

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

**“Relación entre el Contenido de Caroteno, Color y Características
Botánicas del Polen Corbicular”**

Tesis presentada como parte
de los requisitos para optar al
grado de Licenciado en
Ingeniería en Alimentos.

Oscar Hernán Contreras Villar

VALDIVIA – CHILE

2004

PROFESOR PATROCINANTE

LUZ HAYDEE MOLINA C.

Prof. Biología y Química

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Ciencias Agrarias.

PROFESORES INFORMANTES

MAGALY RIVEROS G.

Prof. Biología y Química, Dr. En Ciencias

Instituto de Botánica

Facultad de Ciencias

MIGUEL NEIRA C.

Ingeniero Agrónomo

Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

Facultad de Ciencias Agrarias.

“NO TE APURES, NO TE PREOCUPES,
TU ESTAS AQUÍ SOLO POR UN CORTO TIEMPO,
ASEGÚRATE DE DETENERTE Y OLER LAS FLORES”.

WALTER C. HAGEN (1892 – 1969).

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION.	1
1.1	Objetivo general.	2
1.2	Objetivos específicos.	2
2	REVISION BIBLIOGRAFICA.	3
2.1	Producción de polen.	3
2.1.1	Recolección de polen por las abejas.	3
2.1.2	Extracción del polen desde la colmena.	4
2.1.3	Secado del polen.	5
2.1.4	Limpieza del polen.	6
2.1.5	Envasado y almacenamiento del polen.	6
2.1.6	Normas de calidad.	7
2.2	Estructura y características generales del polen.	7
2.2.1	Definición de polen.	7
2.2.2	Estructura del grano de polen.	9
2.2.3	Composición química del polen.	11
2.2.3.1	Contenido de carbohidratos.	12
2.2.3.2	Contenido de aminoácidos y proteínas.	12
2.2.3.3	Contenido de lípidos.	14
2.2.3.4	Contenido de minerales.	14
2.2.3.5	Contenido de vitaminas.	15
2.3	Utilización del polen.	16
2.3.1	Utilización del polen por la colmena.	16
2.3.2	Utilización del polen por el hombre.	17

2.4	Toxicidad del polen.	19
2.5	Flora apícola predominante en la zona de recolección de muestras.	20
2.6	Carotenoides.	20
2.6.1	Clasificación de los carotenoides.	21
2.6.2	Estructura y propiedades importantes.	21
2.6.3	Actividad biológica de los carotenoides.	23
2.6.4	Distribución y estado natural.	24
2.6.5	Estabilidad de los carotenoides.	25
2.6.6	Importancia nutricional de los carotenoides.	25
2.6.7	Propiedades antioxidantes de los carotenoides.	26
2.6.8	Extracción y aislamiento de carotenoides.	27
3	MATERIAL Y METODO.	29
3.1	Lugar de trabajo.	29
3.2	Material.	29
3.2.1	Polen.	29
3.2.2	Material de laboratorio.	29
3.2.2.1	Reactivos.	29
3.2.2.2	Material de vidrio.	29
3.2.2.3	Equipos.	30
3.2.2.4	Materiales diversos.	30
3.3	Método.	31
3.3.1	Diseño experimental.	31
3.3.2	Toma de muestras.	31
3.3.3	Preservación de las muestras.	32
3.3.4	Preparación de las muestras.	32
3.3.5	Métodos de análisis.	32
3.3.5.1	Determinación del contenido de humedad.	33

3.3.5.2	Determinación del contenido de carotenos.	33
3.3.5.2.1	Extracción de carotenos con solvente.	33
3.3.5.2.2	Separación por cromatografía de columna abierta.	35
3.3.5.2.3	Determinación espectrofotométrica.	36
3.3.5.2.4	Curva de calibración.	36
3.3.5.2.5	Prueba de recuperación de carotenos.	37
3.3.5.2.6	Determinación con HPLC.	37
3.3.5.3	Determinación del origen botánico.	38
3.3.5.3.1	Acetólisis.	38
3.3.5.3.2	Preservación de las muestras en glicerina – gelatina.	39
3.3.5.3.3.	Análisis de origen botánico.	40
3.3.5.4	Caracterización según color.	40
3.3.5.5	Caracterización según forma, tamaño y peso.	40
3.3.6	Análisis estadísticos.	41
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS.	42
4.1	Análisis de humedad.	42
4.2	Determinación del contenido de carotenos.	43
4.3	Determinación de origen botánico del polen corbicular.	47
4.4	Caracterización del polen corbicular según color.	49
4.5	Caracterización del polen corbicular según forma, tamaño y peso.	50
5	CONCLUSIONES.	55
6	RESUMEN.	56
	SUMMARY.	57
7	BIBLIOGRAFIA.	58

ANEXOS.

67

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición química del polen recolectado por abejas.	12
2	Requerimientos de aminoácidos para el hombre y aportes del polen.	13
3	Composición mineral del polen.	15
4	Plantas tóxicas para el hombre.	20
5	Flora arbórea presumiblemente visitada por las abejas en la zona de estudio.	20
6	Diseño experimental.	31
7	Resultados del contenido de humedad en polen corbicular.	42
8	Recuperación de carotenos al pasar la muestra por la columna cromatográfica.	44
9	Resultados del contenido de carotenos en polen corbicular.	44
10	Resultados de la cromatografía HPLC.	47
11	Resultados de la determinación de origen botánico del polen corbicular.	48
12	Resultados de la caracterización por tamaño del polen corbicular según color.	52
13	Resultados de la caracterización por peso del polen corbicular según color.	53

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Constitución de las trampas de polen.	5
2	Esquema de un secador y un tanque almacenamiento de polen.	6
3	Estructura de una flor y origen del polen.	8
4	Granos de polen.	9
5	Grano de polen de gimnosperma.	10
6	Ejemplo de carotenoides distribuidos en la naturaleza.	22
7	Espectro visible del β -caroteno en n-hexano.	23
8	Vitamina A y su derivación del beta caroteno.	24
9	Materiales utilizados en la extracción de caroteno con solvente.	30
10	Corbículas de polen separadas por color (amarillo, naranja y verde).	32
11	Separación de las dos fases en la extracción de caroteno.	34
12	Filtración del extracto etéreo conteniendo los carotenos.	34
13	Lugar de trabajo para la extracción y separación de carotenos.	35
14	Curva de calibración de análisis de carotenos.	36
15	Espectro de absorción del caroteno extraído de la muestra corbicular 3 naranja con éter de petróleo.	46
16	Histograma de frecuencias morfológicas en el polen corbicular Según color.	50
17	Distribución porcentual de las muestras de polen corbicular de acuerdo a su morfología.	51

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Tabla resumen del muestreo de polen corbicular.	68
2	Carta de colores del Sistema C.I.E. – XYZ.	69
3	Análisis estadísticos.	70
4	Resultados de la humedad del polen corbicular.	76
5	Perfil anual de temperaturas y precipitaciones en la zona de estudio.	77
6	Resultados de la cuantificación de carotenos en polen corbicular.	78
7	Cromatogramas de la curva de calibración de carotenos para la determinación por HPLC.	79
8	Cromatogramas de la muestra 12 del polen estudiado y el polen comercial.	81
9	Nivel de predominancia de una especie botánica específica en cada muestra corbicular.	83
10	Resultado de la identificación botánica.	84
11	Imágenes de los granos de pólenes predominantes.	85
12	Resultados del análisis colorimétrico.	86
13	Resultados de la caracterización morfológica de las corbículas.	88
14	Granos de polen encontrados en la muestra 17 amarillo.	90
15	Granos de polen encontrados en la muestra 17 naranjo.	91
16	Granos de polen encontrados en la muestra 3 verde.	92

1. INTRODUCCIÓN

Existen antecedentes sobre la regular utilización del polen por griegos y romanos, como también en las tribus americanas, en las cuales era considerado uno de los alimentos fundamentales de su dieta. En la década del 50 se inician los primeros estudios científicos acerca de este alimento con relación a la cosecha, las propiedades y el empleo del polen floral.

Hoy en día se dice que el polen y la miel de abeja son los únicos alimentos sobre la tierra que contienen los elementos necesarios para que el hombre tenga una nutrición completa y por lo tanto muy buena salud. Posee gran cantidad y variabilidad de vitaminas, un alto contenido de proteínas y aminoácidos, gran cantidad de minerales, así como también, oligoelementos naturales (ácidos grasos, pigmentos, flavonoides, etc.). La variabilidad entre estas características composicionales depende principalmente del origen floral, además del proceso de recolección utilizado.

Debido a estas características nutricionales el polen ha dejado de ser un subproducto de la colmena, para pasar a un plano mucho más importante en los ingresos del apicultor; pues existe una gran demanda de este producto por parte de los distribuidores de alimentos naturales o vegetarianos, por la industria farmacéutica y cosmetológica; y por la industria apícola.

El polen chileno es conocido como un producto de excelencia debido a su sabor dulce, diversidad de colores, ausencia de impurezas y residuos de pesticidas, y su presentación muy seca.

En consecuencia a lo anterior y considerando que hoy en día existe un gran interés en la búsqueda de alimentos y medicamentos naturales, para evitar daños en el organismo, así como también, alteraciones en el medio ambiente, es de vital importancia estudiar la composición, e identificar el origen botánico del polen producido en el país, y muy especialmente el contenido de carotenoides de este producto debido a la importante actividad biológica y a que éstos son precursores de la vitamina A.

Este estudio se basa en la hipótesis que “el color del polen se relaciona con el origen botánico del mismo y su contenido de caroteno”.

1.1 Objetivo general

Estudiar la relación que existe entre el origen botánico, el contenido de caroteno y el color del polen recolectado en la V Región de Chile.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar el origen floral del polen.
- Analizar el contenido de caroteno de las muestras de polen.
- Caracterizar el polen según color, forma, tamaño y peso.
- Comparar y relacionar el color del polen con el origen botánico y el contenido de caroteno.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Producción de polen

El comienzo de la explotación del polen fue obra de Rémy Chauvin, quien dirigió la Estación de Investigación de Apicultura del Ministerio de Agricultura de Francia (JEAN-PROST, 1995).

El polen es un producto secundario de la colmena. La época de recolección de polen por las abejas corresponde no sólo al tiempo en que hay flores capaces de producirlo, sino también a la presencia de crías no operculadas, generalmente ocurre al final del invierno y en primavera. La recolección del polen se ve entorpecida por las condiciones meteorológicas, tales como: el viento, la lluvia y las bajas temperaturas; bajo estas condiciones las abejas no recogen el polen (JEAN-PROST, 1995; SALAMANCA *et al.*, 2001).

2.1.1 Recolección de polen por las abejas. Durante la jornada diaria las abejas recogen el polen preferentemente muy temprano en la mañana, antes de las 10, aunque en algunas especies la recolección sigue durante todo el día (JEAN-PROST, 1995).

Para la recolección de polen la abeja melífera utiliza sus piezas bucales, los tres pares de patas y la densa capa de pelos largos y plumosos. Los pelos permiten a la abeja retener mejor el polen que cae sobre ella, las piezas bucales le son útiles en aquellas flores muy pequeñas o que contienen escasa cantidad de polen; utilizan las mandíbulas para roer y romper las anteras de las que extraen el polen. Todo el polen acopiado en las piezas bucales es humedecido con miel o néctar que la abeja lleva en su boca, durante el vuelo lo amasan con la ayuda de sus patas hasta confeccionar pequeñas bolitas que luego colocan en los cestillos de sus patas traseras; cuando la carga está completa (15 mg), la

obrero vuelve a su colmena y deposita su cosecha en las celdas situadas cerca del nido de crías (ROOT, 1976).

2.1.2 Extracción del polen desde la colmena. La abeja acumula en su colmena una cantidad de polen superior a sus necesidades inmediatas, por lo que el apicultor puede, por medio de trampas, apropiarse de una parte del polen recolectado por las pecoreadoras. En la colmena, que se ha sustraído una parte de su polen, aumenta la demanda interior de éste; por lo que las abejas de vuelo, encargadas de recolectar el polen, aumentan de número con el fin de compensar el polen capturado por la trampa (JEAN-PROST, 1995).

Según Bottcher, citado por LAMPEITL (1988), en España la cantidad de polen ingresada en una trampa desde abril hasta finales de septiembre oscila entre 15 y 28 kg. por temporada.

Según SALAMANCA **et al.** (2001), CORNEJO (1993) y Sittenauer, citado por LAMPEITL (1988), las trampas de polen están compuestas de una malla vertical de calibre 5 mm, es decir lo suficientemente anchas como para que una obrera las atraviese y lo bastante estrechas como para desprender las bolitas de polen colocadas en la cara externa de las patas posteriores. El polen cae a través de otra malla de calibre 3 mm ubicada en forma horizontal sobre una bandeja de recolección, para impedir la entrada de las abejas hacia el polen recolectado.

El sistema de recolección puede ir ubicado en la parte inferior de la colmena, cuando la entrada de abejas tiene lugar por la base de la colmena, este tipo de trampas se denominan trampas bajas o inferiores. Otro sistema consiste en obturar la piquera de debajo de la colmena, lo que hace que las pecoreadoras, al encontrar la puerta cerrada, trepan por la colmena descubriendo la entrada superior, lugar donde se pone el sistema de recolección de polen; a este tipo de trampas se le llama encimeras o superiores (FIGURA 1) (JEAN-PROST, 1995).

En la recolección de polen se debe retirar cada día la carga obtenida, se debe secar, para reducir el contenido de humedad y evitar la aparición de mohos; luego se limpia, para dejarlo libre de sustancias indeseadas y por último se almacena, (LAMPEITL, 1988).

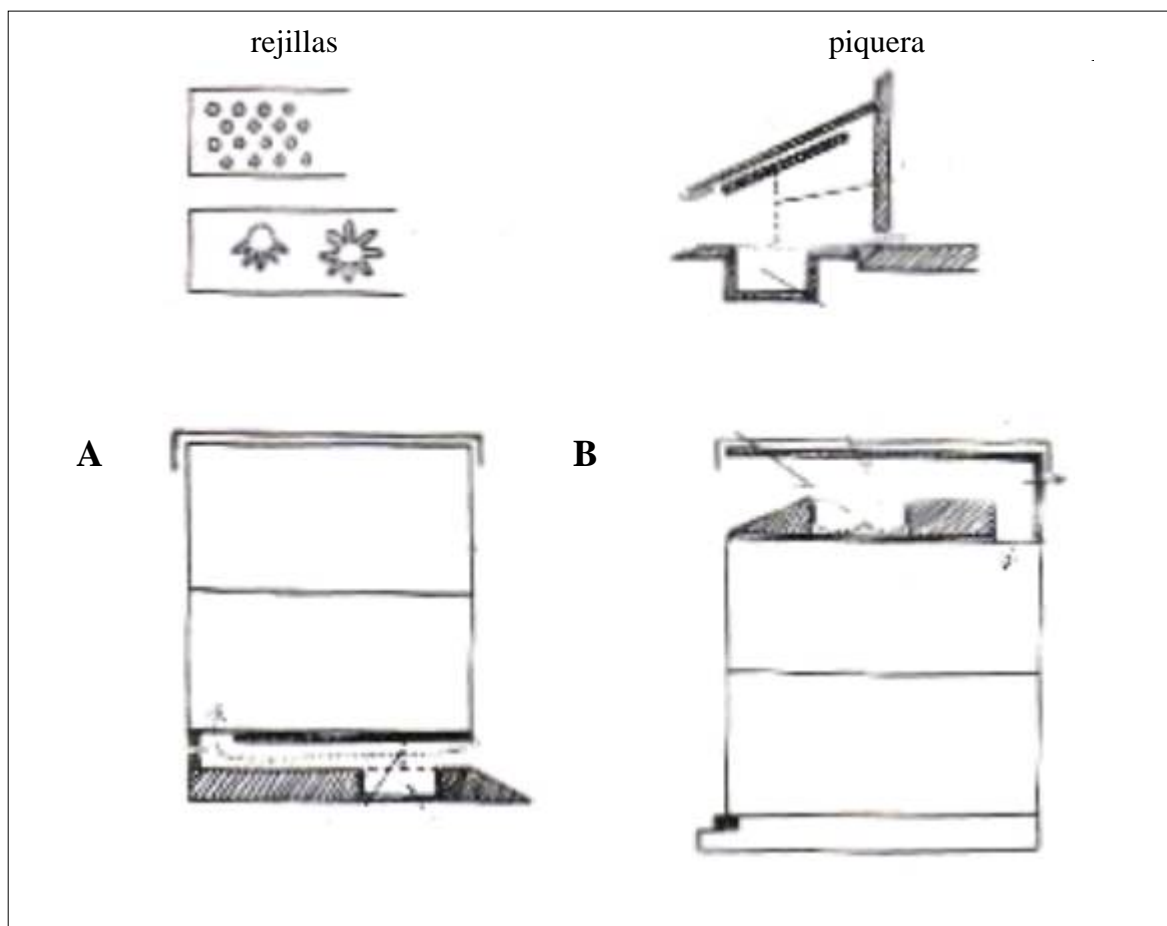


FIGURA 1 Constitución de las trampas de polen. A: Trampa bajera; B: Trampa encimera.

FUENTE: JEAN – PROST (1995).

2.1.3 Secado del polen. El secado se realiza en aparatos cuyo principio es que una corriente de aire temperado y seco atraviesa finas capas de polen. Los secadores están compuestos de tamices superpuestos, donde se extiende el polen en capas no superior a un centímetro de espesor. Una corriente de aire enviada por un ventilador sobre una resistencia, se calienta y seguidamente pasa a través del polen. Un termostato para

no sobrepasar los 40 – 45 ° C, y en ocasiones un absorbedor de agua (tetracloruro de carbono), completan el secadero. El secado requiere de 3 a 15 horas, es suficiente cuando las bolitas no se adhieren unas a otras si se toma un puñado de polen en la mano. La humedad final que se desea obtener con el secado es inferior a 10 % (FIGURA 2) (JEAN-PROST, 1995; SALAMANCA *et al.*, 2001; MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACION FRANCESA, 1996).

