamb, 2005). Estudios con aceites esenciales, reafirman que al parecer los efectos antifúngicos y antimicrobianos son el resultado de la acción sinérgica de muchos compuestos. Lo que representa una ventaja en el control de hongos y microorganismos, pues la probabilidad de que se desarrollen cepas resistentes es mínima (Bagamboula et al.2004, citado en Feng & Zheng, 2007).

Prueba fungicida/fungistático

Al octavo día, los tratamientos que exhibieron inhibición absoluta de crecimiento micelial, se sometieron a la prueba fungicida/fungistático. Los extractos con efecto fungicida son el n° 3 a dosis de 50 y 75% v/v y el extracto n° 7 al 75% v/v. El resto de los tratamientos sólo posee actividad fungistática, pues el hongo reanudo su crecimiento.

Discos de papel de filtro esterilizado.

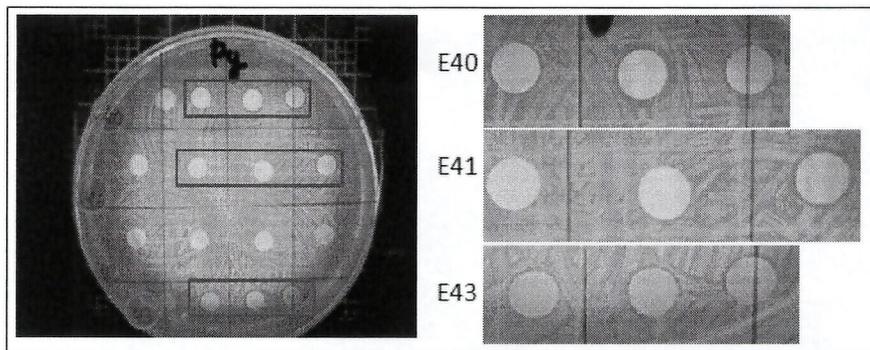
Los resultados de la prueba complementaria de la actividad antibacteriana de los extractos de polen revelan que solamente se vio halo de inhibición del crecimiento de bacteria para *S. pyogenes*, coincidiendo con el experimento anterior, ya que fue para la bacteria donde se encontraron los mejores resultados. Los halos de inhibición no fueron muy representativos, por eso se optó por utilizar esta prueba para la ayuda en la elección de los extractos fenólicos a los que se estudiará el origen botánico, sin valorarla como una prueba representativa en el proyecto.

En las fotografías se percibe que además simplemente se encontró actividad con los extractos provenientes de las muestras:

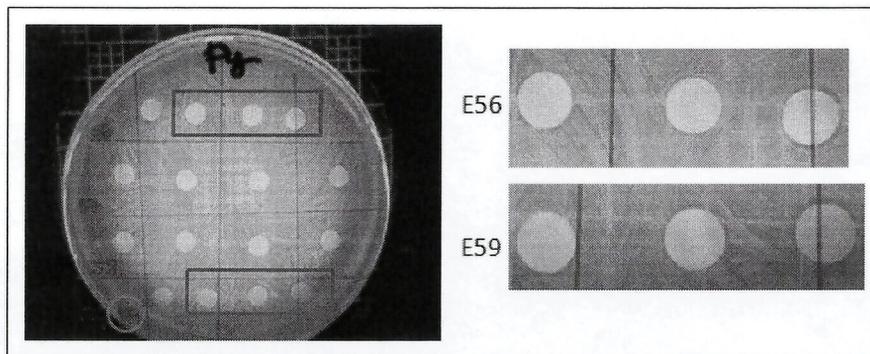
- Pec2150111TilTil12c11
- Pec2150111TilTil12c12
- Pec2150111TilTil12c18
- Pec2120211TilTil13c12
- Pec2120211TilTil13c137

Esto podría explicarse por el alto volumen de bacteria utilizado en comparación con el volumen de extracto (100 µL: 5 µL) dado que los discos de filtro deberían haber sido más anchos para poder emplear mayor volumen de extracto.

Por eso se piensa que son los extractos con mayor actividad los que han reflejado halo de inhibición. En comparación con los valores obtenidos en el análisis MCB se correlaciona los resultados hallados para el extracto Pec2150111TiITil12c11, donde en ambos casos se percibe como el extracto con mayor actividad bactericida. Aunque se esperaban resultados para las muestras Pec2150111TiITil12c16, Pec2150111TiITil12c37, Pec2300111TiITil12c12.

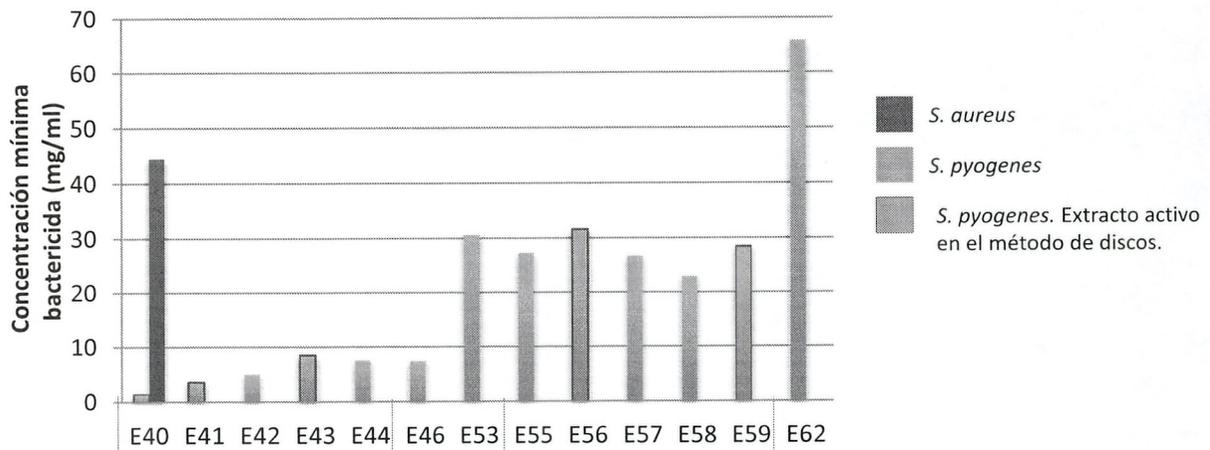


Resultados de halo de inhibición en el crecimiento de bacterias *in vitro* debido a la acción antimicrobiana de extractos de muestras: Pec2150111TiITil12c11, Pec2150111TiITil12c12 y Pec2150111TiITil12c18



Resultados de halo de inhibición en el crecimiento de bacterias *in vitro* debido a la acción antimicrobiana de extractos muestras: Pec2120211TiITil13c12 y Pec2120211TiITil13c37.

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos en el análisis antimicrobiano de los extractos de polen apícola que dieron actividad bactericida.



Resultados de actividad antibacteriana de extractos de polen corbicular para las muestras Pec2150111TiITil12c11, c12, c16, c18 y c37 (E40, E41, E42, E43 y E44), Pec2300111TiITil12c12 (E46), Pec2050211TiITil12c18 (E53), Pec2120211TiITil13c11, c12, c16, c18 y c37 (E55, E56, E57, E58 y E59) y Pec2190211TiITil12c16 (E62)

Basim et al (2006) investigaron por primera vez la actividad antibacteriana del polen y el propóleo frente a bacterias patógenas de plantas, y demostraron que extractos de polen de Turquía tenían efectos contra el crecimiento de trece microorganismos que causan diversas enfermedades en frutas y vegetales. Expresa que el efecto antibacteriano del polen apícola es específico para cada especie de microorganismo utilizado, conclusión que concuerda con los resultados obtenidos, donde los extractos estudiados tienen actividad contra *S.pyogenes* y sólo el extracto Pec2150111TiITil12c11 contra *S.aureus*, y no se han tenido resultados para las otras dos bacterias estudiadas. Esto puede tener su explicación en la naturaleza de las bacterias, siendo tanto *S.pyogenes* como *S.aureus* bacterias Gram-positivas; y por el contrario *E.coli* y *P. aeruginosa* son bacterias Gram-negativas que a pesar de que tienen una pared celular más fina tiene una composición química más compleja. Los mismos resultados fueron alcanzados por Moris et al. (2011).

Evaluando los datos obtenidos con los ensayos de análisis antimicrobiano se seleccionaron para el análisis de origen botánico los 5 extractos colectados el 15 de enero de 2011 (Pec2150111TiITil12c11, c12, c16, c18 y c37) y los 5 colectados el 12 de febrero de 2011 (Pec2150111TiITil12c11, c12, c16, c18 y c37), dado a que son los dos grupos que presentaron mejor actividad antibacteriana en conjunto, sin presentar resultados contaminados y de los que se obtuvo valores en la prueba antibacteriana de discos esterilizados.



Observando además que la actividad antibacteriana de cada uno de los grupos tiene diferencias significativas, siendo menor la concentración necesaria de los extractos del grupo uno para tener efectos inhibitorios sobre las bacterias, que de los del segundo grupo.

La actividad antimicrobiana del polen depende de su composición química que está directamente relacionada con del origen botánico del mismo (Kroyer, 2001; Morais 2011). Se esperan similitudes en los orígenes botánicos de los extractos colectados en la misma fecha, ya que éstos varían en función de la época de floración de las especies vegetales, así podríamos explicar las diferencias encontradas en cuanto a propiedades antimicrobianas de cada uno de los grupos seleccionados. A partir de los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de polen, se vio oportuno calcular la cantidad de polen apícola activo que podríamos llegar a obtener con un kilogramo de polen corbicular, dato importante a la hora de querer comercializar los extractos de polen apícola. Se determinó que podrían llegar a conseguir entre 2,398 y 76,90 litros de extracto activo en condiciones *in vitro*.

Perfil Aromático

Los compuestos terpénicos presentes en el extracto 3.2 (*E. pulverulenta*) corresponden a Linalool y Timol, con concentraciones de 12 $\mu\text{g/L}$ y 36 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Ambos terpenos tienen propiedades antibacterianas y antifúngicas (Pattnaik, Subramanyam, Bapaji, & Kole, 1997; Feng & Zheng, 2007; Trombetta, y otros, 2005). Asimismo el análisis detectó otros compuestos con estas propiedades: ácido acético (131 $\mu\text{g/L}$); ácido propanoico (25 $\mu\text{g/L}$); 2-metil-1-butanol (28 $\mu\text{g/L}$); alcohol bencílico (21 $\mu\text{g/L}$); 2-fenil etanol (62 $\mu\text{g/L}$); benzaldehído (22 $\mu\text{g/L}$); furfural (128 $\mu\text{g/L}$) y dimetil disulfuro (24 $\mu\text{g/L}$).

Compuestos fenólicos presentes en extractos de polen corbicular de las especies *E. pulverulenta* y *C. alba* medidos con HPLC.

Compuesto	Concentración (mg /100g muestra)	
	Extracto 3.1 (<i>E. pulverulenta</i>)	Extracto 4.1 (<i>C. alba</i>)
Acido gálico	0.64	92.36
Acido abscísico	0.46	0.39
Acido elágico		1.03
Acido p-coumárico	0.98	
Derivado de Acido benzoico		2.16
3-4 Hidroxi Benzoico (Acido Protocatequico)	1.92	0.82
2-4 Hidroxi Benzoico (Acido b-Resorcílico)	1.08	0.63
Hidroximetil Furfural	1.24	0.63
Derivados de Catequina	223.96	57.42
Catequina	2.01	1.93
Epicatequina	4.22	2.58
Rutina		18.55
Derivado de Quercetina		2.92
Derivado de Miricetina		0.61
Derivados de Kaempferol		1.70
Quercetina	0.41	3.41
Miricetina		42.84
Kaempferol	0.57	2.12

* Los derivados de Catequina pueden ser Galocatequina, Epigalocatequina, Epicatequin galato y Epigalocatequin galato.

La mayoría de los compuestos determinados se encuentran frecuentemente en el polen apícola, sin embargo, las catequinas, flavonoides pertenecientes al grupo de los flavanoles, son compuestos poco comunes en el polen corbicular, y se presentaron en altas concentraciones en ambos extractos. Estos compuestos son poderosos antioxidantes (Lotitoa & Fraga, 1998), con propiedades antibacterianas y antifúngicas; al igual que sus derivados (Veluri, Weir, Pal Bais, Stermitz, & Vivanco, 2004)



La hierba europea *Centaurea maculosa*, es reconocida por producir catequinas, las que exuda a través de sus raíces, generando efectos alelopáticos antibacterianos y herbicidas (Broz, Vivanco, Schultz, Perry, & Paschke, 2006). Así mismo, son uno de los principales flavonoides presentes en el té, con el cual se han llevado a cabo diversos estudios para elucidar su capacidad antimicrobiana y antifúngica. Wilmot (2006) probó que las catequinas en las hojas de te generan inhibición del crecimiento micelial del hongo *A. solani*, y Tao et. al (2010) demuestran el mismo efecto antifúngico de estas sobre el hongo *B. cinerea*.

Las catequinas también están presentes en el fruto inmaduro de la frutilla, el cual es resistente al ataque del hongo *B.cinerea* debido la presencia de estos compuestos. La infección ocurre durante la floración, sin embargo, la enfermedad se manifiesta sólo cuando el fruto esta rojo maduro, momento en que la concentración de catequinas desciende. Así, variedades de frutilla con mayores concentraciones de estos compuestos son más resistentes al ataque de este patógeno (Puhl & Treutter, 2008).

En el extracto de Corontillo (*E. pulverulenta*), predominan derivados de catequina y epicatequina. En cambio el extracto de Peumo (*C.alba*) consta de otros compuestos en altas concentraciones, que son el ácido gálico, la miricetina y la rutina. La miricetina y la rutina se clasificaron como compuestos frecuentes en el polen apícola (Tabla n° 2), y ambos poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas, al igual que el ácido gálico (Chanwitheesuk, Teerawutgulrag, Kilburn, & Rakariyatham, 2007); que se presenta en el polen corbicular con una menor frecuencia.

A partir del conocimiento de los compuestos que conforman los extractos de polen, y de sus propiedades, es posible predecir cuales estarían implicados en los efectos antibacterianos y antifúngicos.

En cuanto a la capacidad antibacteriana, los mejores resultados se obtuvieron con el extracto n° 3.2, que suprimió a tres de las bacterias patógenas, en cambio, el extracto n° 4.1 sólo fue eficaz sobre la bacteria *B. cereus*. Al observar la composición, el extracto 3.2 se diferencia del 4.1, en que este posee una menor diversidad de compuestos, y la concentración de derivados de catequina y epicatequina es bastante mayor. Por lo tanto, se podría asociar su capacidad antibacteriana a la presencia de derivados de catequina y epicatequina.

Con respecto a la capacidad antifúngica, sobre *B. cinerea* se obtuvieron mejores resultados con el extracto n° 3 (24% *E. pulverulenta*), que con los extractos n° 4 y 7 (35 y 63% *C. alba*, respectivamente), lo que podría deberse a la susceptibilidad de este patógeno a las catequinas presentes en el polen de Corontillo. Por otra parte, *A. solani* se ve afectado de manera similar por los extractos 3.2 y 4.1, de lo cual se deduce que este hongo fitopatógeno no se ve afectado de la misma manera por las catequinas, y que están implicados otros compuestos en la actividad antifúngica.



Evaluaciones de toxicidad

Estos análisis se realizaron con Salimax, Laboratorio de la Universidad de Chile, y arrojaron los siguientes resultados:

Capacidad desinfectante: El producto redujo en un 99.99% el número inicial de bacterias de *E. coli*, en 30 segundos, cumpliendo como desinfectante de acuerdo al método AOAC 960.09.

Índice de Neutralización Orgánica. El producto cumple como desinfectante al ser usado de forma directa

Test de Hipoalergenicidad: No se observaron reacciones alérgicas, por lo tanto el producto Extracto de Polen es hipoalergénico.

Test de toxicidad inhalatoria:

La mortalidad fue de un 0% a la dosis de 5 mg/L aire/hora durante 4 horas.

Nivel de dosis mg/L de aire/hora	Mortalidad			Tiempo de Muerte
	Machos Muertos/Total	Hembras Muertas/Total	Sexos Combinados Muertos/Total	
5 durante 4 horas	0/5	0/5	0/10	---
Cálculo experimental $CL_{50} > 5$ mg/L de aire/hora durante 4 horas				

Durante el periodo de estudio, se observaron signos tales como secreción nasal y epistaxis de carácter leve al segundo día del estudio, situación que revirtió al tercer día del período de observación en el grupo de animales dosificados con 5 mg/L aire/hora durante 4 horas de EXTRACTO DE POLEN por vía inhalatoria durante el período de observación. Finalmente, esta dosificación provocó la mortalidad del 0% de los animales en el estudio (0/10).

Todos los animales del estudio administrados con 5 mg/L de aire/hora, durante 4 horas con la sustancia de prueba sobrevivieron al período de observación aumentaron de peso durante el desarrollo del estudio. Esta variación promedió un 6,6% en los machos y de un 2,3% en las hembras al finalizar el período de observación.

Los exámenes macroscópicos post-mortem de los animales dosificados con la sustancia de prueba revelaron congestión hepática de carácter leve a moderado.

El análisis histopatológico reveló que la muestra de hígado presentó hiperemia moderada en zona centrolobulillar (Z3) y zona portal (Z1), con leve a intensa tumefacción de hepatocitos de la región centrolobulillar (Z3). Muestra de pulmón presentó moderada congestión, sin cambios inflamatorios histopatológicos. Bazo presentó hiperemia moderada sin otros cambios vasculares, degenerativos ni inflamatorios. Finalmente la muestra de riñón presentó moderada congestión cortical, con intensa tumefacción del epitelio tubular, sin lesiones inflamatorias intersticiales ni del mesangio glomerular.

Test de toxicidad oral

Niveles de dosis y mortalidad.

Nivel de Dosis mg/Kg	Hembras Muertos/Total	Tiempo de Muerte
2000 (1)	0/3	-----
2000 (2)	0/3	-----

(1) y (2) Corresponden a la administración del Paso 1 y Paso 2 respectivamente.

En los animales administrados con la dosis de 2000 mg/Kg por vía oral del grupo de animales del primer paso (1), se pudo observar la mortalidad del 0%. En este grupo de animales no se pudo apreciar sintomatología asociada al producto durante el período de observación. Los animales dosificados con 2000 mg/Kg (2), presentaron una mortalidad del 0%. En este grupo tampoco se observaron signos asociados a la administración del producto durante el período de observación.