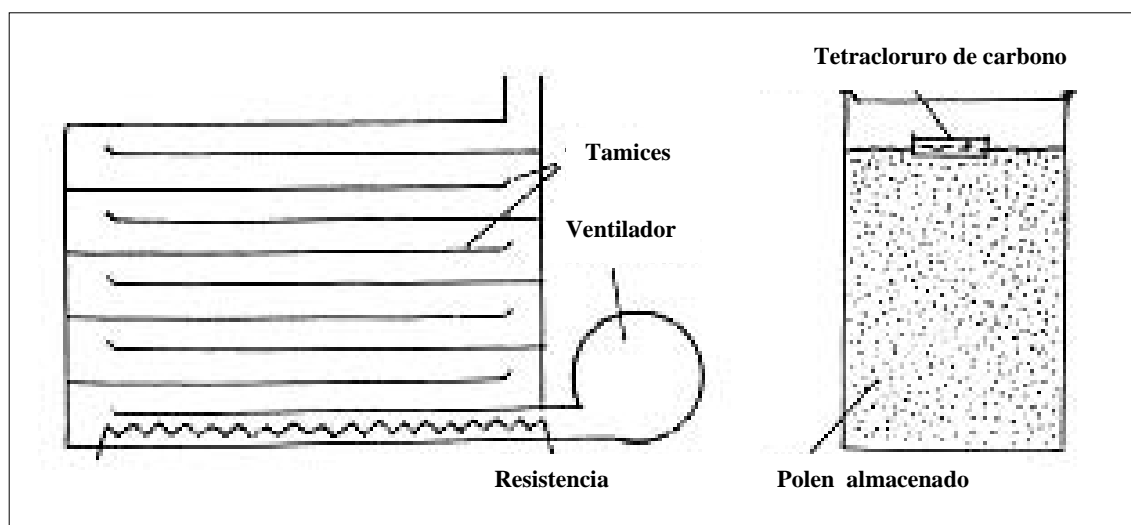


FIGURA 2 Esquema de un secadero y un tanque almacenamiento de polen.

FUENTE: JEAN – PROST (1995).

2.1.4 Limpieza del polen. La limpieza se lleva a cabo en pequeños lotes, se realiza a mano con la ayuda de un pincel; ésta es lenta y engorrosa. Para hacer este proceso más rápido, se utiliza una placa de material plástico electrizado por frotamiento, para atraer todas las patas y demás restos quitinizados y luego se separan las motas y despojos de ninfas mediante una corriente de aire aspirante o emitida (JEAN-PROST, 1995).

2.1.5 Envasado y almacenamiento del polen. Una vez que el polen haya sido secado y limpiado se debe almacenar en sacos de plásticos o bidones y se deben mantener en un lugar seco y frío. Si se envasa para venta en pequeñas cantidades se recomienda usar frascos oscuros que no permitan el paso de luz (JEAN-PROST, 1995).

2.1.6 Normas de calidad. En algunos países ya existen normas de calidad, especialmente microbiológicas. Se fijó como máximo 15×10^4 ufc/g para el recuento total de bacterias aerobias mesófilas, debe contener como máximo 1×10^2 ufc/g de hongos. Se exige además que los envases indiquen la fecha de envasado y si el polen corresponde a monofloral o multifloral (CORNEJO, 1993).

2.2 Estructura y características generales del polen

El grano de polen es un elemento complejo, debido a esto es de vital importancia conocer en forma detallada su estructura y composición.

2.2.1 Definición de polen. El polen también llamado microespora es parte integral de las plantas, es el gametofito masculino de las plantas, éste se desarrolla durante la fase de floración. Es un producto de los sacos polínicos de las anteras en los estambres y su función es transmitir los gametos al estigma que es el elemento femenino de la flor. Esto permite que se lleve a cabo la fecundación y de origen a la producción de semillas y el fruto (GRAHAM, 1993).

El polen se compone de agua, proteínas, glúcidos (almidones y azúcares), lípidos, sustancias minerales; además de resinas, materias colorantes, vitaminas (A, B, C, D y E), enzimas y antibióticos (JEAN-PROST, 1995).

Frecuentemente, los granos de polen son transportados por dos agentes polinizadores naturales, el viento y los insectos. Los granos que son transportados por el viento son conocidos como anemófilos y los transportados por insectos como entomófilos. Estos dos tipos de pólenes difieren en cuanto a sus características generales, los anemófilos son livianos, secos y de colores pardos; en cambio los entomófilos son un poco más pesados, húmedos y de colores amarillos, cafés, anaranjados o rojos (GRAHAM, 1993).

En la FIGURA 3 se presenta una imagen, en la cual, se puede apreciar en forma detallada la estructura de una flor de angiosperma y la forma en que se originan los

granos de polen. Se presenta además, los cortes transversales de un ovario de flor y un grano de polen con el detalle de sus distintos componentes.

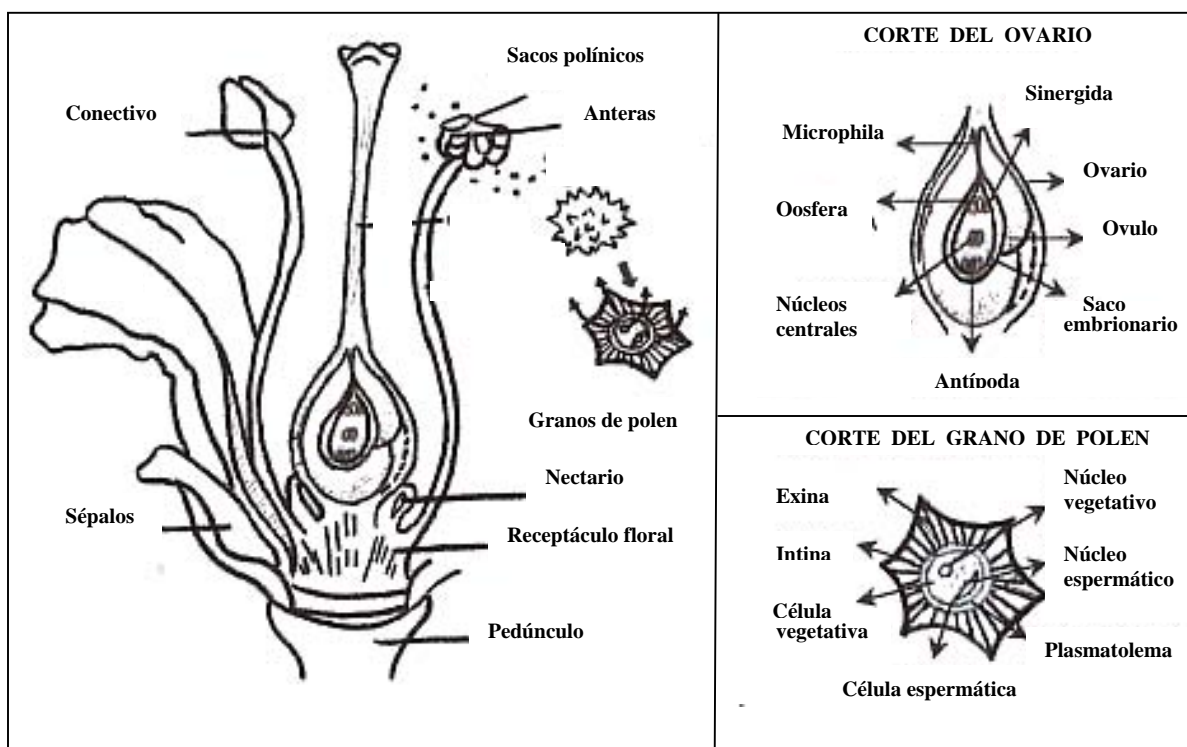


FIGURA 3 Estructura de una flor y origen del polen.

FUENTE: PEPPINO (1992).

Con respecto a la composición de los pólenes entomófilos, éstos tienen mayor cantidad de materia grasa y los carbohidratos que contienen en mayor número son los azúcares, en cambio los anemófilos tienen una menor cantidad de materia grasa y los carbohidratos que contienen en mayor número son los almidones (JEAN-PROST, 1995).

El color en los granos de polen es atribuido a dos grupos de pigmentos que se encuentran en la exina, capa externa del polen; los flavonoides solubles en agua; y los derivados del caroteno (carotenoides y xantofilas) solubles en grasa (GRAHAM, 1993).

El tamaño del grano de polen varía por especies desde menos de 5 μm hasta más de 200 μm (STANLEY y LINSKENS, 1974). Por ejemplo, se ha encontrado que el tamaño del

grano de polen de algunas saxifragáceas es de 8 μm y el del lirio es de 250 μm (ROOT, 1976).

2.2.2 Estructura del grano de polen. El grano de polen es un elemento muy complejo, éste se compone de núcleo, el protoplasma y un esporoderma sumamente resistente (TALPAY, 1978).

Las variaciones en el aspecto exterior de los granos son ilimitadas, los granos pueden tener forma globular, elipsoidal, poliédrica, etc. La cubierta externa puede ser lisa, rayada, ribeteada o con aspectos de cuadraditos y rodeada de dientes, espinas, puntas o protuberancias de variadas formas. El aire, encerrado en los diminutos orificios y huecos de la superficie, protege los granos de la acción del agua. Por otro lado, las proyecciones les permiten adherirse a los insectos que se posan sobre las flores (ROOT, 1976).

En la FIGURA 4 se presentan ejemplos de granos de polen de diferentes fuentes.

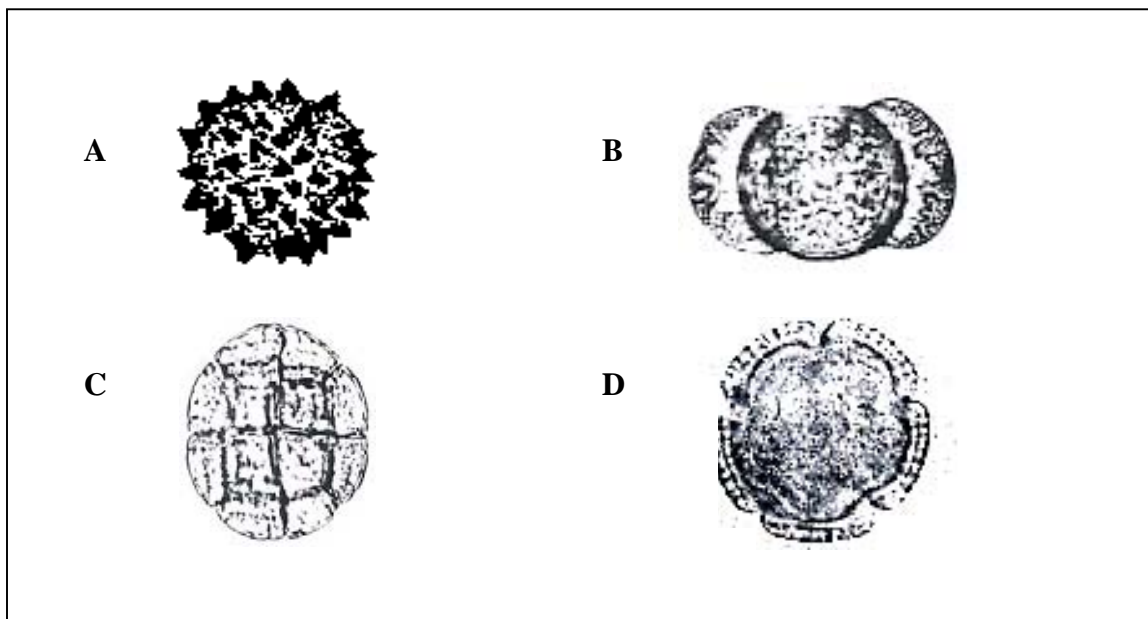


FIGURA 4 Granos de polen. A: polen de malva, B: polen de pino, C: polen de acacia, D: polen de limón.

FUENTE: JEAN – PROST (1995) y CARRETERO (1989).

El esporoderma es la cubierta externa del polen, representa sólo una pequeña parte de la masa total del polen. Su composición y estructura morfológica tienen importancia práctica, en primer lugar el esporoderma tiene por función proteger el contenido del polen incluso en condiciones extremas. En segundo término, la diversidad de su estructura morfológica puede servir a los palinólogos para identificar el polen (TALPAY, 1978).

El esporoderma está compuesto básicamente de dos capas cuya composición y estructura son distintas: la intina y la exina (TALPAY, 1978).

La intina limita la célula polínica propiamente tal, siempre se encuentra presente con un espesor homogéneo. Esta, está constituida por celulosa y es muy similar a la pared celular, encontrándose también sustancias pécticas, calosa, otros polisacáridos, enzimas y proteínas: estas últimas se encuentran en vesículas especiales, que se ubican circundando las aperturas, siendo las posibles causantes de las alergias provocadas por el polen (FIGURA 5) (Saenz, citado por OLEA, 1986).

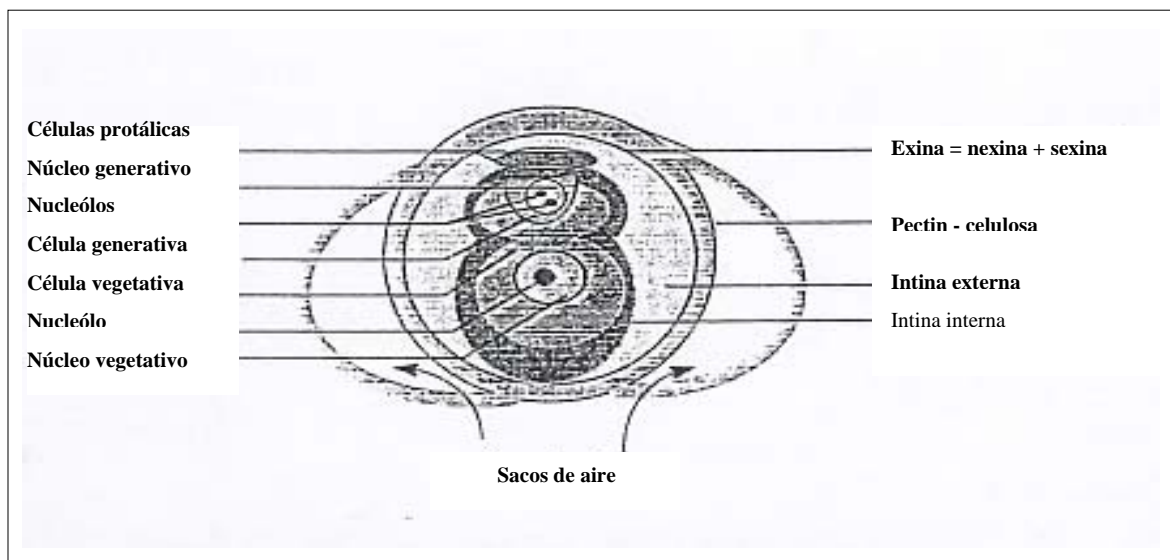


FIGURA 5 Grano de polen de gimnosperma.

FUENTE: STANLEY y LINSKENS (1974).

La exina es la capa más externa y está formada por unas sustancias llamadas esporopoleninas. La esporopolenina esta constituida por un polímero, complejo de carotenoides y ésteres de carotenoides (Moor y Webb, citado por OLEA, 1986).

Esta capa, se forma con anterioridad a la intina; presentando una gran resistencia a la destrucción por la acción de ácidos y bases concentradas, y a temperaturas de hasta 300 ° C, siendo degradada solamente por oxidantes fuertes o por microorganismos (Saenz, Citado por OLEA, 1986).

La exina, tiene la función propiamente dicha de protección del contenido del polen, está constituida de varias capas. La capa interior, nexina, tiene estructura lamelar y esta formada de 2 hasta 3 envolturas. La exterior se llama “foot-layer” y corresponde a la sexina. La sexina contiene varias sustancias oleosas, que parcialmente pertenecen a la llamada cola del polen (TALPAY, 1978).

2.2.3 Composición química del polen. Numerosos estudios han demostrado una gran variabilidad en la composición química del polen, esta variabilidad se debe a diferencias en la fuente de extracción (plantas), diferentes métodos de análisis y diferentes estaciones del año. Es también de importancia la forma de recolección del polen, es decir, por abejas o directamente de la flor. (LINSKENS y JORDE, 1997).

Según LENGLER (2000), como la saliva de la abeja es rica en enzimas, aminoácidos, vitaminas y minerales; el polen corbicular (gránulos de polen que acarrea la abeja hacia la colmena) posee una riqueza infinita en minerales, proteínas y fibras vegetales.

Analizando la composición del polen, se constató que éste esta compuesto por un 30 a 40 % de agua, 11 a 35 % de prótidos, 20 a 40 % de glúcidos (azúcares y almidón), 1 a 20 % de lípidos, 1 a 7 % de sustancias minerales; además de resinas, materias colorantes, vitaminas (A, B, C, D y E), enzimas y antibióticos (JEAN - PROST, 1995).

En el CUADRO 1 se muestra la composición química del polen presentada por GRAHAM (1993). En este se puede observar que el componente que se encuentra en mayor cantidad, en promedio, son los carbohidratos; seguidos de las proteínas.

CUADRO 1 Composición química del polen recolectado por abejas.

Componente	N ° Muestras Analizadas	Nivel promedio	Rango típico
Proteínas	277	23,70 %	7,5 – 35 %
Lípidos	52	4,80 %	1 – 15 %
Carbohidratos	47	27 %	15 – 45 %
Cenizas	60	3,12 %	1 – 5 %
Carotenos	4	95 µg/g	50 – 150 µg/g

FUENTE: GRAHAM (1993).

2.2.3.1 Contenido de carbohidratos. En la mayoría de los pólenes, los carbohidratos son los constituyentes de mayor fracción; encontrándose entre un 15 y 45 %. Estos, están constituidos mayoritariamente por azúcares simples como fructosa y glucosa. (GRAHAM, 1993).

Según Dworschak, citado por TALPAY (1978), la mayor cantidad de carbohidratos encontrados en los pólenes entomófilos son azúcares que provienen del néctar que las abejas agregan al formar los pellets de estos.

En estos pólenes, generalmente se presenta un mayor nivel de azúcares simples, este aumento en el contenido de azúcares simples es debido al uso del néctar como cementante en la formación de los agregados de polen. (STANLEY y LINSKENS, 1974).

2.2.3.2 Contenido de aminoácidos y proteínas. Los aminoácidos son la base de la vida, éstos son los constituyentes primarios de las proteínas y son de gran importancia desde

el punto de vista estructural, ya que participan directamente en la síntesis de nuevas proteínas requeridas para el crecimiento, mantenimiento y reparación de las células del cuerpo. Algunos aminoácidos requeridos se forman en el cuerpo a medida que se necesitan, pero otros sólo pueden obtenerse del alimento. A estos últimos se les denominan aminoácidos esenciales (CUADRO 2) (OSBORNE y VOOGT, 1978).

En el polen se han detectado 21 de los 23 aminoácidos y 12 de ellos son esenciales, es decir aquellos que el organismo humano no puede sintetizar (CORNEJO, 1993).

CUADRO 2 Requerimientos de aminoácidos para el hombre y aportes del polen.

Aminoácidos	Requerimientos diarios del cuerpo humano (g)	Dosis diaria Recomendada (g)	Aportes del polen (g)
Fenilalanina	1,1	2,2	17
Isoleucina	0,7	1,4	32
Leucina	1,1	2,2	30
Lisina	0,8	1,6	35
Metionina	1,1	2,2	12
Treonina	0,5	1,0	26
Valina	0,8	1,6	35

FUENTE: ASIS (1996).