El primer grupo de los animales administrados con la sustancia de prueba a la dosis de 2000 mg/Kg.

(1) aumentaron de peso en un promedio de 8,7%, En el segundo grupo dosificado con 2000 mg/Kg

(2) también se pudo apreciar un aumento de peso durante el período de observación del estudio el que promedió un 6,6%.

En los animales dosificados con 2000 mg/Kg (1), se observó congestión hepática de carácter leve a moderado y la presencia de focos hemorrágicos en pulmón de grado leve a moderado. Para los animales dosificados con 2000 mg/Kg (2), en un animal se observó congestión pulmonar de carácter leve a moderado y congestión esplénica de grado leve.

El análisis histopatológico de los tejidos de los animales dosificados con 2000 mg/Kg de producto reveló que, la muestra de pulmón presentó intensa congestión, con amplios focos de hemorragia pulmonar. La muestra de hígado presentó congestión moderada a intensa en zona centrolobulillar (Z3) y zona portal (Z1), con tumefacción intensa de los hepatocitos, sin cambios inflamatorios asociados. La muestra de bazo presentó intensa congestión sin cambios inflamatorios asociados. Finalmente, la muestra de riñón presentó moderada congestión cortical con intensa tumefacción del peitelio tubular, sin lesiones intersticiales ni del mesangio glomerular.

Test de toxicidad dérmica

Nivel de dosis y mortalidad.

Nivel de dosis mg/Kg	Mortalidad			Tiempo de muerte
	Machos Muertos/Total	Hembras Muertas/Total	Sexos Combinados Muertos/Total	
2000	0/5	0/5	0/10	---

Cálculo experimental DL₅₀: > 2000 mg/Kg

Los animales expuestos, por vía dérmica, a la dosis de 2000 mg/Kg de EXTRACTO DE POLEN, presentaron signos clínicos asociados a la administración del producto tal como poliuria de carácter leve al cuarto día. Esta situación revirtió al quinto día del período de observación. A nivel de la piel rasurada no se observaron reacciones cutáneas asociadas a la administración del producto EXTRACTO DE POLEN observación.

Los animales administrados con 2000 mg/Kg de la sustancia de prueba aumentaron de peso durante el período de observación. Los machos en un promedio de un 18,2%, y las hembras en un promedio de un 4,6%.

Una vez terminado el ensayo, los animales dosificados con 2000 mg/Kg, fueron sometidos a exámenes macroscópicos post-mortem los cuales revelaron alteraciones macroscópicas, tales como congestión hepática de grado leve a severo, congestión pulmonar de carácter leve a moderado y focos de hemorragia pulmonar de carácter leve a severo.

El análisis histopatológico reveló que la muestra de hígado presentó hiperemia intensa en zona centrolobulillar (Z3) y zona portal (Z1), con leve tumefacción de hepatocitos. Muestra de pulmón presentó intensa hiperemia, con focos de microhemorragia, sin cambios histopatológicos. Bazo presentó hiperemia intensa, sin otros cambios vasculares, degenerativos ni inflamatorios. Riñón presentó intensa hiperemia cortical, con leve tumefacción del epitelio tubular, sin lesiones inflamatorias intersticiales ni del mesangio glomerular.

Test de Toxicidad Oral

Niveles de dosis y mortalidad

Nivel de Dosis mg/Kg	Hembras Muertos/Total	Tiempo de Muerte
2000 (1)	0/3	-----
2000 (2)	0/3	-----

(1) y (2) Corresponden a la administración del Paso 1 y Paso 2 respectivamente.

En los animales administrados con la dosis de 2000 mg/Kg por vía oral del grupo de animales del primer paso (1), se pudo observar la mortalidad del 0%. En este grupo de animales no se pudo apreciar sintomatología asociada al producto durante el período de observación. Los animales dosificados con 2000 mg/Kg (2), presentaron una mortalidad del 0%. En este grupo tampoco se observaron signos asociados a la administración del producto durante el período de observación.

El primer grupo de los animales administrados con la sustancia de prueba a la dosis de 2000 mg/Kg

(1) aumentaron de peso en un promedio de 8,7%, En el segundo grupo dosificado con 2000 mg/Kg

(2) también se pudo apreciar un aumento de peso durante el período de observación del estudio el que promedió un 6,6%.

En los animales dosificados con 2000 mg/Kg (1), se observó congestión hepática de carácter leve a moderado y la presencia de focos hemorrágicos en pulmón de grado leve a moderado. Para los animales dosificados con 2000 mg/Kg (2), en un animal se observó congestión pulmonar de carácter leve a moderado y congestión esplénica de grado leve.

El análisis histopatológico de los tejidos de los animales dosificados con 2000 mg/Kg de producto reveló que, la muestra de pulmón presentó intensa congestión, con amplios focos de hemorragia pulmonar. La muestra de hígado presentó congestión moderada a intensa en zona centrolobulillar (Z3) y zona portal (Z1), con tumefacción intensa de los hepatocitos, sin cambios inflamatorios asociados. La muestra de bazo presentó intensa congestión sin cambios inflamatorios asociados. Finalmente, la muestra de riñón presentó moderada congestión cortical con intensa tumefacción del peitelio tubular, sin lesiones intersticiales ni del mesangio glomerular.



Test de Sensibilidad Cutánea

Durante el periodo de Challenge no se observó sensibilización a la sustancia aplicada en los animales pertenecientes al estudio (0/20). Los animales no presentaron reacción de ningún tipo en la instancia del Challenge. Consecuentemente, el porcentaje de animales sensibilizados por el extracto de polen fue del 0% del total de animales dosificados (ver tabla 3: Evaluación Clínica de las Reacciones de Sensibilización Cutánea). Los controles positivos presentaron eritema en los sitios de inducción grado 1. En los animales expuestos por vía dérmica al extracto de polen no se presentaron signos clínicos de toxicidad sistémica. Los Sistemas: Nervioso, Respiratorio, Digestivo, Cardiovascular, Hematopoyético, Glandular y Urogenital se encontraron normales.

Todos los animales expuestos a la sensibilización con extracto de polen fueron sometidos a inspecciones semanales de peso. Los machos del estudio aumentaron de peso durante este período en un promedio de 6,8%, mientras que las hembras en este mismo período aumentaron de peso en un promedio de 4,6%.

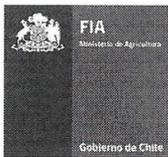
Test de Irritación Ocular

El extracto de polen causó daño en los ojos de los animales tratados. Se observaron signos de congestión e inflamación conjuntival de carácter leve a moderado en los tres animales del estudio, situación que comenzó a la hora de administración del producto y que revirtió completamente el día 12 del estudio. También se pudo apreciar la presencia de secreción ocular en este estudio desde el día 4 hasta el día 11 del período de observación.

En córnea se pudo observar opacidad de grado leve con un área involucrada de menos de la cuarta parte de la córnea, situación que se observó desde el cuarto día y se mantuvo durante el resto del período de observación. En Iris no se observaron signos clínicos asociados a la aplicación del producto extracto de polen. Por lo tanto, se observaron signos de irritación ocular asociados a la administración del extracto de polen. A partir de los Grados Promedio de Irritación Ocular obtenida durante las primeras horas de observación, se estimó que el Grado Promedio Máximo de Irritación Ocular Primaria del extracto de polen es de 8.00.

Test de Irritación Dérmica

Por otra parte, el 33% de los animales que fueron expuestos por vía ocular al extracto de polen aumentaron de peso durante el período de observación. El 66% restante disminuyó de peso durante el mismo período. El promedio de la variación de peso que presentaron los animales del estudio fue de un - 0,7% al finalizar el período de observación.



Evaluaciones sensoriales

Se realizaron test de aceptabilidad de yogurt y leche con aplicaciones de polen y extracto de polen. En el ensayo con yogurt, demostró que el producto tiene una aceptabilidad adecuada, el porcentaje de evaluaciones que se encuentran sobre nota 5 (nota mínima para la aceptación del producto). En el ensayo de la leche, el valor promedio de 7,2 que significa que el producto tiene una buena aceptabilidad.

Elaboración de la Norma de Diferenciación de Polen

En el marco del proyecto el equipo realizó en coordinación con el Instituto Nacional de Normalización (INN) las especificaciones técnicas de la Norma de Producción y Diferenciación de Polen apícola o Polen de Abeja según sus propiedades o atributos. En Chile a la fecha no había (y aún no hay) ningún avance o Norma al respecto, esta es la primera en esta materia.

Cabe destacar que el INN es organismo que tiene a su cargo el estudio y preparación de las normas técnicas a nivel nacional, miembro de la INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) y de la COMISION PANAMERICANA DE NORMAS TECNICAS (COPANT), representando a Chile ante esos organismos.

Esta Norma permite constatar y oficializar que Chile tiene un gran potencial de diferenciación de los productos apícolas, en este caso específico del Polen, según su origen botánico, siendo indispensable dar el siguiente paso que es la validación de estos sistemas de diferenciación y caracterización de productos apícolas (en este caso polen), como ya se hizo con la miel, dado que la diferenciación es parte de la estrategia del MINAGRI para sustentar el desarrollo de nuestra oferta exportable.

El equipo del proyecto dirigido por la profesora Gloria Montenegro y en el que participó activamente la Entomóloga Patricia Estay, formaron una comisión de estudio de las especificaciones técnicas que dieron origen al Anteproyecto de Norma aprobado en marzo/2011 por el INN, y que fue oficializado como Norma INN en abril/2012 con el título de NCh3255 "Producción y diferenciación de polen apícola".

Como toda Norma, ha sido fundamental la difusión y socialización de esta Norma debido a que implica grandes beneficios para el país en tanto genera nuevas oportunidades de diferenciación del polen para exportarlo según sus atributos.



Adicionalmente a esta Norma se le incorporaron las pautas técnicas para la producción de polen, a objeto de enriquecer la Norma en cuanto a las pautas para la producción de polen y también para su uso en el proceso de polinización.

Esto último es de valor estratégico para la hortofruticultura que requiere de la actividad de la colmena, sin embargo, el sistematizar estos pautas técnicas, también podría considerar el aumento de los costos de polinización, y/o de la producción de polen para su comercialización en forma diferenciada, lo que ha despertado controversia en algunos apicultores y de allí la necesidad de difundirla en forma presencial y directa, para que entiendan y apliquen en su correcta dimensión los alcances de la Norma 3255.

Por último, se debe destacar que esta Norma busca privilegiar el beneficio país, y no el de un eslabón en particular de la cadena apícola. Además, se debe hacer énfasis en que como toda Norma INN, es de carácter voluntario.

- **Cuadro comparativo de los resultados esperados en la propuesta de proyecto y los alcanzados finalmente.**

Resultado o producto		Descripción	Cumplimiento	Nº del objetivo
Nº	Nombre			
1	Caracterizar el origen botánico del polen de abejas.	Se realizó la caracterización del origen botánico del polen de abejas proveniente de Apiarios asociados en áreas de vegetación nativa, a lo largo de las temporadas apícolas que duró el proyecto.	Si	1
2	Establecer las propiedades del polen apícola chileno.	Establecimiento de las propiedades del polen apícola chileno, por su nutritivo y de pigmentos carotenoides, especialmente en las corbículas de colores amarillos, anaranjados y rojos, según su origen botánico.	Si	1
3	Caracterizar las propiedades del polen apícola chileno.	Se caracterizaron las propiedades antioxidantes, antifúngicas y antibacteriales del polen apícola chileno, según su origen botánico.	Si	1
4	Desarrollar tecnologías de diferenciación de pólenes.	Se desarrollaron tecnologías de diferenciación de pólenes según zonas y especie en polinización que viabilizan nuevos usos del polen en la industria.	Si	2
5	Implementación de protocolos y normas técnicas específicas para la producción de polen	Implementación de protocolos y normas técnicas (INN) específicas para la producción de polen alta calidad en función de la demanda de la industria alimentaria nacional.	Si	3
6	Red de Productores de polen diferenciado.	A través de actividades de difusión (Talleres y charlas) se dio el impulso para que los apicultores acojan las normas y protocolos de producción de polen diferenciado.	Si	4
7	Potencial de negocios de los pólenes diferenciados.	Se generaron herramientas (resultados de evaluaciones de propiedades de polen) que sustentarán nuevos negocios a partir de los pólenes diferenciados.	Si	3
8	Generación de capacidades en apicultores.	Los Talleres y charlas han permitido generar capacidades en apicultores, para la producción de pólenes diferenciados de alto valor comercial.	Si	4

- Razones que explican las discrepancias entre los resultados esperados y los obtenidos.

No aplica al proyecto FIA PYT2009-0118, porque no hay diferencias.

5. Fichas Técnicas y Análisis Económico:

- Fichas técnicas y de costos del o los cultivos, rubros, especies animales o tecnologías que se desarrolló en el proyecto (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).

No aplica al proyecto FIA PYT2009-0118

- **Análisis económico y de las perspectivas del rubro, después de finalizado el proyecto**

La miel y el polen en su estado natural han sido por mucho tiempo utilizados para mantener una buena salud, además del reconocido empleo terapéutico de los productos apícolas, otorgándole perspectivas favorables en los mercados y en los precios, junto con las condiciones intrínsecas de nuestro país.

En Chile, la comercialización de los productos apícolas es a granel, por lo que se requiere de una amplia difusión de las diferentes propiedades de los productos de la colmena para interesar a apicultores y empresarios a incorporar innovaciones en productos y/o en estrategias de diferenciación y/o en el desarrollo de nuevos productos tales como extractos de miel y polen. Se considera necesario poner especial énfasis en la diferenciación de los productos como una vía para lograr insertarlos en cadenas productivas que capturen el valor agregado de la certificación de sus atributos, propiedades e inocuidad (presencia de residuos y/o de polen de OGM) en el mercado nacional o internacional.

El destino de las mieles y polenes diferenciados serán nichos específicos en el extranjero, que se deberán contactar mediante el envío de muestras.

El mercado para los extractos apícolas con propiedades específicas (biológicas, antioxidantes, pigmentos) se orientará a empresas agroalimentarias actualmente demandantes de aditivos naturales.

Los resultados de este proyecto permitirán destacar el potencial de extractos de polen para aplicaciones en salud y alimentación humana, y al mismo tiempo permitir la generación de nuevos productos tecnológicos y productivos para el mercado internacional.

Los principales elementos a destacar del problema/oportunidad del proyecto son:

- ✓ El mercado es cada vez más restrictivo y más competitivo, es fundamental sentar bases sólidas para diferenciar los productos apícolas.
- ✓ Diferenciación es unir el conocimiento científico-tecnológico con la innovación, el emprendimiento y el acceso al mercado. Se agrega valor cuando se innova en la presentación de un producto, o cuando se certifican sus atributos y/o propiedades, o cuando se desarrollan nuevos productos a partir de la materia prima apícola existente.



- ✓ Diferenciación es agregar valor al “producto apícola” miel, polen y propóleo.

- ✓ Hay capacidades en el grupo que presenta este proyecto, para lograr buenos resultados de impacto inmediato y de asegurar la adopción de las innovaciones propuestas, mediante un trabajo directo y conjunto con los apicultores.

- ✓ Tendencia en los mercados de exportación de una demanda creciente por productos diferenciados, y en lo posible naturales y con identidad país.

- ✓ Se optimiza el uso de nuestros recursos naturales si se agrega valor, ya sea diferenciando los productos apícolas o creando nuevos productos a partir de miel, polen y propóleo.

El análisis económico del proyecto confirma que se puede generar un incremento del valor del polen al exportarlo certificado según sus propiedades. El kilo de polen a granel se vende como alimento para polinizadores (Bombus) principalmente, a un valor promedio de \$2.000/kg, el que aplicando la certificación propuesta, según el origen botánico del polen comercializado y por ende, sus propiedades, podría alcanzar precios de hasta el doble o cuádruple del valor indicado.

Precisamente en las condiciones actuales de la apicultora en que la presencia de polen de OGM en mieles restringe la rentabilidad de los apicultores, los resultados del proyecto abren nuevas alternativas y usos del polen, ya sea en su estado natural en otros mercados, o bien, como extracto de polen, donde ahí ya no sería trascendente el origen botánico del polen ni la posible presencia de OGM.

Por tanto, la relevancia e impacto económico del proyecto se considera de alto potencial de impacto y dependerá de las capacidades de adopción de los conocimientos y resultados que a partir de este proyecto, se ponen a disposición de la cadena apícola nacional.



- Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).

La Zona Central de Chile, que se extiende aproximadamente entre el paralelo 30º y 39º LS, se caracteriza por poseer un clima de tipo mediterráneo, con veranos secos y calurosos, e inviernos fríos y húmedos (Di Castri & Hajek, 1976; Montenegro, 2000). Las zonas de clima mediterráneo en el mundo son escasas, representando sólo el 5% del total de tierras emergidas del planeta, sin embargo, albergan el 25% de la biodiversidad vegetal mundial. Esto implica que dichas regiones poseen altos niveles de endemismo, es decir, que son habitadas por especies que viven exclusivamente en ellas. En el caso de Chile Central, su grado de endemismo corresponde al 48% de su flora (Arroyo & Cavieres, 1997).

Debido a esto, la zona Central de Chile ha sido recientemente declarada como sitio prioritario para la conservación de la Biodiversidad o “Biodiversity Hotspot” (Mittermier et al. 1999; Myers et al. 2000). Las características anteriormente expuestas hacen que las zonas de clima mediterráneo se constituyan en sitios especialmente adecuados para la producción y obtención de productos con características únicas e irrepetibles, entre los que se encuentran alimentos de tipo funcional y productos con aditivos alimenticios altamente deseables en términos de nutrición y salud (Basim et al, 2006).

El uso de ingredientes naturales puede aportar un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica eligiendo aquellos que pueden aportar beneficios específicos para la salud, como por ejemplo, las frutas y los vegetales, los granos enteros, los alimentos y las bebidas fortificadas o mejoradas y algunos suplementos en la dieta. Los componentes biológicamente activos en los alimentos funcionales pueden aportar beneficios para la salud o efectos fisiológicos deseables (Lee et al 2004).

Se están descubriendo atributos funcionales en muchos alimentos tradicionales y a su vez, desarrollando nuevos productos alimenticios con componentes beneficiosos. El interés del consumidor por la relación entre la dieta y la salud ha aumentado la demanda de información acerca de los alimentos funcionales.