Dentro de los aminoácidos encontrados en el polen se encuentran prolina, valina, leucina, triptófano, histidina, treonina, lisina, metionina, fenilalanina, alanina, asparagina, arginina, ácido glutámico, entre otros. Las cantidades de estos aminoácidos son relativamente pequeñas, salvo la prolina que se encuentra en una cantidad promedio de 2,962 g/100 g de polen (TALPAY, 1978).

Según el estudio realizado por Dworschak, citado por TALPAY (1978), el contenido de proteína de los pólenes florales es comparable con el de las leguminosas secas; lo mismo en cuanto a la posibilidad de ser digeridos.

En polen se han reportado valores de proteínas entre 5,9 y 28,3 %; sin embargo el polen de la palma datilifera (*Phoenix dactylifera*) contiene un 35,5 % de proteína, pero este polen es rico en cenizas y pobre en carbohidratos, en tanto el polen de álamo (*Populus nigra var. Itálica*), contiene 36,5 % de proteína y es regular el contenido de cenizas y carbohidratos (STANLEY y LINSKENS, 1974).

2.2.3.3 Contenido de lípidos. En el polen el contenido de lípidos asciende a un 11 %, éste es mayor que en la mayoría de las leguminosas, salvo en la soya. El contenido de ácidos grasos libres es considerable, especialmente el ácido oleico y ácido linoleico, cuya suma alcanza al 55 % del total de lípidos. (TALPAY, 1978).

Según Serra y Scola citado por POZAS (2000), el polen presenta una relación entre los ácidos grasos insaturados / saturados de 1,96 con lo cual sería valiosa su contribución para reducir o preveer la formación de colesterol – LDL (lipoproteína de baja densidad).

2.2.3.4 Contenido de minerales. El contenido de minerales en el polen, cenizas, es muy variable; éste puede ir desde 1,4 % a 12,4 % del peso seco. (STANLEY y LINSKENS, 1974).

Según LENGLER (2000) el polen es una gran fuente de oligo – minerales. Estos son elementos químicos que el organismo humano necesita en pequeñas cantidades y que no se encuentran en la mayoría de los productos alimenticios. En el polen se encuentran titanio, níquel, cobalto y silicio entre otros.

DADANT e HIJOS (1975), indican que los minerales encontrados en un análisis de polen fueron calcio, magnesio, fósforo, fierro, sodio, potasio, aluminio, manganeso, azufre y en especial cobre.

En el CUADRO 3 se indica en forma detallada la composición de algunos minerales que se encuentran presentes en el polen, según Dworschak, citado por (TALPAY, 1978).

En el se observa que los minerales de mayor contenido en el polen son potasio, fósforo, calcio, magnesio; y los de menor contenido cinc, cobre, plomo, cromo, molibdeno, cobalto y manganeso.

CUADRO 3 Composición mineral del polen.

Minerales	Cantidad
Potasio	400 mg/100 g
Fósforo	194 mg/100 g
Calcio	178 mg/100 g
Magnesio	94 mg/100 g
Sodio	28 mg/100 g
Cinc	75,5 mg/kg
Cobre	10,5 mg/kg
Plomo	0,72 mg/kg
Cromo	0,24 mg/kg
Molibdeno	0,137 mg/kg
Cobalto	0,127 mg/kg
Manganeso	0,0072 mg/kg

FUENTE: TALPAY (1978).

2.2.3.5 Contenido de vitaminas. Las vitaminas son micronutrientes esenciales de la dieta, que poseen una gran actividad biológica; no contribuyen con energía, pero participan en la movilización y en el metabolismo de materia y energía (TAGLE, 1980).

Las vitaminas deben ser aportadas por los alimentos debido a que el organismo humano no los puede sintetizar, la mayor parte de ellas son sintetizados por las plantas y microorganismos; otros sólo por microorganismos (PRIMO, 1997).

Los requerimientos vitamínicos del cuerpo humano son usualmente suministrados por una dieta balanceada. Una deficiencia de estas puede producir hipovitaminosis y si es más severo, avitaminosis. Estas pueden ser causadas además por desordenes de absorción, estrés y otras enfermedades (BELITZ y GROSCH, 1987).

Según ROBINSON (1991), las vitaminas pueden ser clasificadas en dos grupos: las solubles en grasas, tales como las vitaminas A, D, E y K, y aquellas que son solubles en agua como la vitamina C y las del complejo B.

El polen contiene normalmente siete vitaminas del complejo B: tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido pantoténico, niacina, ácido fólico y biotina. Es rico en vitamina C, encontrándose en un rango de 136 µg/g a 1943 µg/g según la época del año. Además, posee pequeñas cantidades de vitamina D y E y aunque, en éste no se encuentra vitamina A, si posee carotenoides, los cuales son precursores de ésta. La variación en la composición vitamínica del polen depende básicamente de la fuente floral y de la época del año en que éste es recolectado (GRAHAM, 1993).

Según Dworschak, citado por TALPAY (1978), el contenido de vitamina B₁ en el polen es casi el doble comparado con el de la carne y el hígado, la cantidad de vitamina B₂ y ácido nicotínico son comparables con los de otros productos animales.

Según LENGLER (2000), en el polen se han identificado casi todas las vitaminas que se conocen hasta el momento, siendo particularmente rico en carotenoides (provitamina A). Esta autora informa que el polen de acacia posee una cantidad casi veinte veces mayor de caroteno que la zanahoria, que es considerada la principal fuente de esta vitamina.

2.3 Utilización del polen

Desde muchos años atrás, el polen viene siendo utilizado por el hombre básicamente en dos áreas: la apicultura y el consumo humano.

2.3.1 Utilización del polen por la colmena. En la colmena el polen es de vital importancia, esto se debe a que constituye la única fuente de alimento nitrogenado para las larvas de abejas. Entre sus funciones se encuentra: que al ser administrado a las larvas, a partir del tercer día después del nacimiento, provoca la atrofia de sus órganos

genitales o castración alimentaria y su evolución a obreras. Por otro lado el consumo de este por las abejas lleva consigo una prolongación de la duración de su vida, un desarrollo de las glándulas de tipo hipofaringe, que producen una parte de la jalea real y un crecimiento de los ovarios de las abejas recientemente nacidas. Las necesidades de polen de una colonia normal oscilan entre 30 y 40 kilos por años (JEAN-PROST, 1995; CORNEJO, 1993).

Las abejas melíferas utilizan las proteínas del polen principalmente para proveer de alimentos fundamentales a los músculos, glándulas y otros tejidos, estas son la materia base para el crecimiento y regeneración de tejidos (DADANT e HIJOS, 1975).

2.3.2 Utilización del polen por el hombre. Existen registros de consumo de polen por el hombre desde mucho tiempo atrás, se sabe que muchas tribus indígenas americanas tenían el polen como alimento dentro de su dieta básica, e incluso lo utilizaban en rituales religiosos y medicinales (LINSKENS y JORDE, 1997).

Los griegos y los romanos ya conocían las buenas cualidades del polen como alimento para el hombre, y fueron ellos quienes dieron su primer nombre a este producto, denominándolo “polenta”, que era en cierto modo, sinónimo de la fuerza o vigor que el polen transmitía a quien lo comía (CORNEJO, 1993).

En los tiempos actuales, en los que se persigue disponer de alimentos sanos, ha aumentado la demanda del polen, considerándolo una valiosa sustancia rica en nutrientes y buena para la salud. Muchas personas después de ingerir polen se encuentran magníficamente, por lo que lo consumen en forma regular (LAMPEITL, 1988).

Hoy en día el polen presenta un creciente interés en el mercado mundial, especialmente en los países desarrollados. El precio internacional es de 5 a 7 dólares americanos por kilogramo y los países compradores son cada vez más exigentes en cuanto a la calidad de este producto (CORNEJO, 1993).

Según CRANE (1990), el polen producido comercialmente es usado para una variedad de propósitos especializados, dentro de los cuales se incluyen:

- Programas de reproducción de plantas.
- Polinización de frutales.
- Para alimentación de abejas, sólo o con material suplementario.
- Como fuente de ciertos compuestos que este contiene.
- Como dieta suplementaria en alimentación humana y animales domésticos.
- En el estudio y tratamiento de alergias, tales como la fiebre del heno.
- Como control de la contaminación ambiental con polen.
- Y en estudios de los minerales y fósiles.

La acción del polen sobre el organismo humano ha sido estudiada muy especialmente desde 1950. Numerosas publicaciones científicas afirman que los efectos beneficiosos de éste son muchos y bien definidos. (Chauvin y Lenormand, citado por JEAN – PROST, 1995). Estos autores han clasificado los beneficios del polen de la siguiente forma:

- a) Acción reguladora de las funciones intestinales en el caso de los enfermos que padecen estreñimiento crónico, o por el contrario, de diarreas crónicas de origen interno, resistente a los antibióticos.
- b) En el caso de niños anémicos, el polen provoca una elevación rápida de la tasa de hemoglobina en la sangre.
- c) El polen conlleva a un rápido incremento del peso y de las fuerzas en los convalecientes, y es un notorio euforizante.

El efecto del polen sobre las funciones intestinales, sobre la composición de la sangre (mayor concentración de glóbulos rojos, blancos y azúcares) y sobre el estado de ánimo tiene como consecuencia un mejor apetito, una recuperación del peso y fuerzas, un aumento en el crecimiento de niños deficientes o desnutridos, y una actividad cerebral

estimulada y mejorada (JEAN-PROST, 1995; SALAMANCA *et al.*, 2001 y PERCIE, 2001).

En el mundo se han suplementado con polen las dietas de pacientes con diferentes enfermedades. Pacientes con enfermedades parenquimatosas del hígado, prostatitis y arteriosclerosis; encontrando notables mejoras del estado clínico de estos enfermos, además de resultados positivos en los exámenes bioquímicos (TALPAY, 1978).

Según Traub, citado por DADANT e HIJOS (1975), se ha sugerido el uso del polen en el hombre para mantener en buenas condiciones la glándula prostática.

Según Chauvin, citado por TALPAY (1978), la importancia del polen para el hombre radica en que apoya la función normal de los órganos. El polen tiene efectos positivos tanto en problemas gastrointestinales como la diarrea y en el estreñimiento, tanto en la obesidad como en la falta de peso normal.

Según Bolun, citado por LENGLER *et al.* (1999), el polen ha sido usado como estimulante de las hormonas sexuales y para el tratamiento de la esterilidad, para regular el sistema nervioso central, para las dolencias seniles, como regulador de desordenes metabólicos y para las dolencias de la próstata.

2.4 Toxicidad del polen

Si bien es cierto no existe mucha información acerca de la toxicidad del polen en el hombre, JEAN-PROST (1995), menciona que ciertos pólenes como el de una especie de ranúnculo y otro de tilo, son la causa de la enfermedad de las abejas conocida como el mal de mayo.

De existir toxicidad en el polen, esta proviene de compuestos químicos aportados por las plantas que proveen dicho polen, Según HOFFMANN *et al.* (1992), existen sustancias activas en ciertas plantas que constituyen venenos fuertes para el hombre.

Algunas plantas con compuestos tóxicos para el hombre se presentan en el CUADRO 4.

CUADRO 4 Plantas tóxicas para el hombre.

Compuesto que aporta Toxicidad	Nombre científico de la planta	Nombre común de la planta
Alcaloides	<i>Lupinus spp.</i>	Lupino
Saponinas	<i>Colliguaja integerrima</i>	Coliguay
Solaninas	<i>Solanum nigrum</i>	Hierba mora
Glucósidos	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Falsa acacia
Toxoalbúminas	<i>Ricinus comunis</i>	Ricino

FUENTE: MONTENEGRO (2000).

2.5 Flora apícola predominante en la zona de recolección de muestras

En el CUADRO 5 se presenta la flora apícola presumiblemente visitada por las abejas en la zona del estudio, de acuerdo a información del apicultor; con su nombre común, nombre científico y familia a la cual pertenecen.

CUADRO 5 Flora arbórea presumiblemente visitada por las abejas en la zona de estudio.

Nombre común	Nombre científico	Familia
Chagual, puya o cardon	<i>Puya berteroriana Mol.</i>	Bromaliaceae
Litre	<i>Lithrea caustica. (Mol) H et A.</i>	Anacardiaceae
Molle o lilen	<i>Schinus latifolius (Gill ex Lindl) Engler.</i>	Anacardiaceae
Palto o aguacate	<i>Persea americana, Miller.</i>	Lauraceae
Peumo	<i>Cryptocarya alba (Mol) Looser.</i>	Lauraceae
Sauce	<i>Salix caprea L.</i>	Salicaceae

FUENTE: MONTENEGRO (1984).

2.6 Carotenoides

Según MARTÍNEZ (1998), los carotenoides se identificaron por primera vez hace 150 años, al descubrirse la naturaleza química del pigmento amarillento, luteína, que hace que las hojas de los árboles nos ofrezcan cada otoño su apariencia dorada.

Estos compuestos son estructuras liposolubles que aportan los colores rojos, naranja y amarillos a muchos alimentos. Las sustancias incluidas bajo la denominación de carotenoides sólo pueden ser sintetizadas por las plantas y llegan a los tejidos animales a través de la dieta y allí pueden ser modificados o acumulados (BELITZ y GROSCH, 1997).

En la actualidad se utilizan varios carotenoides en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmetológica. El Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile en su artículo 145, menciona a apocarotenal (β - apo 8' carotenal), astaxantina, cantaxantina, α -, β -, γ - caroteno, éster etílico del ácido β - apo 8' carotenoico y oleorresinas del pimentón, no indicando una concentración máxima permitida (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2002).

2.6.1 Clasificación de los carotenoides. Los carotenoides se pueden clasificar en dos grupos: Los carotenos y las xantofilas. Los primeros son aquellos que sólo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo el β - caroteno, el licopeno, etc.) en cambio las xantofilas contienen además oxígeno (por ejemplo la luteína) (MARTINEZ, 1998).

2.6.2 Estructura y propiedades importantes. Los carotenoides son hidrocarburos poliénicos, formados por ocho unidades isoprenoides de 5 átomos de carbono cada una (tetraterpenos) y que poseen consiguientemente un esqueleto de 40 átomos de carbono (FIGURA 6) (BELITZ y GROSCH, 1997; RODRIGUEZ – AMAYA, 1999).

Según RODRIGUEZ – AMAYA (1999) y KRINSKY (1993) esta documentada la existencia de 600 carotenoides encontrados en la naturaleza, principalmente en fuentes vegetales debido a la capacidad de las plantas para sintetizar estos compuestos a partir de precursores biosintéticos.

El contenido de carotenoides en alimentos de origen vegetal está determinado por varios factores, como son: variedad, parte comestible de la planta, grado de madurez, clima o

lugar geográfico de producción, cosecha y manejo post - cosecha, procesamiento y almacenamiento (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

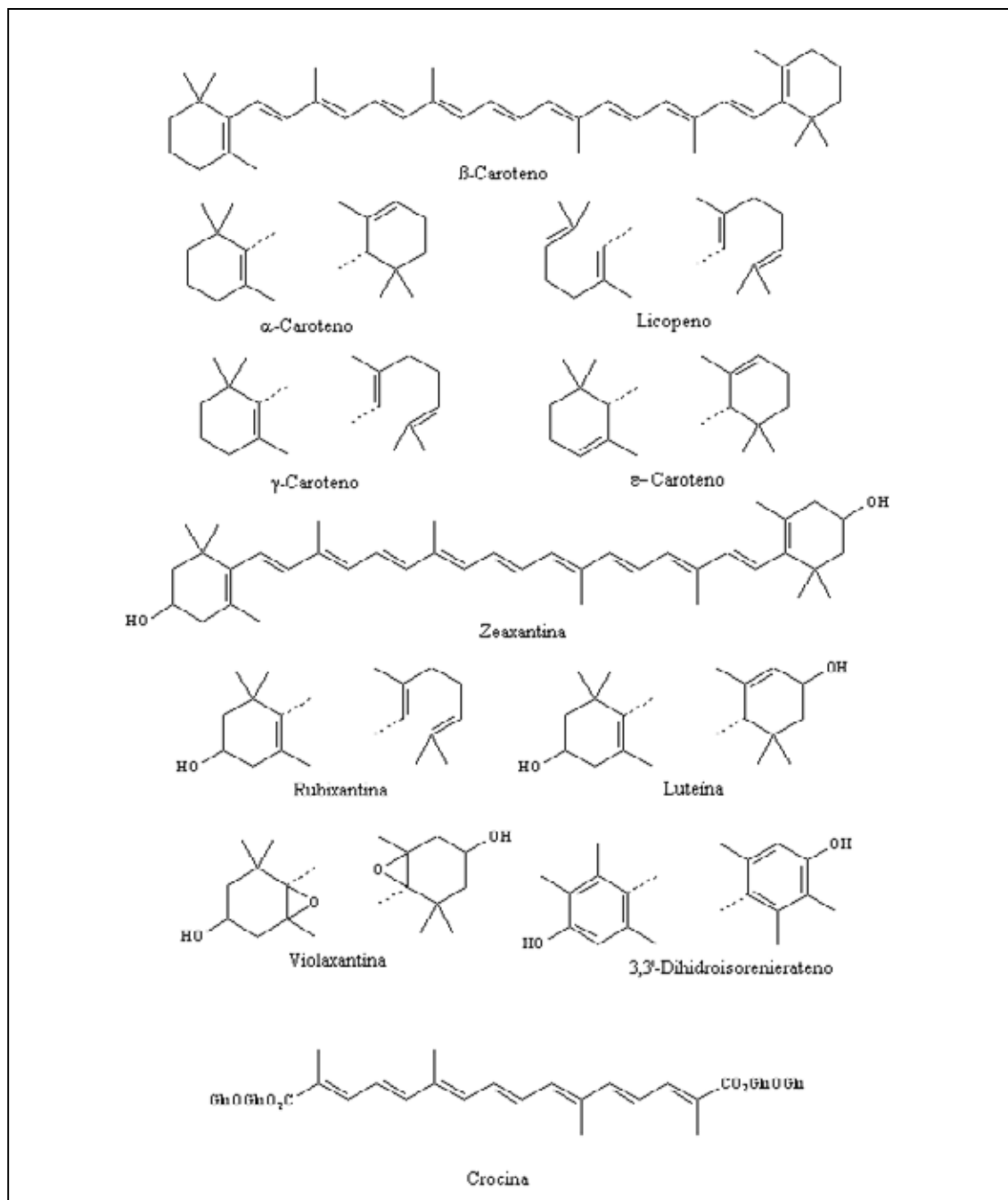


FIGURA 6 Ejemplo de carotenoides distribuidos en la naturaleza.

Fuente: PRIMO (1997).