Los rápidos avances en ciencia y tecnología, el aumento de los costos de los servicios de atención médica, los cambios en las leyes de alimentos afectando las etiquetas con la información nutricional acerca de los productos, una población cada vez más informada y el crecido interés en lograr un bienestar saludable a través de la dieta, se cuentan entre los factores que incrementan el interés por los alimentos funcionales.

Innumerables propiedades han sido descritas para los componentes de la colmena, sin embargo, en nuestro país aún no se han establecido científicamente las propiedades nutricionales del polen apícola. Análisis de composición química y pruebas de actividad antioxidante del polen apícola se han realizado recientemente en algunos centros de investigación alrededor del mundo.

En México, se demostró la buena capacidad antioxidante del polen colectado por *A. mellifera* (Figura 1) desde flores de *Amaranthus hybridus* y *Prosopis juliflora*, medidos por un método de inhibición de peroxidación de lípidos (TBARS), y del polen de *Tapetes sp.* y de la mezcla de éste con polen de *A. hybridus* por el método espectrofotométrico del DPPH (Almaraz-Abarca et al, 2007).

Usando el método del DPPH en Brasil, se probaron 3 diferentes tipos de extractos obtenidos de cargas de polen de *Mimosa gemmulata* colectadas por la abeja sin aguijón *Melipona subnitida* (Sarmiento Silva et al, 2006). Dos de esos extractos exhibieron buenos niveles de actividad antioxidante, aunque menores a antioxidantes comúnmente usados en la industria (ácido ascórbico y BHT).

En Japón, el extracto etanólico de polen de *Cistus ladaniferus* mostró un alto nivel de actividad antioxidante en comparación con soluciones concentradas de α -tocopherol y ácido ascórbico (Nagai et al, 2002). Esta buena capacidad es mayor cuando el polen está fresco, disminuyendo con el almacenamiento por más de un año según determinaron Campos et al (2003) con cargas polínicas monoflorales de 12 especies vegetales colectadas en Portugal y Nueva Zelanda. En este estudio se mostró una actividad antioxidante particularmente alta en el polen de *Eucalyptus globulus*, el cual exhibió también el mayor contenido total de polifenoles.

Una alta concentración de polifenoles ha sido encontrada también en muestras de polen apícola europeo (Kroyer & Hegedus, 2001), donde se destaca la necesidad y se hace la recomendación de realizar mayor investigación sobre los polifenoles del polen apícola y establecer su relación con la capacidad antioxidante exhibida con este producto.

Estudios más recientes también han mostrado una amplia variabilidad en la actividad antioxidante del polen obtenido de flores de una docena de especies en Polonia, la cual parece no tener una relación directa con el contenido total de compuestos fenólicos (Leja et al, 2007). Además, los compuestos fenólicos del polen corbicular, al contrario de los encontrados en otros productos de origen vegetal o apícola, se encuentran como agliconas, esto es, no están glicosilados o unidos a carbohidratos, pues el enlace que los une se rompe cuando la abeja mezcla el polen colectado con su saliva y secreciones de sus glándulas hipofaríngeas, lo que incrementa las posibles bioactividades de los compuestos fenólicos del polen apícola (Serra-Bonvehí et al, 2001).



Existe evidencia de la eficiencia del tratamiento con antioxidantes del polen en pacientes con Síndrome de Fatiga Crónica (CFS), enfermedad relativamente común en personas de edad avanzada, la que es causada por daño oxidativo y fallas en los mecanismos de protección antioxidante del cuerpo, entre otras razones.

Por otro lado, las propiedades biológicas del polen producido en las más diversas regiones del mundo han sido ampliamente estudiadas, destacando su capacidad antioxidante relacionada a su alto contenido de compuestos fenólicos y pigmentos (Mirzoeva et al, 1997; Burdok, 1998; Bankova & Marcucci, 2000; Drago et al, 2000). Algunos nuevos compuestos bioactivos también han sido detectados en muestras de propóleos nacionales (Valcic et al, 1998 y 1999; Muñoz et al, 2001a y b). Estas propiedades convierten al polen en una excelente alternativa para su uso en la industria de los alimentos, usadas como aditivos alimenticios.

Actualmente, por el cada vez mayor rechazo del público al uso de preservantes sintéticos, existe un creciente interés por el uso de aditivos naturales que cumplan con el objetivo de preservar los alimentos, y el polen se transforma así en una interesante alternativa para ser utilizada con ese objetivo en la industria de los alimentos.

Por su parte, los pigmentos vegetales, tales como los carotenoides presentes en el polen apícola, juegan roles fundamentales en la protección contra la foto-oxidación y el daño causado por especies reactivas de oxígeno en tejidos fotosintéticos, siendo ésta su principal función en este tipo de tejidos. Son pigmentos liposolubles encontrados en frutas y vegetales verdes, amarillos, anaranjados y rojos. Hay pigmentos bien conocidos, tales como α - y β -caroteno, licopeno, luteína, astaxantina y zeaxantina.

Aproximadamente 700 carotenoides son encontrados en la naturaleza pero sólo 50 de ellos pueden ser absorbidos y metabolizados por el cuerpo humano, algunos de éstos, como el β -caroteno, sirven como precursores de la vitamina A (Bartley & Scolnik, 1995). Los carotenos han probado su eficacia en estabilizar especies reactivas de oxígeno y en atrapar oxígeno libre convirtiéndose en una importante pieza dentro de la barrera antioxidante (Bartley & Scolnik, 1995; Granato, 2003). Además, ellos también tienen muchas otras actividades fisiológicas establecidas: pueden estimular el sistema inmunológico mejorando la función inmune (Jyonouchi et al, 1991 y 1993, 1994; Okai & Higashi-Okai, 1996; Bennedsen et al, 1999), reduce la mutagénesis e inhibe las transformaciones celulares. Estudios epidemiológicos han establecido una correlación inversa entre ingesta de carotenoides e incidencia de algunos tipos de cáncer (Granato, 2003).

En relación a esto, se han efectuado estudios epidemiológicos donde se ha correlacionado una dieta rica en carotenoides con una disminución en el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer, enfermedades coronarias y algunas enfermedades degenerativas (Bendich, 1994). Su capacidad de prevenir el cáncer es generalmente atribuida a la actividad antioxidante de los carotenoides (Seis et al. 1992), Sin embargo, aún en los países desarrollados, la ingesta diaria de β -caroteno en la población es 4-5 mg inferior a la ingesta recomendada (Lachance, 1988).

Esta deficiencia puede compensarse con suplementos o bien con la ingesta de alimentos ricos en carotenoides. Los carotenoides usados actualmente son extraídos desde las plantas o producidos por síntesis orgánica (Pfander, 1992). Sin embargo, existe un público cada vez mayor que está prefiriendo el uso de alimentos ricos en pigmentos por sobre los suplementos obtenidos por procesos artificiales.

El proyecto ha permitido demostrar las propiedades y atributos del polen apícola chileno por:

- ✓ Su alto contenido de compuestos fenólicos, principalmente los flavonoides, los cuales tienen la capacidad de reducir los riesgos de contraer enfermedades degenerativas mediante la reducción del estrés oxidativo y la inhibición de la oxidación molecular (Morais et al, 2011).
- ✓ Su alto contenido de carotenoides. La presencia de pigmentos que le otorgan la coloración característica al grano de polen, le contribuye además las propiedades que estos compuestos poseen. Los pigmentos debido a su estructura química, corresponden a la familia de antioxidantes naturales cuya función primordial estaría asociada a la neutralización de radicales libres (Marguitas et al, 2009; Saric, 2009).
- ✓ Su alto contenido de proteínas de origen vegetal, siendo uno de los pocos alimentos de dicho origen que contiene todos los aminoácidos, además de fibra dietética, vitaminas y minerales (Serra-Bonvehí & Escolà-Jordà, 1997) lo que posiciona al polen apícola como una buena alternativa para dietas y tratamientos médicos donde el consumo de carne y grasas de origen animal debe reducirse.
- ✓ Su potencial actividad antimicrobiana. Existen varios estudios que indican que el polen apícola tiene actividad antimicrobiana (Carpes et al, 2007 y 2009; Morais et al, 2011; Basim et al, 2006).

Los resultados del proyecto permiten demostrar que existe una oportunidad de diversificación de los productos apícolas en el uso del polen en la industria alimentaria, utilizándolos como aditivos saludables. Un aditivo alimentario es una sustancia agregada a los alimentos para contribuir a mejorar o fortalecer las propiedades del alimento y el resultado final de este.



El uso de ingredientes alimentarios de origen natural está cobrando una especial importancia en el mercado de la alimentación. Esta fuerte tendencia incluye el uso de los antioxidantes y colorantes naturales incrementándose la demanda a pasos agigantados dentro de la industria, como sustituto natural a los productos de síntesis.

Los nuevos conceptos relacionados con nutrición, alimentación saludable y prevención de la obesidad, hace prever un amplio campo de expansión para los ingredientes naturales y su introducción en alimentos funcionales. Estos factores unidos a la tendencia mundial del consumidor hacia los alimentos naturales con ingredientes naturales se conjugan en un mercado en constante expansión.