En general los carotenoides se caracterizan por ser en su mayoría insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como éter de petróleo, hexano, tolueno (principalmente los carotenos), etanol y metanol (principalmente las xantofilas). Además, su extenso sistema de dobles enlaces conjugados constituye un cromóforo que proporciona el color característico a estos compuestos. Según su estructura, los carotenoides presentan espectros de absorción y longitud de onda de máxima absorción característica para cada compuesto (entre 400 y 500 nm) (FIGURA 7). Esta propiedad es la que se utiliza en su identificación y/o cualificación ya sea cuando son previamente aislados o separados en columnas cromatográficas, o bien, analizados mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) (MONTENEGRO *et al.*, 1992).

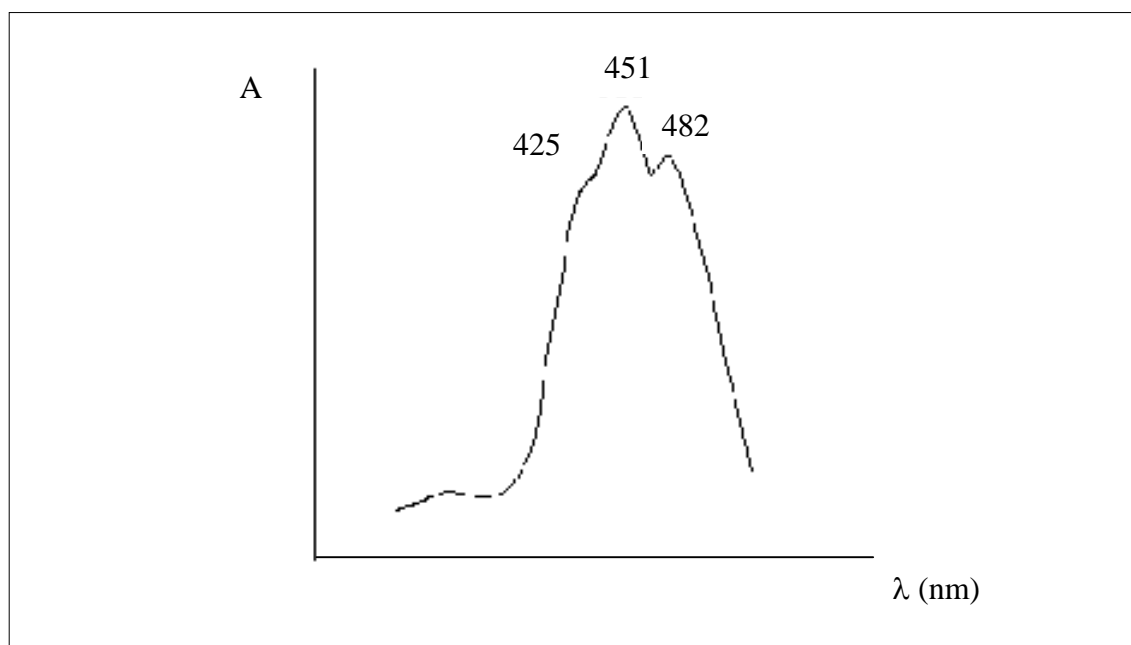


FIGURA 7 Espectro visible del β-caroteno en n-hexano

FUENTE: BELITZ y GROSCH (1987).

2.6.3 Actividad biológica de los carotenoides. Hoy en día la importancia de los carotenoides en los alimentos dejó de ser su función como colorante debido a sus propiedades de precursor de la vitamina A (o provitamina A) (FIGURA 8) y a la acción biológica como antioxidantes. (OSBORNE y VOOGT, 1978).

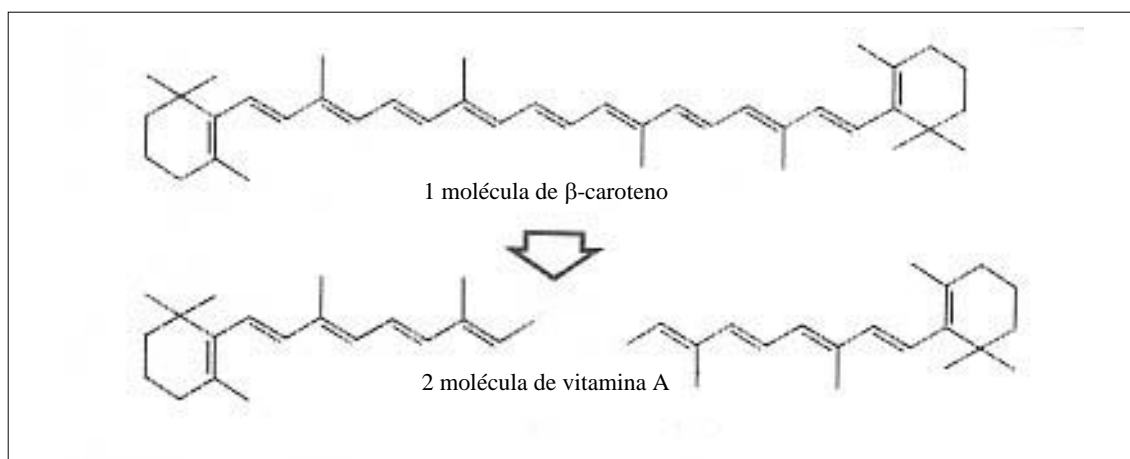


FIGURA 8 Vitamina A y su derivación del β - caroteno.

FUENTE: PRIMO (1997).

El β - caroteno es la provitamina A más importante, tanto en términos de biopotencia como por su presencia en la naturaleza. De 10 a 50 % del β - caroteno ingerido es absorbido en el tracto intestinal y luego parcialmente convertido en vitamina A (GARCIA-CASAL *et al.*, 1997).

Teóricamente la conversión de β - caroteno a vitamina A es de 1:2, pero en la práctica se ha encontrado que la eficiencia de la bioconversión del β - caroteno a vitamina A en el cuerpo humano es de 6 : 1 (PRIMO, 1997; NESTEL y TRUMBO, 1999).

2.6.4 Distribución y estado natural. Los carotenoides están presentes ampliamente en el reino vegetal, en bacterias, y muy pocos se han mencionado en animales (por ejemplo el color rojizo de las plumas del flamenco se debe a la cantaxantina), y particularmente invertebrados marinos como estrellas, pepinos y erizos de mar. En los animales superiores el β - caroteno es un requerimiento dietario esencial debido a la función de precursor de la vitamina A. algunos alimentos que contienen carotenoides son: yema de huevo, leche, mantequilla, judías verde y zanahoria (MARTINEZ, 1998; KRINSKY, 1993).

Los carotenoides se encuentran principalmente en las partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo tomates, pimentón, etc.) y en menor proporción en raíces (por ejemplo la zanahoria). Estos se encuentran en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como glicósidos. Sin embargo los glicósidos carotenoides son muy raros, un ejemplo de éstos últimos es la crocina (MARTINEZ, 1998).

2.6.5 Estabilidad de los carotenoides. Los carotenoides poseen dobles enlaces conjugados, siendo inestable en estado puro. Se destruyen a altas temperaturas, por efecto de la luz solar y ácidos, y por la presencia de oxígeno. La luz y los ácidos favorecen reacciones fotoquímicas y químicas que cambian la estructura original del carotenoide (por ejemplo promueven la isomerización de su configuración usual trans a la forma cis), la temperatura favorece reacciones térmicas de degradación y el oxígeno favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxidos, hidroxilos y peróxidos entre otros. Esta destrucción se ve reflejada en la decoloración de éstos y produce una pérdida de la potencia de vitamina A. Los carotenoides además son oxidados por los peróxidos de las grasas y por tanto se destruyen bajo condiciones que favorecen la oxidación de estas, incluida la presencia de trazas de cobre y el menor grado de hierro (OSBORNE y VOOGT, 1978).

RODRIGUEZ – AMAYA (1999), menciona dentro de los carotenoides más lábiles frente a la oxidación la luteína y la violaxantina.

2.6.6 Importancia nutricional de los carotenoides. Los carotenoides son de gran importancia en los seres humanos debido a su función precursora de vitamina A, debido a que esta vitamina, es un nutriente vital para el organismo humano, el que la utiliza para la diferenciación celular, para la visión, el desarrollo óseo, la reproducción e integridad del sistema inmunológico. La deficiencia de ésta vitamina puede producir anemia que sólo se puede revertir con suplementación de vitamina A. (GARCIA-CASAL *et al.*, 1997).

Recientemente se han atribuido a los carotenoides acciones biológicas como fortalecimiento del sistema inmunológico, disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares, prevención de la disminución macular y formación de cataratas (BENDICH, 1989; POPPEL y GOLDBOHM, 1995; ZIEGLER, 1989; KOLHMEIER y HASTINGS, 1995; TAYLOR *et al.*, 1995; BURTON, 1989; MARTINEZ, 1998).

La prevención de la degeneración macular visual, se debe a que la retina de nuestros ojos esta compuesta por una capa de carotenoides luteína y zeaxantina, que forman el llamado pigmento ocular. Estos probablemente actúan como filtro protegiéndonos de las radiaciones luminosas de baja longitud de onda presentes en el espectro (MARTINEZ, 1998).

Recientes estudios epidemiológicos muestran una relación inversa entre la ingesta de β - caroteno y el riesgo de cáncer al pulmón. Hoy en día se estudia posibles relaciones entre el β - caroteno y el riesgo de cáncer al colon, cáncer cerebral, cáncer de mamas, cáncer de garganta y enfermedades cardiovasculares (COOPER *et al.*, 1999; SLATTERY *et al.*, 2000; MUÑOZ *et al.*, 1999; ALBANES, 1999; HERCBERG *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 1999; KNEKT *et al.*, 1999; PRIMO, 1997).

Otra propiedad del β - caroteno es que incrementa la absorción del hierro y además previene el efecto inhibitorio de polifenoles sobre la absorción de este. (GARCIA-CASAL *et al.*, 1997).

2.6.7 Propiedades antioxidantes de los carotenoides. Estudios que se han realizado actualmente han concluido que uno de los mayores beneficios proporcionado por los carotenoides y compuestos fitoquímicos es su acción antioxidante. Estos compuestos buscan partículas conocidas como radicales libres de oxígeno. Estas partículas inestables son productos derivados de muchos de los procesos químicos habituales del cuerpo humano y se ven incrementados por el consumo de tabaco, ingesta de alcohol, las toxinas medioambientales y el estrés (LOZANO, 1997).

Los radicales libres pueden dañar las membranas celulares e interactuar con el material genético, contribuyendo posiblemente al desarrollo de una serie de problemas incluido el cáncer, enfermedades cardíacas, cataratas e incluso envejecimiento. Estas partículas pueden aumentar las peligrosas propiedades del colesterol, lipoproteína de baja densidad (LDL), uno de los factores más importantes en la aparición de la arteriosclerosis (LOZANO, 1997).

Antioxidantes como las vitaminas A, C, y E, carotenoides, y muchos fitoquímicos pueden neutralizar los radicales libres y pueden reducir o incluso evitar parte de los daños (LOZANO, 1997; JUN *et al.*, 2000).

2.6.8 Extracción y aislamiento de carotenoides. Debido a la estabilidad de los carotenoides, la extracción y aislamiento se debe realizar preferiblemente en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, y en ausencia de oxígeno (por ejemplo con una atmósfera artificial de nitrógeno). Además debe realizarse lo más rápido posible y a partir de tejidos frescos para evitar la degradación por la acción conjunta de estos factores adversos (KIMURA y RODRIGUEZ – AMAYA, 1999).

Debido a que los carotenoides en su mayoría son solubles en solventes apolares como éter de petróleo, benceno, cloroformo y acetato de etilo, entre otros; y a que se debe trabajar con tejidos frescos, los cuales generalmente presentan un alto contenido de agua la cual dificulta una extracción eficiente, es conveniente eliminarla. Un procedimiento recomendable es deshidratar los tejidos con etanol o metanol a ebullición, seguido de una filtración. Y luego se puede realizar la extracción con un solvente apolar. Una alternativa a este proceso de deshidratación es la liofilización, la que resulta ventajosa porque se realiza a baja temperatura y al vacío, eliminando la posibilidad de degradación por altas temperaturas y presencia de aire (MARTINEZ, 1998; KIMURA y RODRIGUEZ – AMAYA, 1999).

Una vez obtenido el extracto o los extractos de carotenoides, estos se pueden separar y analizar por cromatografía en capa fina, en papel, en columna o cromatografía líquida de

alto rendimiento (HPLC). El método de cromatografía a utilizar va a depender básicamente del grado de separación que se desea obtener (KIMURA y RODRIGUEZ – AMAYA, 1999).

En bibliografía existen varios métodos para determinar carotenoides utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). QINGPING **et al** (s / f), propone usar una columna RP - 18, utilizando como fase móvil cloroformo:metanol:agua (4:4:1) a un flujo de 1 mL/min, con un volumen de inyección de 20 µL.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Lugar de trabajo

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Facultad de Ciencias Agrarias y el Laboratorio Central del Instituto de Botánica, de la Facultad de Ciencias. Ambos ubicados en el Campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile, en la ciudad de Valdivia.

3.2 Material

El material que se utilizó fue el que a continuación se detalla:

3.2.1 Polen. El polen utilizado para el estudio corresponde a polen corbicular, obtenido mediante trampas de polen, en las colmenas pertenecientes a una empresa apícola ubicada en la comuna de La Cruz, V Región. Se utilizó como muestra de comparación un polen comercial, pertenecientes a Colmenares Klaassen de la comuna de La Unión.

3.2.2 Material de laboratorio. Para este trabajo se utilizó materiales y equipos de los laboratorios indicados en el punto 3.1.

3.2.2.1 Reactivos. Eter de petróleo, acetona, sulfato de sodio anhidro, fosfato cálcico en polvo, β - caroteno, ácido acético glacial, ácido sulfúrico concentrado, anhídrido acético, glicerina, gelatina y fenol; todos de calidad analítica.

3.2.2.2 Material de vidrio. Vasos de precipitados de 50 y 100 ml, matraces aforados de 50 ml, pipetas de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 y 25 ml (parciales y totales), tubos de ensayo de 18 x 150 mm, matraz Erlenmeyer de 250 ml, columnas de vidrio de 10 x 250 mm, embudo de decantación de 250 ml, probetas de 10 y 100 ml, tubo para centrifuga BECKMAN J2-

HS, cubetas para colorímetro Dr. LANGE, porta objetos, cubre objetos, placas Petri y varillas de vidrio.

3.2.2.3 Equipos. Balanza analítica CHYO JK 200, microscopio óptico Carl Zeiss, baño María ASTELL, espectrofotómetro Spectronic Genesys 5, centrifuga BECKMAN J2-HS, horno MEMMERT, mezclador tipo Vortex y colorímetro DRLANGE Color – Tester LFM1.

3.2.2.4 Materiales diversos. Lana de vidrio, papel filtro cualitativo, embudos, gradillas para tubos, cubetas para espectrofotómetro de recorrido óptico de 1 cm, termómetro con escala de 0 a 100°C, mortero, pisceta, bolsas de nylon de 10 x 12 cm, propipeta universal, bisturí, agujas enmangadas, pincel, lupa, y cápsulas de aluminio para gravimetría (FIGURA 9).



FIGURA 9 Materiales utilizados en la extracción de caroteno con solvente.

3.3 Método

La metodología de trabajo que se utilizó en la investigación se describe en los siguientes puntos.

3.3.1 Diseño experimental. Se aplicó un diseño experimental de tipo factorial de 3 x 2, el cual se presenta en el CUADRO 6, con 2 tipos de muestreos a 3 niveles (coloración).

CUADRO 6 Diseño experimental.

Factores	Niveles	Respuestas
Muestreo semanal (n=12) Muestreo por sector (n=7)	Tonos amarillos Tonos anaranjados Tonos verdosos	Humedad Contenido de carotenos Color Origen botánico Caracterización morfológica (forma, tamaño y peso)

Los análisis químicos se hicieron en duplicado, analizando un total de 57 muestras (19 muestras x 3 niveles de color x 2 repeticiones).

La caracterización de las corbículas de polen se realizó a las 57 muestras (19 muestras x 3 niveles de color x 3 repeticiones).

3.3.2 Toma de muestras. La recolección de polen se llevó a cabo durante el período de floración del bosque nativo de la V región, específicamente entre los meses de octubre y diciembre del año 2000. Se tomaron muestras del acopio del predio en forma semanal, durante 12 semanas. Posteriormente, durante la última semana del muestreo (semana N ° 13), se obtuvieron siete muestras de acuerdo a la ubicación geográfica de las colmenas, dentro del predio. Las muestras fueron envasadas al vacío en paquetes de entre 25 y 50 gramos, los que fueron protegidos de la luz durante el traslado y hasta el momento de realizar el análisis en el laboratorio. En el ANEXO 1, se presenta un cuadro detallando el muestreo realizado.

3.3.3 Preservación de las muestras. Las muestras se mantuvieron, hasta el momento del análisis, envasadas al vacío; en condiciones de refrigeración y protegidas de la oscuridad; para así evitar el enmohecimiento del polen y la degradación de los carotenoides.

3.3.4 Preparación de las muestras. Las muestras, incluida la muestra comercial, fueron separadas por color de las corbículas en tres tonalidades: amarillos, naranjos y verdosos para luego ser analizadas en forma separada (FIGURA 10). Esto se realizó poniendo los cúmulos de polen sobre un fondo blanco y separándolos con la ayuda de un pincel y una lupa.