En el último tiempo las grandes empresas transnacionales han iniciado fuertes campañas comunicacionales con un sello verde y gran empatía con los consumidores y esta nueva tendencia. La inclusión de ingredientes naturales ha dejado de estar especialmente considerada en alimentos funcionales, su uso se ha empezado a incluir en aquellos productos de línea, en donde se observan mejoras y cambios en su formulación.

El Reglamento Sanitario de los Alimentos Chileno señala que “los aditivos alimentarios permitidos son aquellos cuyo carácter inocuo ha sido evaluado toxicológicamente, considerando, especialmente, los efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, en diferentes especies de animales como asimismo en estudios bioquímicos y metabólicos, y prohíbe la adición en alimentos con principios terapéuticamente activos o sustancias calificadas como productos farmacéuticos”.

Es importante observar que el mercado mundial de ingredientes alimenticios deberá crecer mucho más rápido que el de productos alimenticios acabados. Esta tendencia dentro de la industria alimenticia se debe a la valoración creciente de la alimentación saludable, donde los ingredientes naturales es cada vez más relevante.

Finalmente, se considera que la búsqueda de principios activos y/o aditivos alimentarios naturales, como el polen apícola chileno puede ser una nueva oportunidad de negocios para la cadena apícola, en el marco del gran interés en el desarrollo por los alimentos funcionales en Chile y en el mundo.

6. Impactos y Logros del Proyecto:

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio	No considera	No considera	No considera
Producción (<i>por producto</i>)	No considera	No considera	No considera
Costos de producción	No considera	No considera	No considera
Ventas y/o Ingresos			
<i>Nacional</i>	No considera	No considera	No considera
<i>Internacional</i>	No considera	No considera	No considera
Convenios comerciales	No considera	No considera	No considera

Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual	No considera	No considera	No considera
Nuevos empleos generados			
Productores o unidades de negocio replicadas			

Impactos Tecnológicos

Logro	Número			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	Polen diferenciado			
Proceso				
Servicio				

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes	No considera	
Solicitudes de patente	No considera	
Intención de patentar	No considera	
Secreto industrial	No considera	
Resultado no patentable	Si	Protocolos de diferenciación de polen apícola
Resultado interés público	Si	Norma INN 3255 de Diferenciación de polen apícola

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica	No considera	
Generación nuevos proyectos	1	1 nuevo proyecto adjudicado de Tesis en la Industria (CONICYT); 1 nuevo proyecto presentado al FIC VI Región 2012

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (Citas, título, descripción)
Publicaciones		
(Por Ranking)		
Eventos de divulgación científica	1 16	Ponencia en APIMONDIA 2011 (Argentina) Ponencia en Congreso en Querétaro (México), Talleres
Integración a redes de investigación	No considera	

Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (Título, grado, lugar, institución)
Tesis pregrado	3	<ol style="list-style-type: none"> 1. Darinka Ursic, Residencia: "Evaluación de extractos de pólenes apícolas de especies nativas sobre el control de dos hongos fitopatógenos, dos bacterias humanas y dos bacterias agrícolas" 2. Celeste Azpiazu, Proyecto de Título para Universidad Politécnica de Madrid: " Actividad antibacteriana y antioxidante de extractos de polen apícola de la comuna de Til-Til, Chile" Febrero – Agosto 2011. 3. Claudia Jara: "Evaluación de la actividad biológica de extractos de polen corbicular sobre los hongos Fusarium solani, Penicillium sp., y la bacteria Streptococcus pyogenes" 2010-2011
Tesis postgrado	2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Carol Cabrera, Magíster de Fisiología y Producción de Cultivos. 2. Francisca Santander, Magíster de Fisiología y Producción de Cultivos.
Pasantías		
Cursos de capacitación		

7. Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

- Legales: No se registraron.
- Técnicos: No se registraron.
- Administrativos: No se registraron. Sólo en una oportunidad se retrasó la entrega del informe Técnico y fue por razones administrativas.
- Gestión: No se registraron.
- Medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

8. Otros Aspectos de Interés

NO HAY



9. Conclusiones y Recomendaciones:

El proyecto ha permitido confirmar la sustentabilidad científica y tecnológica del valor diferencial positivo que se genera derivado de la diferenciación del polen apícola según su origen botánico y propiedades bioactivas.

Las actividades y resultados del proyecto permiten generar nuevas oportunidades de negocios a través de la diferenciación y diversificación de los productos apícolas de la región, consistente en la certificación del polen apícola en su estado natural y/o como materia prima mediante la elaboración de extractos de polen, lo que representa nuevas oportunidades de iniciativas innovadoras y mayores ingresos económicos a nivel del apicultor al generar productos con valor agregado e inocuidad de calidad exportable.

El foco del proyecto estuvo en aprovechar la información existente tanto la base científica del grupo ejecutor, para el desarrollo y validación de los protocolos de evaluación y validación de las características organolépticas y atributos diferenciadores del polen apícola chileno.

IV. INFORME DE DIFUSIÓN

Realización de Talleres/Seminarios con apicultores

Realización de 16 Talleres de Diferenciación de Polen Apícola, con charlas dictadas por la profesora Gloria Montenegro. Estos talleres se han realizado en diferentes regiones y en el Campus San Joaquín de la UC (Santiago). Esta estrategia ha permitido un mayor acercamiento con los apicultores, una mayor participación de éstos a un menor costo, ya que se desplaza solamente el equipo del proyecto y los materiales y elementos para atender a los asistentes.

En estos Talleres además de difundir los resultados parciales del proyecto, se ha contribuido a fortalecer las capacidades de los apicultores potencialmente productores de polen. Asimismo, ha permitido difundir y socializar la nueva Norma de Diferenciación de Polen (NCh 3255, 2011) generada en el contexto del proyecto, y que está aprobada y en la etapa de oficialización por parte del INN.

Participación en Congresos

Mejías E., Montenegro G. "Actividad Antioxidante de pólenes apícolas producidos en zonas cercanas al Volcan Llaima". II Congreso Nacional de Flora Nativa. Quillota, Abril 2011.

1. Santander F., Cabrera C., Mejías E., Nuñez G., Montenegro G. "La flora nativa genera polen apícola y miel monofloral: Correlación entre perfiles fenólicos". II Congreso Nacional de Flora Nativa. Quillota, Abril 2011.
2. Mejías E., Montenegro G. "Impacto de la contaminación por metales sobre la actividad antioxidante del Polen Apícola nativo chileno". X Congreso Internacional y XVI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Centro de Congresos Querétaro, México. 2011.-
3. Montenegro G. "Chemical profiles of bioindicators of botanical and geographical origin of Chilean native honey". XLII International Apicultural Congress APIMONDIA. Buenos Aires, Argentina, Septiembre 2011.
4. Mejías E., Montenegro G. "Chemical analysis and antioxidant activity of Chilean bee pollen from polluted zones with metals". XLII International Apicultural Congress APIMONDIA. Buenos Aires, Argentina, Septiembre 2011.
5. Mejías E., Montenegro G. "Chemical characterization of Chilean native bee pollen compared with honey of the same origin: potential source of bioactive molecules. XLII International Apicultural Congress APIMONDIA. Buenos Aires, Argentina, Septiembre 2011.
6. Santander F., Jara C., Fredes C., Montenegro G. "Correlation of phenolic profile of bee pollen and honey". XLII International Apicultural Congress APIMONDIA. Buenos Aires, Argentina, Septiembre 2011.
7. Nuñez G., Pizarro, R., Santander F., Cabrera C., Mejías E., Montenegro G. "Origen botánico y química de productos apícolas recolectados en colmenas ubicadas en Til-Til, zona central de Chile". XLII International Apicultural Congress APIMONDIA. Buenos Aires, Argentina, Septiembre 2011.
8. Cabrera C., Montenegro, G "Antimicrobial activity of bee products extracts from native chilean species" . XLII International Apicultural Congress APIMONDIA. Buenos Aires, Argentina, Septiembre 2011
9. Mejías E., Montenegro G. " Modificación de la capacidad antioxidante del polen apícola chileno con alto contenido de metales" LXII Congreso Agronómico y III Congreso Internacional de Agricultura en Zonas Áridas. Iquique, Octubre 2011.



V. ANEXOS

FICHAS CURRICULARES

1. Ficha Representante Legal de Ejecutor (Entidad Responsable)

En el proyecto original

Nombres	Carlos			
Apellido Paterno	Vio			
Apellido Materno	Lagos			
RUT Personal				
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Pontificia Universidad Católica de Chile.			
RUT de la Organización				
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i>	X
Tipo Entidad (C)	Universidades Nacionales.			
Cargo o actividad que desarrolla	Vicerrector de investigación, representante legal.			
Dirección (laboral)	Av. Libertador Bernardo O'Higgins 340, Piso 1, Ofic. 32.			
País	Chile			
Región	Metropolitana			
Ciudad o Comuna	Santiago			
Fono	354-23 97			
Fax	354-22 80			
Celular	--			
E-mail				
Web	www.uc.cl			
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>	
Etnia (A)	Sin clasificar			
Tipo (B)	Profesional			



Actual

Nombres	Juan			
Apellido Paterno	Larraín			
Apellido Materno	Correa			
RUT Personal				
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Pontificia Universidad Católica de Chile.			
RUT de la Organización				
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i>	X
Tipo Entidad (C)	Universidades Nacionales.			
Cargo o actividad que desarrolla	Vicerrector de investigación, representante legal.			
Dirección (laboral)	Av. Libertador Bernardo O'Higgins 340, Piso 1, Ofic. 32.			
País	Chile			
Región	Metropolitana			
Ciudad o Comuna	Santiago			
Fono	354-2400			
Fax	354-22 80			
Celular	--			
E-mail				
Web	www.uc.cl			
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>	
Etnia (A)	Sin clasificar			
Tipo (B)	Profesional			



2. Ficha Representantes Legales Agentes Asociados

Nombres	John		
Apellido Paterno	Hernández		
Apellido Materno	Ortega		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Sociedad Comercial John Hernández y Hermanos limitada, nombre de fantasía APILANDIA LTDA.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Tipo Entidad (C)	Empresas productivas y/o de procesamiento.		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Socio gerente.		
Dirección (laboral)	Avenida Francisco Bilbao 1461, Peñaflo.		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Peñaflo		
Fono (laboral)	818 13 38		
Fax (laboral)	818 13 38		
Celular	--		
E-mail	apilandia@tie.cl- apilandi@terra.cl		
Web	--		
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	(3) Productor individual mediano-grande.		