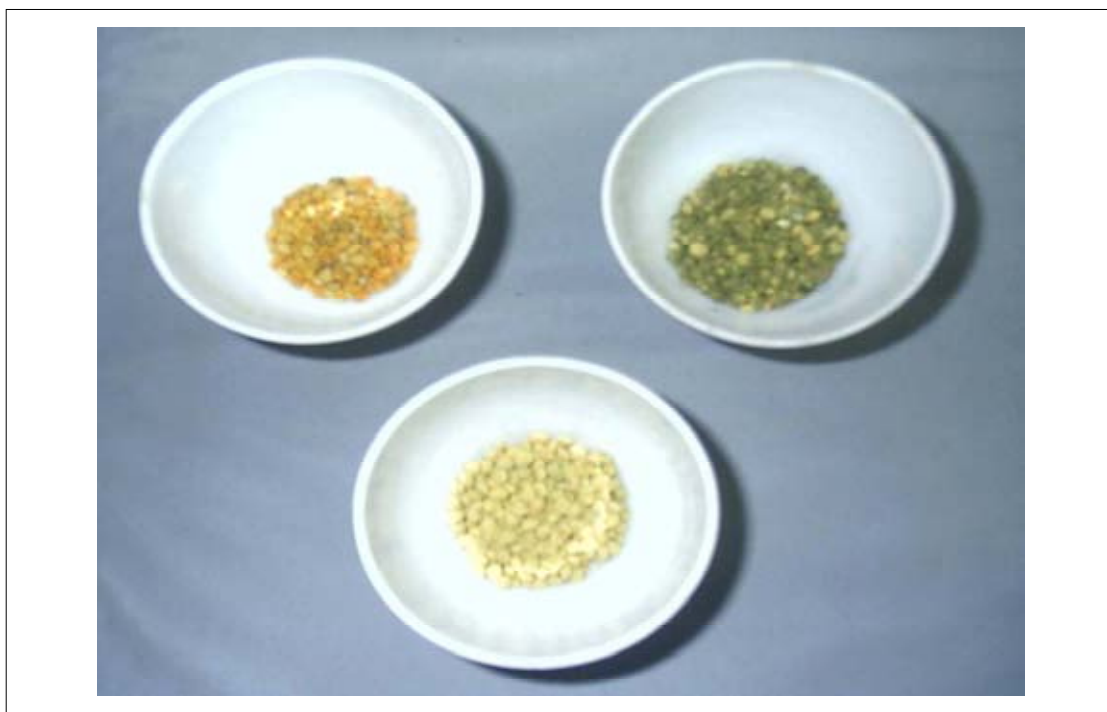


FIGURA 10 Corbículas de polen separadas por color (amarillo, naranja y verde).

3.3.5 Métodos de análisis

Los métodos de análisis que se utilizaron en ésta investigación son los que a continuación se detallan.

3.3.5.1 Determinación del contenido de humedad. La determinación de humedad se realizó analizando las muestras con un método gravimétrico, método AOAC (1995) N ° 3.7.01, modificado, en cuanto a la cantidad de muestra a 1 g, por CAMPUSANO (1999).

3.3.5.2 Determinación del contenido de carotenos. El contenido de caroteno del polen se realizó utilizando un método cromatográfico de columna abierta descrito por BERNAL (1993). Este método consiste en una extracción de los carotenos con éter de petróleo, seguido de una separación cromatográfica de columna, utilizando como medio filtrante fosfato cálcico en polvo. Posteriormente se determinó la concentración de la muestra por espectrofotometría interpolando los resultados en una curva de calibración.

3.3.5.2.1 Extracción de carotenos con solvente. Para la extracción de carotenos se pesó 1 g de muestra, se colocó en un mortero y luego se agregó 20 ml de una solución de éter de petróleo – acetona (1 : 1) previamente refrigerada, para luego moler el material con la mano del mortero. Se dejó decantar y se traspasó el sobrenadante a un embudo de decantación de 250 ml con 60 ml de agua destilada; luego se repitió la molienda y extracción del polen que quedó en el mortero tres veces, hasta que el extracto no presentaba coloración, pasando los sobrenadantes al embudo de decantación. Se agitó bien el embudo con movimientos centrífugos y se dejó separar las dos capas. Se descartó la capa acuosa inferior, y se repitió el lavado con agua destilada dos veces más. Este lavado tiene por objeto remover la acetona y demás sustancias solubles en agua que se encuentran en el extracto (FIGURA 11).

Luego se filtró el extracto que quedó en el embudo de decantación a través de papel filtro cualitativo, Whatmann N ° 5, en cuyo fondo se puso una punta de espátula de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), luego se diluyó el extracto filtrado (capa etérea libre de acetona y agua) llevándolo a un volumen de 50 ml (FIGURA 12).



FIGURA 11 Separación de las dos fases en la extracción del caroteno. La fase etérea conteniendo los carotenos y la fase acuosa con acetona.



FIGURA 12 Filtración del extracto etéreo conteniendo los carotenos.

3.3.5.2.2 Separación por cromatografía de columna abierta. Se empacó una columna de vidrio de 10 x 250 mm. poniendo un tapón de lana de vidrio y sobre él fosfato tricálcico en polvo hasta formar una capa de 3.5 cm de altura. Posteriormente se golpeó suavemente con un lápiz de madera para empacar en forma homogénea el polvo y evitar que queden espacios con aire que interfieren en la corrida cromatográfica. Luego se hizo pasar por la columna una alícuota de 5 ml del extracto, esto se realizó muy lentamente, agregándolo por las paredes de la columna en pequeñas cantidades con una pipeta Pasteur. Se recibió el eluyente en una probeta graduada de 10 ml y se siguió añadiendo éter de petróleo hasta no observar coloración amarilla en la parte inferior de la columna.

De acuerdo a KIMURA y RODRÍGUEZ – AMAYA (1999), tanto la extracción como la separación cromatográfica se realizaron bajo campana de extracción; debido a la toxicidad del solvente. Se trabajó además evitando la entrada de luz al laboratorio con cortinas negras e impidiendo el trabajo con ácidos en el mismo laboratorio para evitar la degradación y pérdida de carotenos (FIGURA 13).



FIGURA 13 Lugar de trabajo para la extracción y separación de carotenos.

3.3.5.2.3 Determinación espectrofotométrica. Se determinó la densidad óptica de las muestras a una longitud de onda de 450 nm utilizando como blanco éter de petróleo. A todas las muestras que presentaban una absorbancia mayor a 0.8 se le realizó diluciones con el objeto de cumplir con la Ley de Lambert Beer, linealidad entre la densidad óptica y concentración para absorbancias inferiores a 0,8 (WILLIAMS y WILSON, 1981).

3.3.5.2.4 Curva de calibración. Para realizar la curva de calibración se utilizó un estándar de β - caroteno de calidad analítica, del Laboratorio Sigma. Se hizo una solución patrón N° 1 de 0,5 mg de caroteno por ml, a partir de esta se preparó una solución patrón N° 2 de 20 μg de caroteno por ml. Esta última se obtuvo tomando 2 ml de la solución patrón N° 1, se puso en un matraz aforado y se llevó a 50 ml.

Los puntos de la curva fueron concentraciones de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Estos se obtuvieron tomando 0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml y 1,0 ml de la solución patrón N° 2 y diluyéndolos hasta 10 ml. La curva de calibración se presenta en la FIGURA 14.

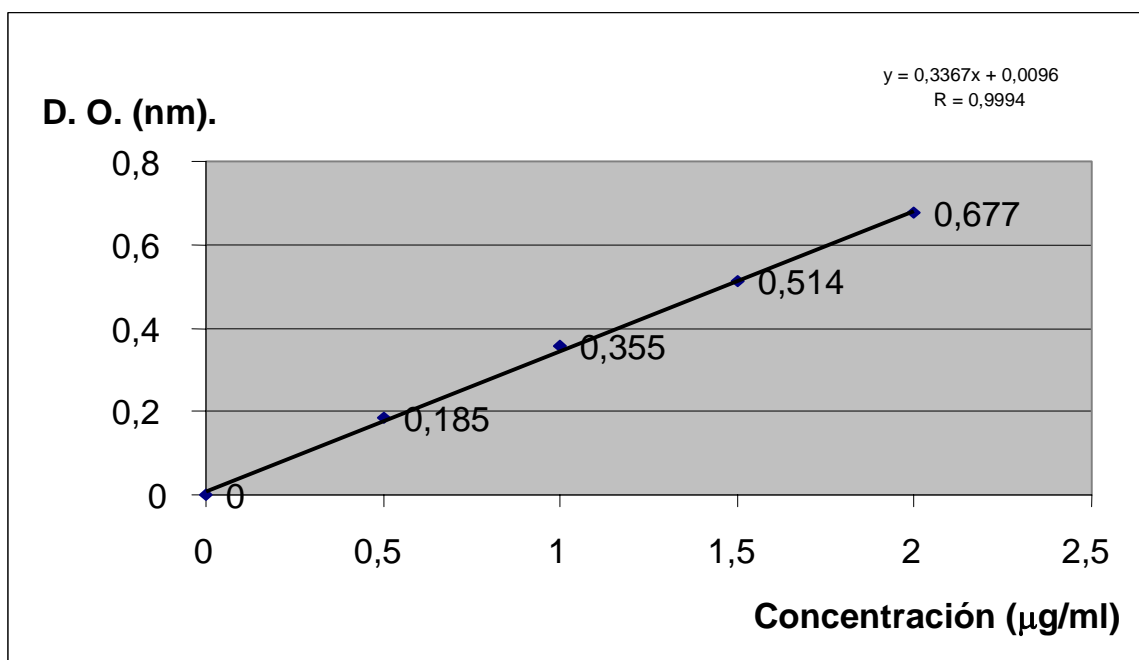


FIGURA 14 Curva de calibración de análisis de carotenos.

3.3.5.2.5 Prueba de recuperación de carotenos. Para evaluar la posible pérdida de carotenos en la separación cromatográfica en columna abierta, se realizó una prueba de recuperación de carotenos, cromatografiando los puntos de la curva de calibración y determinando luego, mediante espectrofotometría, la concentración del eluyente para finalmente calcular el porcentaje de pérdida.

3.3.5.2.6 Determinación con HPLC. Se realizó la medición del contenido de caroteno de una de las muestras, en sus tres niveles de color, además de la muestra de comparación, mediante la utilización de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La muestra utilizada para este ensayo corresponde a la muestra número 12. Esta medición se llevó a cabo utilizando el método descrito por QINGPING *et al.* (s / f).

El equipo y las condiciones de la corrida cromatográfica utilizada son:

- Equipo HPLC : bomba Merck Hitachi L 6200 A, detector UV – Vis Merck Hitachi L4250
- Columna : RP 18 de 12,5 cm de largo y 5 μ m tamaño de partícula
- Fase móvil : cloroformo – metanol – agua (4:4:1)
- Fase estacionaria : Sílice monolítica
- Long. de onda : 465 nm
- Flujo : 1 ml / min
- Inyección : 20 μ L

Como la extracción del caroteno fue realizada con éter de petróleo y la corrida de HPLC necesita hexano, fue necesario realizar el cambio de solvente. Para cambiar el solvente del extracto de caroteno se tomó una alícuota de en un tubo de ensayo. Posteriormente se evaporó el éter de petróleo hasta sequedad, utilizando para esto una corriente de nitrógeno gaseoso, poniendo el tubo dentro de un baño maría a 35 ° C, finalmente se diluyeron los carotenos en hexano.

Para la cromatografía HPLC se preparó una curva de calibración con β – caroteno en solución a concentraciones de 0,05; 0,3; 0,5 y 1,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$, obteniendo un tiempo de elusión del estándar de 4,6 minutos.

3.3.5.3 Determinación del origen botánico. A cada muestra de polen se le determinó su origen botánico mediante el método de microscopía convencional, utilizando un microscopio de luz; para esto se realizó una acetólisis del polen corbicular, según ERDTMAN (1969); para disgregar los granos y poder preparar el frotis para su posterior observación al microscopio.

3.3.5.3.1 Acetólisis. Se preparó la mezcla usando una campana extractora de gases, debido a la alta toxicidad de la reacción, se mezclaron 9 partes de anhídrido acético con 1 parte de ácido sulfúrico concentrado. La adición de este último se realizó lentamente, gota a gota, debido a que la reacción producida es exotérmica, por esto se debe mantener la botella en un baño de agua fría.

Se colocaron dos corbículas de cada muestra dentro de un tubo de ensayo con 2 ml de ácido acético glacial, manteniéndolas en él durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se escurrió el ácido acético y se agregaron 4 a 5 ml de mezcla de acetólisis, con una varilla de vidrio se maceraron las corbículas para disgregar los granos de polen. La mezcla de acetólisis con los granos de polen fue transferida a tubos de centrifuga. Los tubos fueron puestos durante 15 minutos en un Baño maría a 100 °C (bajo campana de extracción), agitando suavemente, para evitar el rompimiento de los tubos.

Una vez transcurridos los 15 minutos los tubos se enfriaron a temperatura ambiente para luego centrifugar por 5 minutos a 2400 r. p. m. Posteriormente, se sacó la mezcla de acetólisis a cada una de los tubos y luego se les agregó 5 ml de agua destilada para lavar el precipitado con la ayuda de agitación en un mezclador tipo Vortex. Luego se agregó 5 ml más de agua destilada y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones

anteriores. Este lavado se realizó una vez más para luego extraer el agua y preparar las muestras para su observación microscópica.

Si los granos de polen toman una coloración oscura por la acetólisis, se debe agregar 2 ml de ácido acético glacial, 2 – 3 gotas de solución de clorato de sodio saturado, y una a tres gotas de ácido hipocloroso concentrado. Todo se mezcla con una varilla de vidrio por un par de minutos para luego centrifugar. Se extrae el líquido y la muestra se lava dos veces con agua destilada.

La preparación del frotis se realizó fijando los granos de polen, previamente acetolizados, con una mezcla de glicerina, gelatina y fenol; éste último sirve como preservante de la preparación. Se utilizó fucsina para teñir los granos y facilitar así su observación al microscopio.

3.3.5.3.2 Preservación de las muestras en glicerina – gelatina. Se utilizó la metodología de ERDTMAN (1969), para muestras acetolizadas. En un matraz de 250 ml se mezclaron 25 g de gelatina con 87,5 ml de agua destilada. A la mezcla se agregó 75 ml de glicerina y se homogeneizó en un baño de vapor, posteriormente se le incorporó 3,5 g de fenol. Toda la mezcla se homogeneizó bien, se distribuyó en tubos con tapa en cantidades de 10 ml y luego se enfriaron a temperatura ambiente, se taparon y se guardaron refrigerados.

Al momento de preparar el frotis se disolvió la gelatina de un tubo en Baño María a 60 °C y se mantuvo a esta temperatura para evitar que solidifique. Posteriormente se puso dos gotas sobre un porta objeto, se agregó una a dos gotas de agua conteniendo los granos de polen, se homogeneizó con una aguja enmangada y finalmente se colocó el cubre objeto, evitando la incorporación de burbujas que interfieren en la observación microscópica. Una vez que la preparación estaba fría, fue sellada dando una pincelada de barniz transparente en todo el perímetro del cubre objeto.

3.3.5.3.3 Análisis de origen botánico. La identificación de los granos de polen encontrados en las muestras se realizó comparando con una colección de especies conocidas, perteneciente al Instituto de Botánica de la Universidad Austral de Chile; comparando con preparaciones frescas tomadas directamente de la flor, y comparando con fotos tomadas de material bibliográfico de distintos autores como: CARRETERO (1989), CROMPTON y WOJTAS (1993), HEUSSER (1971), HODGES (1984), HOFFMANN (1978), MONTENEGRO (1984), MONTENEGRO (2000), SOCORRO y ESPINAR (1998), TEILLIER *et al.*, (1998).

La observación de los granos de polen se realizó en un microscopio Carl Zeiss con aumento de 40 X. Se observaron tres preparaciones por muestra. El procedimiento utilizado fue realizar un barrido de toda la preparación y se fotografiaron todos los granos que fueran diferentes. Para determinar la composición porcentual de cada tipo de grano se observaron seis campos microscópicos al azar, considerando dos campos por cada preparación, en cada campo microscópico se contó la cantidad de granos de cada tipo que estaban presentes y luego se calculó la composición de cada muestra. En caso de que los campos microscópicos no fueran representativos, debido a una cantidad de muestra insuficiente, se consideró dos barridos horizontales a lo largo de cada preparación.

3.3.5.4 Caracterización según color. Para determinar el color de las corbículas de polen de cada muestra se utilizó un colorímetro DRLANGE Color – Tester LFM1, obteniendo un punto de tres coordenadas que luego se interpoló en la carta de color del sistema C. I. E – XYZ para asignar un color a cada muestra MOLINA (2002) (ANEXO 2).

3.3.5.5 Caracterización según forma, tamaño y peso. La caracterización de las corbículas de polen según forma, tamaño y peso. Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por MONTENEGRO *et al.* (1992). En cada grupo de color se examinó la forma y tamaño de los cúmulos corbiculares con la ayuda de una lupa. La forma de los cúmulos fue definida como: redonda, aplanada e irregular. La determinación del tamaño se

realizó midiendo el cúmulo con pie de metro en una submuestra de 10 unidades, promediando los diámetros mayor y menor. La determinación del peso se realizó pesando y promediando los pesos de una submuestra de 10 corbículas, con la ayuda de una balanza analítica

3.3.6 Análisis estadísticos. Se analizaron los datos mediante estadística descriptiva, comparando medias, desviación estándar e histogramas de frecuencias. Para analizar si existen diferencias entre las muestras se utilizó análisis de varianza a un nivel de confianza del 95 %. En el caso de encontrar diferencias significativas se realizó la prueba del test de rango múltiple al 95 % de confianza para observar las diferencias existentes. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa computacional Statgraphics 2,0.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis de humedad

En el CUADRO 7 se presentan los resultados promedios del contenido de humedad del polen corbicular y su respectiva desviación estándar.

CUADRO 7 Resultados del contenido de humedad en polen corbicular.

Muestras	N	Contenido de humedad (%)	Desviación estándar
Polen amarillo	17	15,26	2,26
Polen naranja	19	17,00	3,45
Polen verde	19	16,86	3,19

Las 19 muestras de polen tomadas en el predio tienen una humedad promedio de 16,41 % con desviación estándar de 3,11. El valor mínimo es 11,81 % en la muestra N° 18 y un valor máximo de 25,18 % en la muestra N° 3. En el análisis de varianza se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre muestras a un nivel de confianza de 95 % ($p < 0,05$) (ANEXO 3 y 4).

Como se observa en el CUADRO 7 se encontró que el valor promedio de humedad para las muestras de color amarillos es de 15,26 % , para el color naranja de 17,00 % y el verde de 16,86 %. Los valores mínimos fueron de 11,48 %, 11,71 % y 12,11 % y los valores máximos de 19,80 %, 25,64 % y 24,98 % respectivamente (ANEXO 4). El análisis de varianza indicó diferencias de humedad respecto al nivel de color. Al realizar el test de rango múltiple se concluye que las corbículas de color amarillo tienen valores

de humedad inferior a las muestras naranjas y verdes, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre estas dos últimas (ANEXO 3). Estos resultados concuerdan con la apreciación visual de los glomérulos de polen, donde las corbículas de color amarillo se perciben más secas, compactas y livianas que las naranjas y verdes.

Al estudiar el comportamiento del contenido de humedad respecto al tipo de muestreo se encontró que para las primeras doce muestras (muestreo semanal) existe una humedad promedio de 17,94 % con una desviación estándar de 2,89, un valor mínimo de 12,77 % y un valor máximo de 25,64 %, y para el muestreo sectorizado (siete muestras tomadas la semana 13) un valor de humedad promedio de 13,95 % con una desviación estándar de 1,42 teniendo valor mínimo y máximo de 11,48 % y 16,74 % respectivamente. Estudiando el comportamiento de las varianzas se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas de humedad para los dos tipos de muestreo a un 95 % de confianza, presentando valores inferiores el muestreo sectorizado (ANEXO 3). Esto se puede deber a que el muestreo sectorizado se realizó la semana N° 13 (última semana de muestreo), aproximadamente la primera semana de enero, época mucho más calurosa y seca que los meses de octubre y noviembre que fueron los primeros meses de muestreo. El ANEXO 5, presenta un perfil climatológico anual de la zona de estudio.

La humedad de la muestra control es de 8,34 % en promedio, 6,72 % las amarillas, 9,33 % las naranjas y 8,97 las verdes. Estos valores son inferiores a los niveles de humedad encontrados en las muestras del estudio. Esta diferencia era esperada, pues la muestra control corresponde a un polen comercial, el cual ha sido sometido a un proceso de secado antes de ser envasado.

4.2 Determinación del contenido de carotenos

Con el fin de determinar la eficiencia de la cromatografía en columna abierta, se realizó una prueba de recuperación de caroteno, la que consistió en pasar por la columna cromatográfica los distintos puntos de la curva de calibración, para luego determinar la cantidad de caroteno recuperada en el eluyente.

CUADRO 8 Recuperación de caroteno al pasar la muestra por la columna cromatográfica.

Concentración inicial (µg/ml)	Densidad óptica inicial (450 nm)	Volumen Muestra (ml)	Volumen eluído (ml)	Densidad óptica del eluyente (450 nm)	Concentración final (µg/ml)	Recuperación (%)
0,5	0,185	3	3,2	0,151	0,42	89,6
1,0	0,355	3	3,4	0,283	0,81	91,8
1,5	0,514	3	3,7	0,407	1,18	97,0
2,0	0,677	3	3,5	0,558	1,63	95,1

Como se observa en el CUADRO 8, la recuperación promedio de los estándares de carotenos en la columna cromatográfica fue de 93,4 % \pm , obteniendo valores inferiores de recuperación en las dos concentraciones menores (0,5 y 1,0 µg/ml con un valor promedio de 90,7 % \pm) y valores superiores de recuperación en las dos concentraciones mayores (1,5 y 2,0 µg/ml con un valor promedio de 96,1 % \pm), lo cual se podría deber a que las soluciones de concentraciones inferiores poseen una coloración amarillo muy pálido dificultando la determinación del punto final de la elución, puesto que éste se define visualmente cuando no se observan trazas de coloración en el inferior de la columna.

CUADRO 9 Resultados del contenido de carotenos en polen corbicular.

Muestras	N	Contenido de carotenos (µg/g)	Desviación estándar
Polen amarillo	17	15,49	11,11
Polen naranja	19	125,23	29,84
Polen verde	19	25,0	21,11

De acuerdo a los resultados presentados en el ANEXO 6, las 19 muestras de polen tomadas en el predio tienen una cantidad de caroteno promedio de 56,69 µg/g y una desviación estándar de 54,85 con un valor mínimo de 1,0 µg/g en la muestra N° 12 y un valor máximo de 175,7 µg/g en la muestra N° 13. Esto concuerda con valores tomados de literatura como el rango típico de carotenos en polen recolectado por abejas

presentados por GRAHAM (1993) de 50 a 150 $\mu\text{g/g}$ o Vivino y Palmer citado por MUNIATEGUI **et al.** (1990) con el mismo rango.

Al analizar la tabla del análisis de varianza para el contenido de caroteno entre las muestras se encuentra un p – valor de $> 0,05$ (0,7636) lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas a un 95 % de nivel de confianza (ANEXO 3).

En el CUADRO 9 se presentan los resultados del contenido de carotenos. En éste se puede apreciar que las muestras de color amarillo tienen una cantidad de carotenos promedio de 15,49 $\mu\text{g/g}$ con un valor mínimo de 1,0 $\mu\text{g/g}$ y un valor máximo de 45,7 $\mu\text{g/g}$. Para las muestras de color naranja y verde se encontraron contenidos de carotenos promedio de 125,23 $\mu\text{g/g}$ y 25,0 $\mu\text{g/g}$ con valores mínimos de 83,0 $\mu\text{g/g}$ y 2,1 $\mu\text{g/g}$, y valores máximos de 175,7 $\mu\text{g/g}$ y 76,3 $\mu\text{g/g}$ respectivamente (ANEXO 6). Del análisis de varianza se deduce que existen diferencias estadísticamente significativas para el contenido de carotenos con respecto al color a un nivel de confianza de 95 %, debido a que el p – valor es $< 0,05$. Al realizar la prueba del test de rango múltiple se encontró que las muestras de color naranja presentaban contenidos de caroteno significativamente superiores a las muestras de color amarillo y verde (ANEXO 3). Esto era esperado debido a la gran pigmentación que presentan las corbículas de polen de color naranja. Con respecto a las muestras de color amarillo y verde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANEXO 3). Esto se contradice con la apreciación visual de la coloración, pero concuerda con aseveraciones publicadas por autores como PARKER (1992) y BELITZ – GROSCH (1997) que postulan que en los vegetales verdes los carotenos se encuentran enmascarados por la clorofila.

Con respecto al análisis de varianza del contenido de caroteno de las muestras respecto al tipo de muestreo, semanal o ubicación geográfica, no se encontraron diferencias (p – valor es $> 0,05$) (ANEXO 3).

La FIGURA 15 muestra el espectro de absorción del extracto de caroteno, aislado de la muestra N° 13 color naranja, éste se obtuvo realizando un barrido de absorción en el espectro visible (entre los 400 y 550 nm de longitud de onda). Al comparar esta figura con el espectro presentado por BELITZ y GROSCH (1987) (FIGURA 7), correspondiente al espectro visible del beta caroteno, se observa que son muy similares, Las pequeñas diferencias se pueden deber a que se encuentran en solventes diferentes, hexano para el primero (FIGURA 7) y éter de petróleo para el segundo (FIGURA 15).

Se observa en la FIGURA 15 un punto de inflexión ascendente a los 430 nm aproximadamente. Además, presenta la máxima absorción aproximadamente a los 451 nm. El segundo pico presenta la máxima absorción a los 481nm.

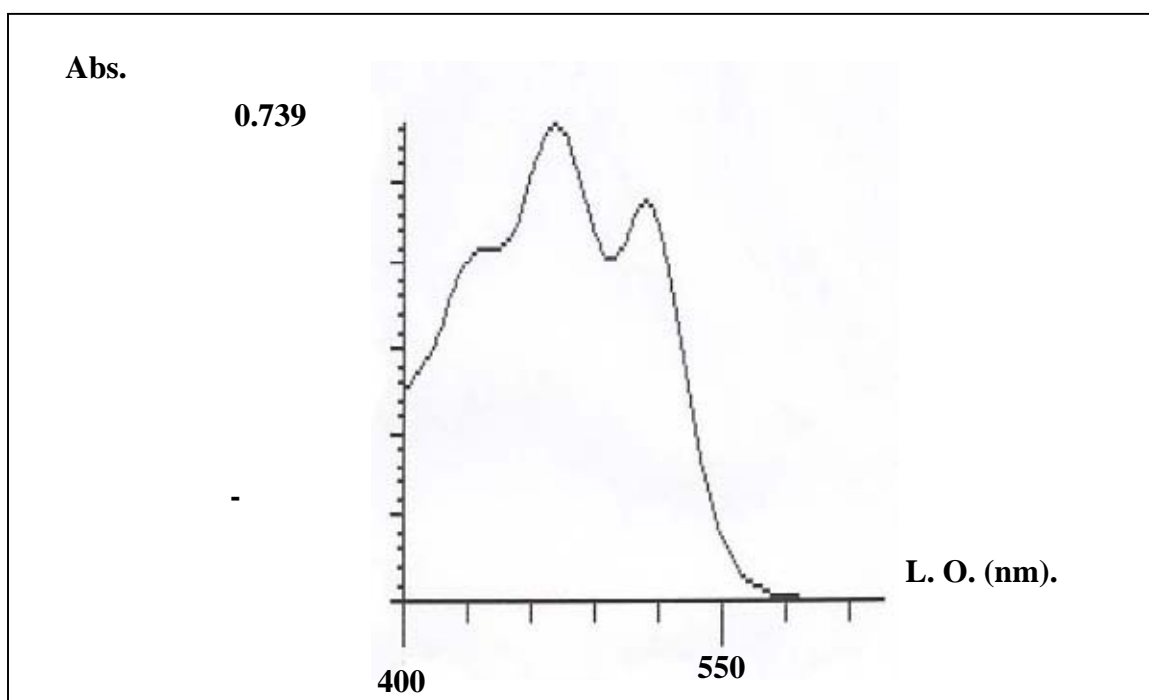


FIGURA 15 Espectro de absorción del caroteno extraído de la muestra corbicular 3 naranja con éter de petróleo.

En el cuadro 10 se muestra los resultados obtenidos en la determinación de carotenos utilizando cromatografía líquida de alta resolución. En el ANEXO 7 y 8 se presentan los cromatogramas de la curva de calibración y de las muestras estudiadas.

CUADRO 10 Resultados de la cromatografía HPLC.

Muestra	Contenido de carotenos ($\mu\text{g/g}$)
Muestra 12 amarillo	0
Muestra 12 naranja	3,45
Muestra 12 verde	0
Polen comercial	2,9

Como se aprecia en este cuadro, los resultados obtenidos en la cromatografía HPLC difieren totalmente de los obtenidos en la cromatografía en columna abierta. Esta diferencia podría haber sido causada por alguno o algunos de los siguientes motivos:

- Pérdida de los carotenos en el proceso de cambio de solvente.
- La determinación con HPLC se realizó en diciembre del 2002, ocho meses después de la determinación mediante cromatografía en columna abierta. Durante este periodo las muestras se almacenaron en bolsas y se mantuvieron protegida de la luz, pero no se mantuvieron en nitrógeno como se recomienda, lo cual pudo favorecer la degradación de los carotenos debido a la oxigenación.
- Para la cromatografía en columna abierta se utilizó un estándar de caroteno de grado analítico, en cambio para el HPLC se utilizó β – caroteno extraído de una gragea farmacológica.
- El equipo utilizado estuvo en desuso durante tres años, no obstante, se realizó un arduo trabajo de montaje, limpieza y estabilización del sistema. Sin embargo, las condiciones utilizadas podrían no haber sido óptimas, lo cual pudo influir en los resultados obtenidos.

4.3 Determinación de origen botánico del polen corbicular

De los resultados de la observación microscópica del polen se puede concluir que la recolección de polen por las abejas es muy selectiva, esto se deduce de la predominancia promedio de especies botánicas específicas encontradas en las muestras corbiculares, el

cual fue de 84,6 % (ANEXO 9). Debido a esta especificidad podríamos deducir que existe una relación entre la especie botánica que aporta el grano de polen y el color del polen corbicular.

En el CUADRO 11 se presentan los resultados de la determinación de origen botánico de las muestras de polen corbicular de acuerdo al color de las corbículas. En el se observa que las familias que han aportado el polen que posee un alto contenido de carotenos son: *Rosaceae*, *Compositae*, *Rutaceae*, *Labiatae*, *Anacardiaceae* y *Lauraceae*. En este cuadro la especie *Sisymbrium sagittatum* se encuentra en los tres colores, lo que podría deberse a que se tomo una corbícula amarilla teñida superficialmente por contacto con las corbículas de las otras tonalidades, las que poseían mayor humedad.

CUADRO 11 Resultados de la determinación de origen botánico del polen corbicular.

Polen	Especie predominante	Familia
Amarillo	<i>*Sisymbrium sagittatum Hook. Et Arn.</i> <i>Fagara mayu (Hook. Et Arn.) Bert.</i> <i>Geranium core – core Steud.</i>	<i>Cruciferae</i> <i>Rutaceae</i> <i>Geraniaceae</i>
Naranja	<i>*Sisymbrium sagittatum Hook. Et Arn.</i> <i>Rubus ulmifolius Schott.</i> <i>Fragaria chiloensis (L.) Duch.</i> <i>Satureja darwinii (Benth. & Hooker) Brig.</i> <i>Cychorium intibus L.</i> <i>Lithrea caustica Hook. Et Arn.</i> <i>Quillaja saponaria Mol.</i> <i>Bahia ambrosoides Lag.</i> <i>Cryptocaria alba (Mol.) Looser.</i>	<i>Cruciferae</i> <i>Rosaceae</i> <i>Rosaceae</i> <i>Labiatae</i> <i>Compositae</i> <i>Anacardiaceae</i> <i>Rosaceae</i> <i>Compositae</i> <i>Lauraceae</i>
Verde	<i>Eucalyptus globulus Labill.</i> <i>Malus pumila Mill.</i> <i>Amomyrtus luma (Mol.) Legr. & Kausel.</i> <i>Lathyrus hookeri G. Don</i> <i>*Sisymbrium sagittatum Hook. Et Arn.</i>	<i>Myrtaceae</i> <i>Rosaceae</i> <i>Myrtaceae</i> <i>Papilionaceae</i> <i>Cruciferae</i>

De las especies encontradas la mayoría han sido mencionadas, por MONTENEGRO **et al.**, 1991, como especies botánicas altamente utilizadas por *Apis mellifera* en predios ubicados entre Cauquenes y Pichidangui. Las especies mencionadas por Montenegro

son: *Geranium core – core*, *Rubus ulmifolius*, *Cychorium intybus*, *Lithrea caustica*, *Quillaja saponaria*, *Bahia ambrosoides*, *Cryptocaria alba*, *Eucalyptus globulus* y *Amomyrtus luma*. Por otro lado, MONTENEGRO et al., 1994 informa que dentro de las especies que aportan carotenoides al polen se encuentran *Cychorium intybus* y *Lithrea caustica*. En nuestro estudio, estas dos últimas fueron encontradas en las muestras de color naranja, lo que concuerda con la investigación de Montenegro. En el ANEXO 10 se presenta la especie botánica predominante que aportan el polen a cada muestra y el ANEXO 11 muestra las imágenes de los granos de pólenes predominantes.

4.4 Caracterización del polen corbicular según color

Los resultados del análisis colorimétrico son presentados en el ANEXO 12. De acuerdo a éstos resultados, existe una concordancia entre los resultados de la medición colorimétrica y la separación visual para las tonalidades anaranjadas y verdes, no así para las tonalidades amarillas, debido a que el equipo reconoce el 41 % de las muestras amarillas como tonalidades naranja amarillento; esto se puede deber a que las corbículas de tonos amarillos tienen menor humedad que las naranjas y estas últimas tienden a teñir las primeras por el contacto físico. Por otro lado, el equipo asigna, a algunas muestras de tonos verdes, un color verde con matices amarillos. Esto se podría deber a la adherencia de partículas amarillas debido al rompimiento mecánico del polen amarillo.

De los resultados de color obtenidos por el método instrumental se puede deducir que al 100 % de las muestras recolectadas de acuerdo a la ubicación de las colmenas en el predio, el equipo asignó la misma coloración que se observó en la separación visual. En cambio para el muestreo semanal se encontró que sólo el 30 % de las muestras amarillas fueron reconocidas como tal por el equipo, al 70 % restante le asigno un color naranja amarillento (ANEXO 12). Esto reafirma la teoría de que estas diferencias se deben al teñido por contacto físico, ya que las muestras tomadas de acuerdo a la ubicación de las colmenas fueron tomadas la última semana del muestreo, y por el clima de la fecha (Diciembre), las muestras estaban con menor humedad que las primeras disminuyendo la adherencia por contacto físico.

Con respecto a la muestra control, es decir el polen comercial, se puede apreciar que el equipo asigna colores más definidos que en las muestras del trabajo, esto indica un menor grado de rompimiento mecánico y de adherencia de partículas, lo que se puede deber a que las corbículas de la muestra control son más compactas y duras debido a que estas corresponden a muestras que han sido secadas y contienen en promedio de humedad de 8,34 % (ANEXO 4).

4.5 Caracterización del polen corbicular según forma, tamaño y peso

En la FIGURA 16 se presenta un histograma detallado con las frecuencias de las distintas formas de los cúmulos corbiculares encontrados para los tres niveles de color.

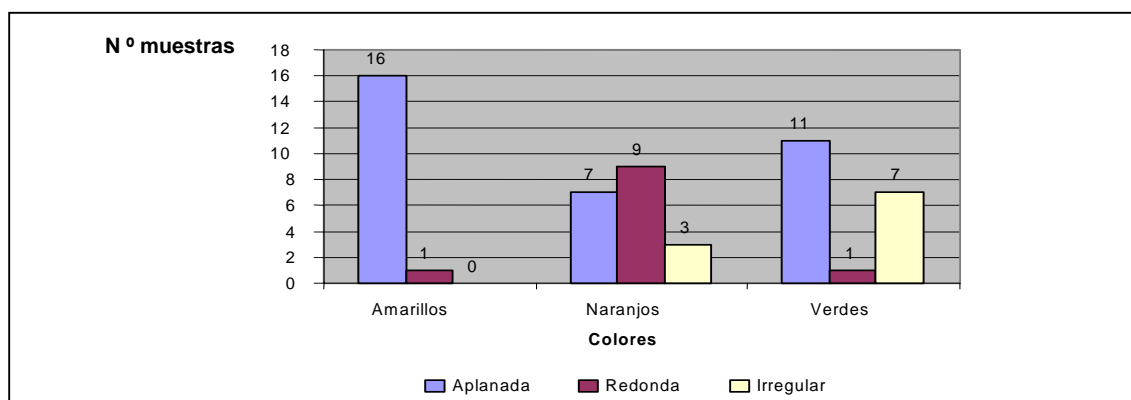


FIGURA 16 Histograma de frecuencias morfológicas en el polen corbicular según color.

De acuerdo a los datos presentados en la FIGURA 16 y 17 A, la mayoría de las muestras presentaron una forma aplanada (alcanzando un 62 % de la totalidad de las muestras), un 20 % se caracterizaron como redonda y sólo un 18 % de muestras se catalogaron como irregular.

En las muestras de color amarillo se encontró que el 94 % tenía forma aplanada y el 6 % forma redonda, no se encontraron muestras irregulares. Para las muestras de color naranja, se encontró que un 37 % correspondían a corbículas de forma aplanada, el 47 % redondas y el 16 % irregulares. Y en las muestras de coloraciones verdes se observó que

el 58 % correspondían a corbículas de forma aplanada, el 5 % redonda y el 37 % irregular (FIGURA 17 B, C, D y ANEXO 13).