Nombres	Julio Sebastián		
Apellido Paterno	Jiménez		
Apellido Materno	Kaufman		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	MIPAGRO LDA.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Tipo Entidad (C)	Empresas productivas y/o de procesamiento.		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Socio gerente.		
Dirección (laboral)	Parcela 19, Lote 1A, Las Mercedes s/n, Requínoa.		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Rancagua		
Fono (laboral)	72-55 36 96		
Fax (laboral)	72-55 36 96		
Celular			
E-mail			
Web	www.mipagro.cl		
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Empresas productivas y/o de procesamiento.		



<i>Nombres</i>	Sergio		
Apellido Paterno	Olivares		
Apellido Materno	Jofre		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Cooperativa Apicola Coapinort, Red de Apicultores de la IV Región.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Tipo Entidad (C)	Empresas productivas y/o de procesamiento		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Presidente y representante legal		
Dirección (laboral)	Mario Banic 1711, Villa El Portal, Ovalle.		
País	Chile		
Región	IV Región.		
Ciudad o Comuna	Ovalle		
Fono (laboral)			
Fax (laboral)	--		
Celular			
E-mail			
Web	www.coapinort.cl		
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Organización o asociación de productores pequeños.		



Nombres	Marcelo			
Apellido Paterno	Vera			
Apellido Materno	Gamoral			
RUT Personal				
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Cooperativa Mieles del Sur.			
RUT de la Organización				
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i>	<i>X</i>
Tipo Entidad (C)	Empresas productivas y/o de procesamiento.			
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Presidente y representante legal			
Dirección (laboral)	Los Lagos y Los Ríos.			
País	Chile			
Región	Décima			
Ciudad o Comuna	Valdivia			
Fono (laboral)				
Fax (laboral)	--			
Celular				
E-mail				
Web	--			
Género	<i>Masculino</i>	<i>X</i>	<i>Femenino</i>	
Etnia (A)	Sin clasificar			
Tipo (B)	Organización o asociación de productores pequeños.			



Nombres	Elizabeth		
Apellido Paterno	Harriet		
Apellido Materno	Eeles		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Red Apix Ag.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Tipo Entidad (C)	Empresas productivas y/o de procesamiento.		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Presidente y representante legal.		
Dirección (laboral)	Letelier 236, oficina 5, Valdivia.		
País	Chile		
Región	Décima		
Ciudad o Comuna	Valdivia		
Fono (laboral)	63-27 45 46		
Fax (laboral)	63-27 45 46		
Celular			
E-mail			
Web	--		
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Organización o asociación de productores pequeños.		



Nombres	Jesús		
Apellido Paterno	Contreras		
Apellido Materno	Zepeda		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Red de Apicultores de la VI región, Apiunisexta.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Tipo Entidad (C)	Empresas productivas y/o de procesamiento.		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Presidente y representante legal.		
Dirección (laboral)	Calle Rancagua 746, San Fernando.		
País	Chile		
Región	Sexta		
Ciudad o Comuna	Rancagua		
Fono (laboral)	72-72 15 48		
Fax (laboral)	72-72 15 48		
Celular	--		
E-mail			
Web	www.Apiunisexta.cl		
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Organización o asociación de productores pequeños.		



Nombres	José		
Apellido Paterno	Navarrete		
Apellido Materno	Arevalo		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Red de Apicultores de la Región Metropolitana, REDAM.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Tipo Entidad (C)	Empresas productivas y/o de procesamiento.		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Presidente y representante legal		
Dirección (laboral)	Avenida Pablo Neruda 0315, departamento 21, Melipilla.		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Melipilla		
Fono (laboral)			
Fax (laboral)	--		
Celular			
E-mail			
Web	www.redam.cl		
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	(3) Productor individual mediano-grande.		



3. Fichas Coordinadores

Coordinador Principal			
Nombres	Gloria		
Apellido Paterno	Montenegro		
Apellido Materno	Rizzardini		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Profesora Titular e Investigadora Directora de Investigación y Postgrado de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal UC.		
Profesión	Profesora de Biología, Experta en Productos Naturales y Apícolas.		
Especialidad	Botánica Aplicada, Bioprospección.		
Dirección (laboral)	V. Mackenna 4860, Macul.		
País	Chile		
Región	RM		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	354 57 02		
Fax	354 57 26		
Celular			
E-mail			
Web	www.uc.cl		
Género	<i>Masculino</i>		<i>Femenino</i> X
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Profesional		



Coordinador Alterno			
Nombres	Ximena		
Apellido Paterno	Ortega		
Apellido Materno	Fuenzalida		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Subdirectora de Investigación y Postgrado de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal UC e Investigadora.		
Profesión	Ingeniero Agrónomo, MBA.		
Especialidad	Gestión de la innovación.		
Dirección (laboral)	V. Mackenna 4860, Macul.		
País	Chile		
Región	RM		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	354 57 04		
Fax	354 57 26		
Celular			
E-mail			
Web	www.uc.cl		
Género	<i>Masculino</i>		<i>Femenino</i> X
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Profesional		



4. Fichas Equipo Técnico

Profesional 1			
Nombres	Ana María		
Apellido Paterno	Mujica		
Apellido Materno	Rizzardini		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Profesora de Botánica de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal UC e Investigadora.		
Profesión	Profesora, Magíster en Recursos Naturales.		
Especialidad	Botánica Aplicada.		
Dirección (laboral)	V. Mackenna 4860, Macul.		
País	Chile		
Región	RM		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	354 41 15		
Fax	354 57 26		
Celular	--		
E-mail			
Web	www.uc.cl		
Género	<i>Masculino</i>		<i>Femenino</i> X
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Profesional		



Profesional 2			
Nombres	Miguel		
Apellido Paterno	Gómez		
Apellido Materno	Ungidos		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Profesor de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal UC e Investigador.		
Profesión	Profesor, Magister en Ciencias Vegetales.		
Especialidad	Botánica Aplicada.		
Dirección (laboral)	V. Mackenna 4860, Macul.		
País	Chile		
Región	RM		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	354 72 16		
Fax	354 57 26		
Celular	--		
E-mail			
Web	www.uc.cl		
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Profesional		



Profesional 3			
Nombres	Gloria		
Apellido Paterno	Barros		
Apellido Materno	Montenegro		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador asociado.		
Profesión	Técnico en Comunicación y Desarrollo de Negocios.		
Especialidad	Marketing y Escalamiento de Emprendimientos Innovativos.		
Dirección (laboral)	V. Mackenna 4860, Macul.		
País	Chile		
Región	RM		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	354 72 16		
Fax	354 57 26		
Celular	--		
E-mail			
Web			
Género	<i>Masculino</i>		<i>Femenino</i> X
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Profesional		



Profesional 4			
Nombres	Rodrigo		
Apellido Paterno	Pizarro		
Apellido Materno	Fuentes		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Ayudante de Investigación de Botánica.		
Profesión	Biólogo		
Especialidad	Botánica aplicada, análisis de origen botánico de productos apícolas.		
Dirección (laboral)	V. Mackenna 4860, Macul.		
País	Chile		
Región	RM		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	354 72 16		
Fax	354 57 26		
Celular	--		
E-mail			
Web	www.uc.cl		
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Profesional		



<i>Profesional 5</i>			
Nombres	Sharon		
Apellido Paterno	Rodríguez		
Apellido Materno	Sandoval		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Ayudante de Investigación de Botánica.		
Profesión	Bióloga, M.Sc. Magíster en Ciencias Biológicas Mención Ecología y Sistemática (UCV) y Candidata a Doctor en Ciencias de la Agricultura (FAIF UC).		
Especialidad	Entomología y Botánica aplicada, análisis de pólenes y sistemas de producción diferenciada de productos apícolas.		
Dirección (laboral)	V. Mackenna 4860, Macul.		
País	Chile		
Región	RM		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	354 57 26		
Fax	354 57 26		
Celular	--		
E-mail			
Web	www.uc.cl		
Género	<i>Masculino</i>		<i>Femenino</i> X
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Profesional		