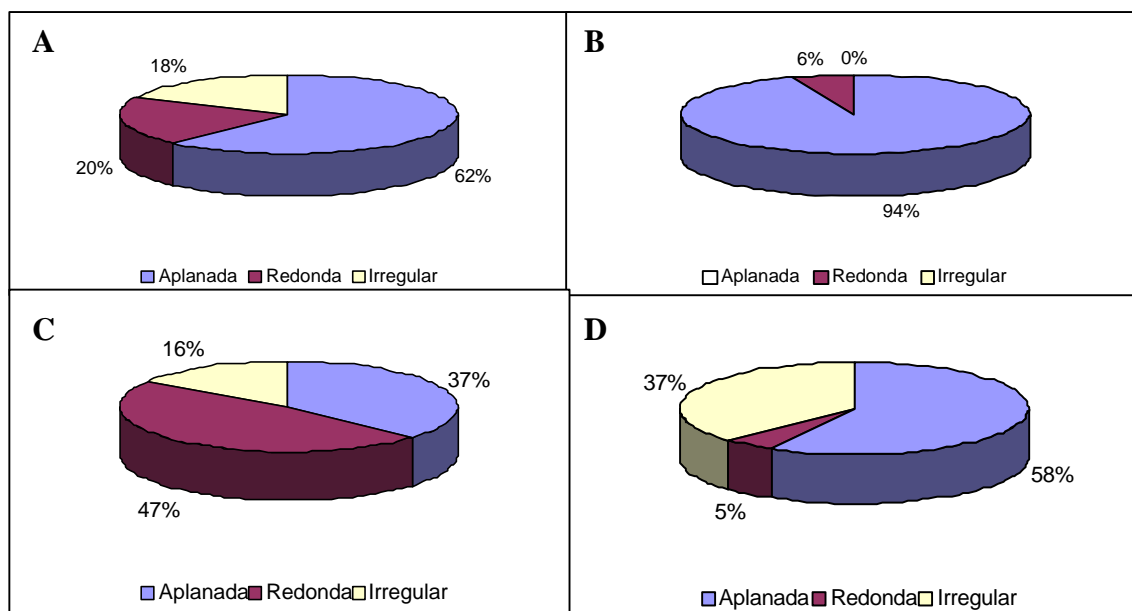


FIGURA 17 Distribución porcentual de las muestras de polen corbicular de acuerdo a su morfología. A: total de muestras, B: muestras amarillas, C: muestras naranjas y D: muestras verdes.

Es probable que las muestras de color amarillo presentaran una forma más definida debido a que éstas poseían un menor contenido de humedad, lo que las hacía mucho más compactas y resistentes a la deformación por impactos mecánicos del polen corbicular.

Con respecto a la muestra patrón, se observó que ésta poseía una forma mucho más definida que las muestras de este estudio, lo que posiblemente se debe a que como la muestra patrón tenía un menor contenido de humedad, las corbículas de ésta eran mucho más resistentes a la deformación y rompimiento mecánico.

Es de gran importancia considerar que el análisis morfológico de las corbículas se puede ver afectado por el deterioro de éstas debido a los impactos mecánicos en la recolección, transporte y preparación de las muestras.

CUADRO 12 Resultados de la caracterización por tamaño del polen corbicular según color.

Muestras	n	Tamaño (mm)	Desviación estándar
Polen amarillo	17	3,10	0,18
Polen naranja	19	2,94	0,23
Polen verde	19	2,88	0,17

El tamaño de las corbículas en promedio fue de 2,97 mm y desviación estándar de 0,22, con un valor mínimo de 2,5 mm correspondiendo a la muestra 2 y un valor máximo de 3,4 mm correspondiendo a las muestras 1, 7 y 18 (ANEXO 13).

Con respecto al análisis de varianza para el tamaño de las corbículas entre las muestras, se puede apreciar que no existen diferencias estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95 %. Por otro lado, el análisis de varianza para el tamaño de las corbículas de acuerdo a los tres niveles de color, arrojó un p – valor de 0,0069 lo que nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los 3 niveles a un nivel de confianza de 95 %. Realizando el test de rango múltiple, se encontró que las muestras de coloración amarillas eran significativamente más grandes que las naranjas y verdes (ANEXO 3). Esto puede estar asociado a que el polen amarillo presentaba una menor humedad, lo que lo hacia más resistente a la deformación mecánica.

El peso de las corbículas en promedio fue de 12,67 mg y una desviación estándar de 2,91, con un valor mínimo de 8,04 mg en la muestra 4 y un valor máximo de 20,26 en la muestra 11. En el análisis de varianza no se encontraron diferencias estadísticamente

significativas para el peso de las corbículas con respecto a las muestras (ANEXO 3 y 13).

Los valores encontrados en este estudio son un poco inferiores a los valores presentados en bibliografía como el rango encontrado por Hirschfelder, citado por SALAMANCA *et al.*, 2001, que señaló que el peso de las cargas oscilaba entre 12 y 29 mg o como Olea, citado por SEEMANN y NEIRA (1988), quien encontró que las cargas de polen tienen un peso de 13,23 mg en un estudio sobre colecta de polen realizado en Valdivia. Estas diferencias pueden deberse a que los autores mencionados estudiaron las cargas polínicas a la entrada de la colmena, lo que indica el peso real de la corbícula que trae la abeja, en cambio en nuestro estudio pudieron existir pérdidas debido a rompimientos de las corbículas debido a impactos mecánicos en el traslado y manejo de las muestras, otro factor que podría influir en estos resultados es el clima y la temperatura en la época de cosecha del polen.

CUADRO 13 Resultados de la caracterización por peso del polen corbicular según color.

Muestras	n	Peso promedio (mg)	Desviación estándar
Polen amarillo	17	9,69	0,90
Polen naranja	19	13,37	2,30
Polen verde	19	14,64	2,52

Las muestras de color amarillas presentaron un peso promedio de 9,69 mg con un valor mínimo de 8,04 mg y un valor máximo de 11,12 mg, encontrando además que las muestras de colores naranjos y verdes tienen pesos promedios de 13,37 mg y 14,64 mg con valores mínimos de 11,08 mg y 11,31 mg, y valores máximos de 19,64 mg y 20,26 mg respectivamente (CUADRO 13 y ANEXO 13).

En el análisis de varianza para el peso de las muestras de polen con respecto a los tres niveles de color se encontró que existen diferencias estadísticamente significativa a un

95 % de confianza. El resultado del test de rango múltiple nos indica que la muestra que difiere, es la de color amarillo, que presentaba un peso inferior a las otras dos coloraciones (ANEXO 3). Esto era lo esperado, pues éstas últimas tienen el menor contenido de humedad.

Con respecto a la muestra control se encontró que los valores de peso por color fueron de 9,5 mg para la muestra amarilla, 10,3 mg para la naranja, 9,8 mg para la verde y en promedio de 9,9 mg (ANEXO 13). Estos valores son inferiores a los encontrados en las corbículas de este estudio, lo que era obvio considerando que la muestra control era un polen comercial el cual había sufrido un tratamiento térmico y con ello una disminución del peso.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, es posible llegar a las siguientes conclusiones:

- 1 El contenido de humedad del polen corbicular depende de la época de cosecha y en especial de las condiciones climáticas y ambientales del momento en que ésta se realiza.
- 2 Las corbículas de polen de color naranja poseen un contenido de carotenos considerablemente mayor que las verdes y amarillas.
- 3 Considerando la similitud del espectro de absorción de las muestras con el espectro del beta caroteno, y sus respectivos máximos de absorción, se puede concluir que el pigmento extraído con el método utilizado corresponde a caroteno.
- 4 No se encontraron diferencias en el contenido de carotenos de los pólenes de color amarillo y verde, y tampoco entre las características morfológicas.
- 5 La recuperación del pigmento en la técnica cromatográfica utilizada es adecuada para concentraciones $\geq 1,5 \mu\text{g/ml}$.
- 6 Considerando el alto nivel de predominancia de una especie botánica específica en cada muestra corbicular, se puede concluir que las abejas son altamente selectivas en cuanto a la fuente floral utilizada en la recolección del polen.

6. RESUMEN

En este trabajo se estudió el origen botánico, contenido de carotenoides, contenido de humedad y el color de polen corbicular obtenido en las colmenas de una empresa apícola de la comuna de La Cruz, V región de Chile.

La obtención de las muestras se realizó durante el periodo de floración del bosque nativo de la zona, entre octubre y diciembre del año 2000. Se tomaron muestras del acopio de polen del predio en forma semanal, durante doce semanas. Luego se obtuvieron siete muestras de acuerdo a la ubicación geográfica de las colmenas.

Con el objeto de relacionar los parámetros estudiados con el color de las corbículas, los gránulos de polen de cada muestra fueron separados en tres niveles de color: amarillo, naranja y verdes.

La cuantificación del caroteno se realizó mediante extracción del pigmento con éter de petróleo y posteriormente una separación cromatográfica de columna abierta. La identificación botánica se llevo a cabo a través de la observación del polen, previamente acetolizado, en un microscopio de luz. Luego fueron comparados con granos tomados directamente de la flor y fotografías de literatura especializada.

Con respecto al contenido de humedad del polen se encontró que éste depende de la época de cosecha y en especial de las condiciones climáticas del momento en que ésta se realiza.

Por otro lado, se constató que el contenido de carotenoides era mayor para las corbículas de polen de color naranja con respecto a las amarillas y verdes. Entre estas dos últimas no se encontró diferencias.

SUMMARY

The botanical source, carotenoids content, moisture content, and pollen loads colour gotten from the beehives of a beekeeping company in La Cruz, V Region, Chile, were studied in this work.

The samples were obtained during the blossoming of the area's forest, between October and December, 2000. Samples were taken weekly from the property's pollen store for twelve weeks. Then, seven samples were taken according to the geographical location of the beehives.

With the purpose of relating the parametres studied with the colour of the pellets, pollen grains of each sample were divided into three colour levels: yellow, orange and green.

The quantification of the carotenoids was carried out through the extraction of the pigment by using petroleum ether and, later, through a separation using an open column chromatographic technique. The botanical identification was performed through the observation of the pollen, previously acetolysed, in a light microscope. Afterwards, they were compared to grains taken directly from the flower and to photographs from specialised literature.

With regards to the pollen moisture content, it was noted that it depends on the harvest season, and especially on the weather conditions in which it is carried out.

On the other hand, it was stated that the carotenoids content was higher for the orange pollen pellets, as compared to the yellow and green ones. There was found no difference between these last two.

7. BIBLIOGRAFIA

ALBANES, D. 1999. (Beta carotene and lung cancer: a case study). Original no consultado. Abstract. American Journal of Clinical Nutrition. 69(6)1345s-1350s.

AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1995. Official Methods of Análisis of AOAC International, 16th Ed. Arlington Virginia, USA, Volumen I y II, Cap. 3.

ASIS, M. 1996. Apiterapia para todos. Científico – Técnica. La Habana. Cuba. 150p.

DIRECCION METEOROLOGICA DE CHILE. _____. Información climatológica de estaciones chilenas – Chile centro. <http://www.atmosfera.cl>.

BELITZ, H – D. y GROSCH, W. 1987. Food Chemistry. 1^a ed. Ed. Springer-Verlag. Berlin. Alemania. 774p.

BELITZ, H – D. y GROSCH, W. 1997. Química de los alimentos. 2^a ed. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 1087p.

BENDICH, A. 1989. Carotenoids and the immune response. Journal of Nutrition, 119:112-115.

BERNAL, I. 1993. Análisis de Alimentos. Academia Colombiana de Cs. Exactas, Físicas y Naturales. Colección Julio Carriozosa Valenzuela N° 2. Sta. Fé de Bogotá. 313p.

- BURTON, G. 1989. Antioxidant action of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 119:109-111.
- CAMPUSANO, C. 1999. Determinación de proteínas vitaminas B₂ y C en polen de frutales menores y miel. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. Universidad Austral de Chile. Escuela de Ingeniería de Alimentos. Valdivia (Chile). 118p.
- CARRETERO, J. 1989. Análisis polínico de la miel. Ed. Mundi – Prensa. Madrid, España. 124p.
- COOPER, D., ELDRIDGE, A. y PETERS, J. 1999. Dietary Carotenoids and certain cancers, heart disease, and age – related macular degeneration: A review of recent research. *Nutrition Reviews*: 57 (7) 201 – 211.
- CORNEJO, L. 1993. Apicultura práctica en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: Roma (Italia). 167p.
- CRANE, E. 1990. Bees and Beekeeping. Science, Practice and World Resources. Comstock Publishing Associates, a division of Cornell University Press. New York, U. S. A. 614p.
- CROMPTON, C. y WOJTAS, W. 1993. Pollens grains of canadian honey plants. Centre for Land and Biological Resources Research. Ontario, Canada. 228p.
- CHILE, MINISTERIO DE SALUD. 2000. Nuevo Reglamento Sanitario de los Alimentos. Diario Oficial de Chile, Editora Jurídica Manuel Montt S. A. Santiago, Chile. 286p.

- DADANT, J. e HIJOS. 1975. La colmena y la abeja melífera. Montevideo, Hemisferio Sur. 936 p.
- ERDTMAN. 1969. Pollen Morphology and Plant Taxonomy.- Angiosperms, Vol. 1. The Chronica Botanica Co.: Waltham, Mass, U. S. A. 539p.
- GARCIA – CASAL, M., LAYRISSE, M., SOLANO, L., BARÓN, M., ARGUELLO, F., LLOVERA, D., RAMIREZ, J., LEETS, I., y ROPPER, E. 1997. Vitamin A And β -Carotene Can Improve Nonheme Iron Absorption from Rice, Wheat and Corn by Humans. The Journal of Nutrition: 128 (3) 646 – 630.
- GRAHAM, J. 1993. The Hive and Honey Bee. Dadant & Sons, Inc. Hamilton Illinois. 1324p.
- HERCBERG, S., GALAN, P. y PREZIOSI, P. 1999. (Antioxidant vitamins and cardiovascular disease). Original no consultado. Abstract. American Journal of Public Healt. 89(3)289-291.
- HEUSSER, A. 1971. Pollen and spores of Chile. Modern types of the Pteridophita, Gymnospermaea and Angiospermae. The University of Arizona Press. 167p.
- HODGES, D. 1984. The pollen loads of the honeybee, a guide to their identification by colour and form. London International Bee Research Association. Reino Unido. P. irr.
- HOFFMANN, A. 1978. Flora silvestre de Chile, zona central. Ed. Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 255p.
- HOFFMANN, A., FARGA, C., LASTRA, J. y VEGHAZI, E. 1992. Plantas medicinales de uso común en Chile. Ed. Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 273p.

- JEAN – PROST, P. 1995. Apicultura. 3^a Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. 741p.
- JUN, M., HAMPL, J. y BETTS, N. 2000. (Antioxidant intakes and smoking status). Original no consultado. Abstract. American Journal of Clinical Nutrition. 71(3)774-780.
- KIMURA, M. y RODRIGUEZ-AMAYA, D. 1999. Sources of errors in the quantitative Analysis of food carotenoids by HPLC. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. <http://www.slan.org.mx>.
- KNEKT, P., JARVINEN, R., TEPPONEN, L., AROMAA, A. y SEPPANEN, R. 1999. (Role of various carotenoids in lung cancer prevention). Original no consultado. Abstract. Journal of the National Cancer Institute. 91(2)182-184.
- KOLHMEIER, L. y HASTINGS, S. 1995. Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. Am. J. Clin. Nutr. 62:1370S - 1376S.
- KRINSKY, N. 1993. (Actions of carotenoids in biological systems). Original no consultado. Abstract. Ann. Rev. Nutr. 13:561-587.
- LAMPEITL, F. 1988. Apicultura Rentable. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 197p.
- LEGLER, C. 2000. Produtos das abelhas na saúde humana. Resúmenes V Seminario Estadual de Apicultura. I Encontro de Apicultores de Mercosul. Porto Alegre. Brasil. pp. 71 – 88.
- LEGLER, S., SABOIA, G., MACHADO, E. y KIEFER, C. 1999. Efeito dos diferentes tipos de suplementação alimentar para produção de pólen. Resúmenes V

Seminario Estadual de Apicultura. I Encontro de Apicultores de Mercosul. Porto Alegre. Brasil. pp. 161 – 172.

LINSKENS, H. y JORDE, W. 1997. Pollen as Food and Medicine.- A Review. *Economic Botany*: 51 (1): 78 – 87.

LOZANO, . 1997. Carotenoides para la salud. http://www.laverdad.es/cienciaysalud/5_S_10.html.

MARTINEZ, A. 1998. Los carotenoides. Universidad de Antioquina, Facultad de Química Farmacéutica. Colombia. <http://www.udea.edu.co/~farmacogfit/carotenoides>

MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACION FRANCESA. 1996. Pliego de condiciones para el modo de la producción biológica de la miel. Boletín Oficial de la República Francesa. http://www.geocities.com/sitioapicola/organica/ley_francesa.htm.

MOLINA, L. 2002. Manual de laboratorio, Curso ITCL 243, Análisis de alimentos. Valdivia, Chile. 60p.

MONTENEGRO, G. 1984. Atlas de anatomía de especies vegetales autóctonas de la zona central. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 153p.

MONTENEGRO, G., AVILA, G., CARDALDA, E., COTTENIE, M., GINOCCHIO, R., FOMEZ, M., ITURRIAGA, L., GONZALEZ, L., MUJICA, A., POBLETE, V., RIZARDINI, G., SCHUCK, M., SILVA, A., SILVA, C., SEMPE, J., TEILLIER, S. y VARELA, D. 1991. Implementación de una red fenológica de especies melíferas. Resúmenes III encuentro Nacional de Ciencia y Tecnología apícola. Universidad del Bío Bío. Chillan, Chile. pp. 149 – 176.

- MONTENEGRO, G., CARDALDA, E., GINOCCHIO, R., GOMEZ, M., ITURRIAGA, L., MUJICA, A., RIOS, D., RIZZARDINI, G., ROUGIER, D., SILVA, C., TEILLIER, S. y VARELA, D. 1992. El grano de polen como herramienta para diagnosticar especies vegetales melíferas, situación en Chile. Resúmenes III encuentro Nacional de Ciencia y Tecnología apícola. Universidad del Bío Bío. Chillan, Chile. pp. 88 – 115.
- MONTENEGRO, G., MUJICA, A., AVILA, G., TORREALBA, I., RIZARDINI, G. y GOMEZ, M. 1994. Exposición fotográfica sobre la caracterización del grano de polen de la flora apícola de Chile. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología apícola. Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso. Olmue. Chile. pp. H1 – H32
- MONTENEGRO, G. 2000. Chile nuestra flora útil, guía de uso apícola, medicinal folclórica, artesanal y ornamental. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 153p.
- MUNATEGUI, S., SANCHO, M., LOPEZ, J., HUIDOBRO, J. y SIMAL, J. 1990. Determination of carotenes from bee-collected pollen by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Apicultural Research. 29(3): 147-150.
- MUÑOZ, M; CHAVEZ, A. y CALVO, C. 1999. Necesidades de investigación en Carotenoides en América Latina. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. <http://www.slan.org.mx>.
- NESTEL, P. y TRUMBO, P. 1999. The role of provitamin A carotenoids in the prevention and control of vitamin A deficiency. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. <http://www.slan.org.mx>.
- OLEA, M. 1986. Evaluación de los acopios de polen y néctar en apiarios de la provincia

de Valdivia. Tesis para optar al grado de Licenciado en Agronomía. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 62 p.