Ayudante de Investigación 3			
Nombres	Javier Patricio		
Apellido Paterno	Rodríguez		
Apellido Materno	Castillo		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Ayudante de Investigación de Botánica.		
Profesión	Ingeniero Agrónomo, Estudiante en tesis (FAIF UC).		
Especialidad	Producción agrícola		
Dirección (laboral)	V. Mackenna 4860, Macul.		
País	Chile		
Región	RM		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	354 57 26		
Fax	354 57 26		
Celular			
E-mail			
Web	www.uc.cl		
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Estudiante		



Ayudante de Investigación 4			
Nombres	Gabriel		
Apellido Paterno	Núñez		
Apellido Materno	Quijada		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>		<i>Privada</i> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Ayudante de Investigación de Botánica.		
Profesión	Ingeniero Agrónomo, Estudiante en tesis (FAIF UC).		
Especialidad	Producción agrícola		
Dirección (laboral)	V. Mackenna 4860, Macul.		
País	Chile		
Región	RM		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	354 57 26		
Fax	354 57 26		
Celular			
E-mail			
Web	www.uc.cl		
Género	<i>Masculino</i>	X	<i>Femenino</i>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Estudiante		



JAVIER RODRIGUEZ RENUNCIO A CONTAR DEL 01/11/2010, POR TANTO SE SOLICITA SU REEMPLAZO POR JOSEFINA FERNANDEZ:

Nombres	María Josefina Fernández		
Apellido Paterno	Fernández		
Apellido Materno	Barros		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	<i>Pública</i>	<input type="checkbox"/>	<i>Privada</i> <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Técnico del Laboratorio de Botánica		
Profesión	Ayudante de Investigación en Botánica Aplicada		
Especialidad	Botánica y análisis de productos naturales y apícolas		
Dirección (laboral)	V. Mackenna 4860, Macul, Santiago		
País	Chile		
Región	RM		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	3544117		
Fax	3545726		
Celular			
Email			
Web	www.uc.cl		
Género	<i>Masculino</i>	<input type="checkbox"/>	<i>Femenino</i> <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (A)	Sin clasificar		
Tipo (B)	Técnico		



VI. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA(actualizada abril/2012)

Almaraz-Abarca, N., M. Campos, J. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Giménez, J. Herrera-Corral, L. González-Valdés. 2004 Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia*, 29:10, 573-578.

Almaraz-Abarca, N., M. Campos, J. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Giménez, J. Herrera-Corral, L. González-Valdés. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food and Analysis*. 20: 119-124.

Arima, H., Ashida, H., & Danno, G.-i. (2002). Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *B. cereus* and *S. enteritidis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , 66 (5), 1009-1014.

Basim, E., Basim, H., & Ozcan, M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering* 77 , 992–996.

Basim, E., Basim, H., & Ozcan, M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering* 77 , 992–996.

Bertoncelj J., Dorbersek U., Jamnik M., Golob T., 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105, -págs 822-828.

Broz, A. K., Vivanco, J. M., Schultz, M. J., Perry, L. G., & Paschke, M. W. (2006). Essay 13.2. Secondary Metabolites and Allelopathy in Plant Invasions: A Case Study of *Centaurea maculosa*. *Plant physiology online 5th edition* .

Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J. D., & Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *100* (3), 1044-1048.

Coe, H., S. McCormick and S. Modena.1981. White pollen in maize. *Journal of Heredity*. 72(5): 318-320.



Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Review: Antimicrobial activity of flavonoids. (T. R. School of Pharmacy, Ed.) *International Journal of Antimicrobial Agents* , 26, 343-356.

Feng, W., & Zheng, X. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food Control* , 18, 1126–1130.

Fonnegra G. R. Plantas medicinales aprobadas en Colombia [Libro]. - [s.l.] : Universidad de Antioquia, 2007. - pág. 368.

Daoubi, M., Durán-Patrón, R., Hmamouchi, M., Hernández-Galán, R., Benharref, A., & Collado, I. G. (2004). Synthesis and in vitro evaluation of coumarins against *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* , 60, 927-932.

Di Paola, R., J. Sánchez, A. González and J. Rivas. 2004. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum*. *Journal of Chromatography A*. 1054: 205–210.

Feng, W., & Zheng, X. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food Control* , 18, 1126–1130.

González-Miret, M., A. Terrab, D. Hernanz, M. Fernandez-Recamales and F. Heredia. 2005. Multivariate Correlation between Color and Mineral Composition of Honeys and by Their Botanical Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 2574-2580.

Heuschen, B., A. Gumbert and K. Lunau. 2005. A generalised mimicry system involving angiosperm flower colour, pollen and bumblebees' innate colour preferences. *Plant Systematics and Evolution* 252: 121-137.

Hidalgo, I. and L. Bootello. 1990. About some physical characteristics of the pollen loads collected by *Apis mellifera* L. *Apicultura*. 6:179-191.

Hodges, D. 1984. The pollen Loads of the Honey Bee. Segunda edición. G. Beard & Son Ltd. Brighton, UK. 95 pp.



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

Lister, C., A. Price, J. Reader and A. Conner. 1998. Flavonoids in Californian poppy (en línea). 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2). Consultado: 2 ago. Disponible en: <http://ecsoc2.hcc.ru/ecsoc-2/dp289/dp289.htm>.

López, T., Apablaza, G., & Montenegro, G. (2010). *Evaluación de actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de polen corbicular contra hongos fitopatógenos y bacterias patógenas humanas*. Pontificia Universidad Católica de Chile , Departamento de Ciencias Vegetales, Santiago, Chile.

Lotitoa, S. B., & Fraga, C. G. (1998). (+)-Catechin Prevents Human Plasma Oxidation. *Free Radical Biology and Medicine* , 24 (3), 435–441.

Lunau, K. 2000. The ecology and evolution of visual pollen signals. *Plant Systematics and Evolution* 222: 89-111.

Meda A., Lamien E., Romito M., Milllogo J., Nacoulma O., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, -págs 571-577.

Montenegro, G., M. Gómez y G. Ávila. 1992. Importancia relativa de especies cuyo polen es utilizado por *Apis mellifera* en el área de la Reserva Nacional de los Ruiles, VII Región de Chile. *Acta Botánica Malacitana*. 17: 167-174.

Montenegro, G., Salas, F., Peña, R., & Pizarro, R. (2009). Actividad antibacteriana y antifúngica de mieles monoflorales de Quillaja saponaria, especie endémica de Chile. *Revista internacional de botánica experimental* , 78, 141-146.

Montenegro, G., Silva, J., Peña, I., & Apablaza, G. (2009). *Actividad antifúngica de extractos fenólicos provenientes de mieles y plantas chilenas*. Santiago, Chile: Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.



Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevhino, L. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* , 49, 1096-1101.

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.

Puhl, I., & Treutter, D. (2008). Ontogenetic variation of catechin biosynthesis as basis for infection and quiescence of *Botrytis cinerea* in developing strawberry fruits. *Journal of Plant Diseases and Protection* , 115 (6), 247–251.

Ramírez, R., G. Montenegro. 2004. Certificación de origen botánico de miel y polen corbicular perteneciente a la comuna de Litueche, VI Región de Chile. *Revista de Ciencia e Investigación Agraria*, 31: 3, 197-211.

Rozema, J., Noordijk, A., Broekman, R., & van Beem, A. (2001). Polyphenolic compounds in pollen and spores of Antarctic plants as indicators of solar UV-B. *Plant ecology* , 154, 11-26.

Shahi, S., Shukla, A., Bajaj, A., Medgely, G., & Dikshit, A. Broad spectrum antimycotic drug control of fungal infection in human beings. *Current Science* , 76, 836-839.

Sá-Otero, M., S. Marcial-Bugarín, S. Armesto-Baztán, y E. Díaz-Losada. 2002. Método de Determinación del Origen Geográfico del Polen Apícola Comercial. *Lazaroa*. 23: 25 -34.

Silva, J. 2009. Actividad antifúngica de extractos fenólicos provenientes de mieles y plantas chilenas .Proyecto de Tesis (Magíster en Cs. Vegetales). Santiago, Chile.Pontificia Universidad de Chile, Facultad de Agronomía e Ing. Forestal,Depto. De Ciencias Vegetales. 103 pp.

Takahashi T., Kokubo R. y Sakaino M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate* [Publicación periódica]. - [s.l.]: Letters in applied Microbiology, 2004. - Vol. 39. - págs. 60-64.

Tao, S., Zhang, S., Tsao, R., Charles, M., Yang, R., & Khanizadeh, S. (2010). In vitro antifungal activity and mode of action of selected polyphenolic antioxidants on *Botrytis cinerea*. *Agriculture and Agri-Food Canada, Archives of Phytopathology and Plant Protection* , 43 (16), 1564-1578.



Telleria, I. y M. Saralosa. 2003. Análisis de polen corbicular recolectado durante los años 2002 y 2003 en los colmenares de estudio ecoetológico de Oñati y Goizueta España (en línea). Consultado: 29 mar. 2011. Disponible en: http://www.ogasun.ejgv.euskadi.net/contenidos/eco_etologicoabejas/esdoc/adjuntos/analisi_spolinico.pdf

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., y otros. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother* , 49 (6), 2474-2478.

Veluri, R., Weir, T. L., Pal Bais, H., Stermitz, F. R., & Vivanco, J. M. (2004). Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 52 (5), 1077-1082.

WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, B., TUDZYNSKI, P., & VAN KAN, J. A. (2007). Pathogen profile, *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* , 8 (5), 561-580.