OSBORNE, R. y VOOGT, P. 1978. The analysis of Nutrients in Foods. Academic Press Inc, London. 258p.

PARKER, L. 1992. Methods in Enzimology, Carotenoids: chemistry, separation, quantitation and antioxidation. Academic Press. New York. 538p.

PEPPINO, S. 1992. Polen su estudio, Primera parte. Industria apícola (Argentina). N° 13. Pp. 4 – 10.

PERCIE, P. 2001. El polen fresco en la alimentación humana. http://www.beekeeping.com/articles/polen_fresco.htm.

POPPEL, G. y GOLDBOHM, A. 1995. Epidemiologic evidence for β -caroteno and cancer prevention. Am. J. Clin. Nutr. 62:393S402S.

POZAS, C. 2000. Diseño de tres mezclas de miel de Chiloé, enriquecidas con polen, para consumo humano y su caracterización física, química y organoléptica. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 116p.

PRIMO, E. 1997. Química de los alimentos. Ed. Síntesis S. A. Madrid, España. 461p.

QINGPING, G., ZHAOXIANG, J., XIAOYANG, X. y HAIYAN, D. (s / f). Assaying of β -Carotene in Bed-Sore Tissue Regeneration Soft Capsule. <http://www.icrts.org/publications/proceedings99/gu.pdf>.

ROBINSON, D. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Ed. Acribia S. A.

Zaragoza, España. 516p.

RODRIGUEZ – AMAYA, D. 1999. A guide to carotenoid analysis in foods. OMNI Research, Washington, D. C. Estados Unidos. 64 p.

ROOT, A. 1976. ABC y XYZ de la Apicultura. 10^a edición. Buenos Aires, Hacchette. 670p.

SALAMANCA, G., VALERO, E. y VARGAS, E. 2001. El polen en el sistema de puntos críticos, cosecha, propiedades y condiciones de manejo. [http:// www.beekeeping.com/articles/polen_apicultura.htm](http://www.beekeeping.com/articles/polen_apicultura.htm).

SEEMANN, P. y NEIRA, M. 1988. Tecnología de la producción apícola. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. 202p.

SLATTERY, L., BENSON, J., CURTIN, K., KHE - NI, M., SCHAEFFER, D. y POTTER, J. 2000. Carotenoids and colon cancer. The American Journal of Clinical Nutrition. 71(2)575-582.

SOCORRO, O. y ESPINAR, M. 1998. Estudio del polen con interés en Apiterapia. Camares. Granada, España. 302 p.

STANLEY, R y LINSKENS, H. 1974. Pollen, biology, biochemistry and management. Heidellberg, spring Verlag. Alemania. 307p.

TAGLE, M. 1980. Nutrición. 2^a edición. Ed. Andres Bello. Santiago, Chile. 231p.

TALPAY, B. 1978. El polen Floral: Una reseña. Apiacta 1 (3): 103 – 105.

TAYLOR, A., JACQUES, P. y EPSTEIN, E. 1995. Relations among aging, antioxidant

status, and caract. Am. J. Clin. Nutr. 62: 1439S-1447S.

TEILLIER, S., ZEPEDA, H. y GARCIA, P. 1998. Flores del desierto de Chile. Ediciones Mariza Cuneo. Valdivia, Chile. 111p.

WILLIAMS, B. y WILSON, K. 1981. Principios y técnicas de bioquímica experimental. Ed. Omega S. A. Barcelona, España. 270p.

ZHANG, S., HUNTER, D., FORMAN, M., ROSNER, B., SPEIZER, F. COLDITZ, G., MANSON, J., HANKINSON, S. y WILLETT, W. 1999. (Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E; and risk of breast cancer). Original no consultado. Abstract. Journal of the National Cancer Institute. 91(6)547-556.

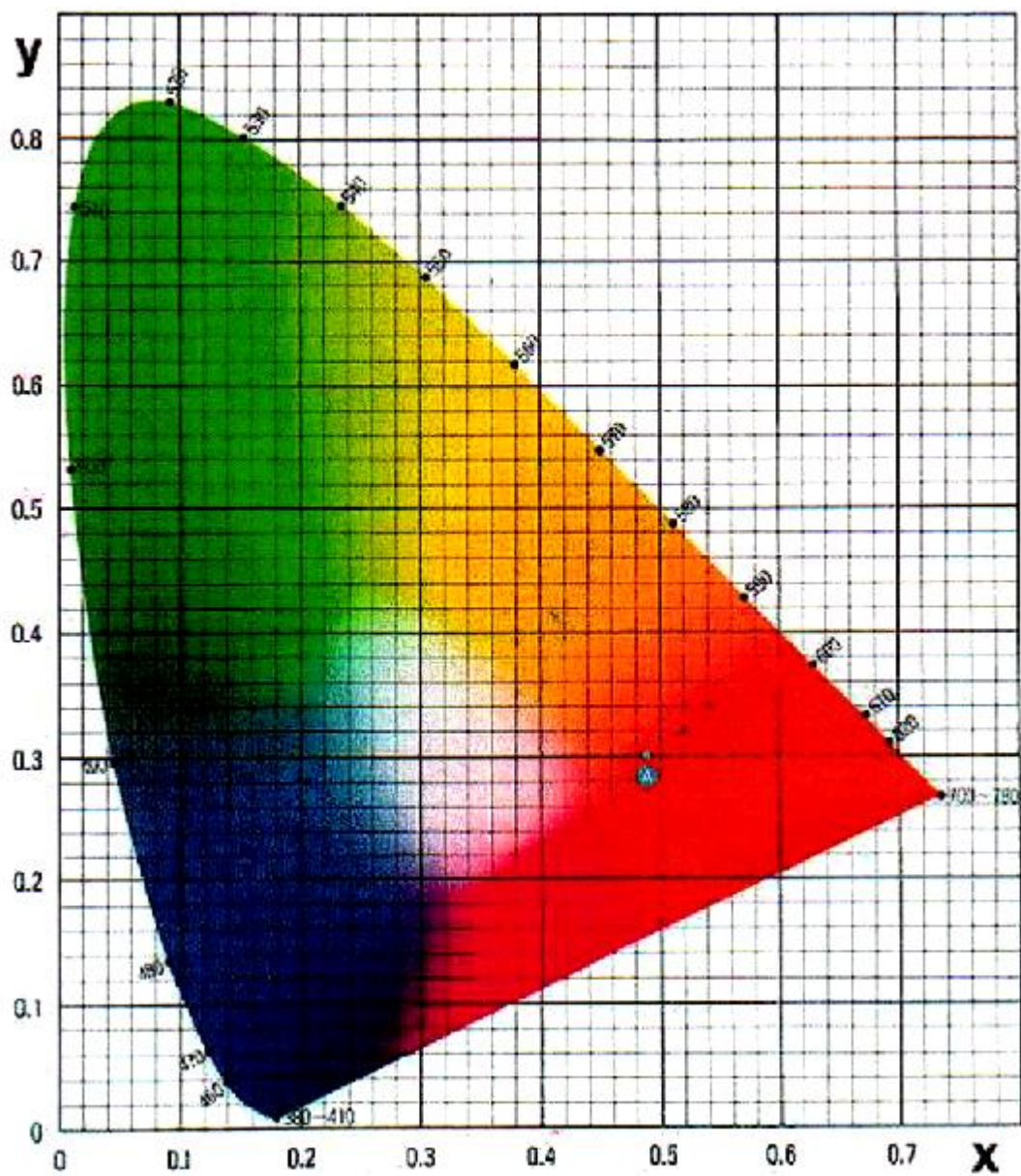
ZIEGLER, R. 1989. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. J. Of Nutrition, 119:116-122.

ANEXO

Anexo N° 1 Tabla resumen del muestreo de polen corbicular.

TIPO DE MUESTREO	N ° MUESTRA	N ° SEMANA	LUGAR
Semanal	1	36	
	2	37	
	3	38	
	4	39	
	5	40	
	6	41	
	7	42	
	8	43	
	9	44	
	10	45	
	11	46	
	12	47	
Ubicación geográfica	13	48	La Piedra
	14		Gardiazabal
	15		Romeral
	16		Los Patos
	17		Silo
	18		Safaex
	19		Lorenzo

Anexo N° 2 Carta de colores del Sistema C.I.E.-XYZ.



Anexo N ° 3 Análisis estadísticos.

3.1 Análisis de varianza de la humedad del polen entre muestras.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	985,242	18	54,7357	73,17	0,0000
Dentro del grupo	68,0691	91	0,748012		
Total (corr)	1053,31	109			

3.2 Análisis de varianza de la humedad del polen respecto a los tres niveles de color.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	66,2095	2	33,1048	3,59	0,0310
Dentro del grupo	987,102	107	9,22525		
Total (corr)	1053,31	109			

3.3 Test de rango múltiple para la humedad del polen respecto a los tres niveles de color.

Método: 95 % nivel de confianza				
Color	Cantidad	Promedios	Grupos homogéneos	
1 (Amarillo)	34	15,2582	X	
3 (Verde)	38	16,8647	X	
2 (Naranja)	38	17,0005	X	
Contraste			Diferencia	+ / - límites
1 – 2			*-1,74229	1,42139
1 – 3			*-1,6065	1,42139
2 – 3			0,135789	1,38134

* indica una diferencia estadísticamente significativa.

3.4 Análisis de varianza de la humedad del polen respecto al tipo de muestreo.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	411,502	1	411,502	69,25	0,0000
Dentro del grupo	641,81	108	5,94262		
Total (corr)	1053,31	109			

3.5 Test de rango múltiple para la humedad del polen respecto al tipo de muestreo.

Método: 95 % nivel de confianza				
Color	Cantidad	Promedios	Grupos homogéneos	
2 (Sectorizado)	42	13,954	X	
1 (Semanal)	68	17,9351	X	
Contraste			Diferencia	+ / - Límites
1 - 2			* 3,9811	0,948311

* indica una diferencia estadísticamente significativa.

3.6 Análisis de varianza del contenido de caroteno del polen entre muestras.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	41771,1	18	2320,61	0,74	0,7636
Dentro del grupo	286143,0	91	3144,43		
Total (corr)	327914,0	109			

3.7 Análisis de varianza del contenido de caroteno del polen respecto a los tres niveles de color.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	274385,0	2	137193,0	274,24	0,0000
Dentro del grupo	53528,8	107	500,27		
Total (corr)	327914,0	109			

3.8 Test de rango múltiple para el contenido de caroteno del polen respecto a los tres niveles de color.

Método: 95 % nivel de confianza				
Color	Cantidad	Promedios	Grupos homogéneos	
1 (Amarillo)	34	15,4941	X	
3 (Verde)	38	25,0	X	
2 (Naranja)	38	125,232	X	
Contraste			Diferencia	+ / - límites
1 – 2			* -109,737	10,4671
1 – 3			-9,50588	10,4671
2 – 3			* 100,232	10,1722

* indica una diferencia estadísticamente significativa.

3.9 Análisis de varianza del contenido de caroteno del polen respecto al tipo de muestreo.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	0,000165012	1	0,000165012	0,00	0,9998
Dentro del grupo	327914,0	108	3036,24		
Total (corr)	327914,0	109			

3.10 Análisis de varianza de la forma de las corbículas de polen entre muestras.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	9,72414	18	0,51179	0,65	0,843
Dentro del grupo	30,0	36	0,78947		
Total (corr)	39,7241	54			

3.11 Análisis de varianza de la forma de las corbículas de polen respecto a los tres niveles de color.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	1,47414	2	0,737069	1,06	0,3535
Dentro del grupo	38,25	52	0,695455		
Total (corr)	39,7241	54			

3.12 Análisis de varianza del tamaño de las corbículas de polen entre muestras.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	0,635121	18	0,0352845	0,67	0,8173
Dentro del grupo	1,898	36	0,0527315		
Total (corr)	2,53345	54			

3.13 Análisis de varianza del tamaño de las corbículas de polen respecto a los tres niveles de color.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	0,441876	2	0,220938	5,49	0,0069
Dentro del grupo	2,09158	52	0,0402227		
Total (corr)	2,53345	54			

3.14 Test de rango múltiple para el tamaño de las corbículas de polen respecto a los tres niveles de color.

Método: 95 % nivel de confianza				
Color	Cantidad	Promedios	Grupos homogéneos	
3 (Verde)	19	2,88421	X	
2 (Naranja)	19	2,94211	X	
1 (Amarillo)	17	3,1	X	
Contraste			Diferencia	+ / - límites
1 – 2			* 0,157895	0,134356
1 – 3			* 0,215789	0,134356
2 – 3			0,0578947	0,130571

* indica una diferencia estadísticamente significativa.

3.15 Análisis de varianza del tamaño de las corbículas de polen respecto al tipo de muestreo.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	0,0753593	1	0,0753593	1,62	0,2080
Dentro del grupo	2,4581	53	0,04663792		
Total (corr)	2,53345	54			

3.16 Análisis de varianza del peso de las corbículas de polen respecto a las muestras.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	134,468	18	7,47045	0,83	0,6525
Dentro del grupo	322,742	36	8,96506		
Total (corr)	457,210	54			

3.17 Análisis de varianza del peso de las corbículas de polen respecto a los tres niveles de color.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	234,397	2	117,199	27,35	0,0000
Dentro del grupo	222,813	52	4,28487		
Total (corr)	457,210	54			

3.18 Test de rango múltiple para el peso de las corbículas de polen respecto a los tres niveles de color.

Método: 95 % nivel de confianza				
Color	Cantidad	Promedios	Grupos homogéneos	
1 (Amarillo)	17	9,69059	X	
2 (Naranja)	19	13,3674	X	
3 (Verde)	19	14,6468	X	
Contraste			Diferencia	+ / - límites
1 – 2			* -3,67678	1,38673
1 – 3			* -4,95625	1,38673
2 – 3			-1,27947	1,34765

* indica una diferencia estadísticamente significativa.

3.19 Análisis de varianza del peso de las corbículas de polen respecto al tipo de muestreo.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Entre grupos	15,8869	1	15,8869	1,91	0,1730
Dentro del grupo	441,323	53	8,32685		
Total (corr)	457,210	54			

Anexo N° 4 Resultados de la humedad del polen corbicular.

Muestra	Contenido de humedad %	Muestra	Contenido de humedad %
1 A	15,19	11 A	16,48
1 N	18,39	11 N	18,77
1 V	15,36	11 V	18,86
2 A	-----	12 A	13,43
2 N	23,05	12 N	12,81
2 V	20,87	12 V	14,17
3 A	-----	13 A	12,69
3 N	25,49	13 N	13,85
3 V	24,86	13 V	12,82
4 A	16,83	14 A	15,14
4 N	17,66	14 N	14,39
4 V	17,97	14 V	15,17
5 A	15,63	15 A	12,67
5 N	17,72	15 N	14,28
5 V	16,98	15 V	14,51
6 A	15,39	16 A	12,07
6 N	15,50	16 N	13,92
6 V	15,94	16 V	13,81
7 A	16,45	17 A	15,30
7 N	17,05	17 N	16,03
7 V	17,89	17 V	16,63
8 A	19,72	18 A	11,52
8 N	20,13	18 N	11,79
8 V	20,19	18 V	12,13
9 A	17,75	19 A	14,46
9 N	19,69	19 N	14,56
9 V	19,49	19 V	15,28
10 A	18,65	Control A	6,72
10 N	17,92	Control N	9,33
10 V	19,29	Control V	8,97

A: Muestra color amarillo.

N: Muestra color naranja.

V: Muestra color verde.

Anexo N° 5 Perfil anual de temperaturas y precipitaciones en la zona de estudio.

	Meses					
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
T. Media (° C)	16.0	15.6	14.3	12.7	11.6	10.3
T. Mínima (° C)	11.3	11.2	10.1	8.5	7.7	6.5
T. Máxima (° C)	20.3	20.3	19.0	17.4	16.2	14.9
Precipitación (mm)	0.2	0.1	2.3	11.4	48.1	78.7

	Meses					
	<i>Julio</i>	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
T. Media (° C)	10.0	10.4	11.0	12.3	13.8	15.1
T. Mínima (° C)	6.5	6.7	7.1	8.1	9.4	10.5
T. Máxima (° C)	14.4	14.8	15.4	16.5	17.9	19.4
Precipitación (mm)	106.4	53.5	21.8	9.7	7.4	1.4

FUENTE : Dirección Meteorológica de Chile, citado por ATMOSFERA.cl

Anexo N° 6 Resultados de la cuantificación de carotenos en polen corbicular.

Muestra	Prom. Conc. Caroteno (µg/g)	Muestra	Prom. Conc. Caroteno (µg/g)
1 A	3,7	11 A	12,9
1 N	128,2	11 N	83,5
1 V	12,3	11 V	10,6
2 A	-----	12 A	1,0
2 N	129,3	12 N	139,4
2 V	51,8	12 V	2,3
3 A	-----	13 A	24,5
3 N	171,9	13 N	172,6
3 V	75,6	13 V	17,1
4 A	9,9	14 A	10,1
4 N	88,4	14 N	114,3
4 V	31,0	14 V	5,5
5 A	12,4	15 A	1,4
5 N	84,8	15 N	84,7
5 V	27,5	15 V	15,0
6 A	45,0	16 A	27,0
6 N	86,5	16 N	165,4
6 V	10,5	16 V	63,8
7 A	7,3	17 A	18,5
7 N	115,9	17 N	130,4
7 V	28,1	17 V	12,3
8 A	18,2	18 A	15,3
8 N	158,1	18 N	116,3
8 V	13,3	18 V	10,9
9 A	7,1	19 A	22,5
9 N	136,4	19 N	150,9
9 V	18,2	19 V	11,7
10 A	16,6	Control A	50,9
10 N	122,3	Control N	105,3
10 V	57,5	Control V	40,1

A: Muestra color amarillo.

N: Muestra color naranja.

V: Muestra color verde.

Anexo N ° 7 Cromatogramas de la curva de calibración de carotenos para la determinación por HPLC.

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 5 11/26/02 16:39



INJ NO. OF STD : 1 / 1 REP , 1st level

D-2500

11/26/02 16:39

METHOD: CAROTENO TAG: 2 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 3 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	ug/ml	BC
1	4.62	1175	0.050	BB

RAW DATA STORAGE NO. 1

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 5 11/26/02 16:51



INJ NO. OF STD : 1 / 1 REP , 2nd level

D-2500

11/26/02 16:51

METHOD: CAROTENO TAG: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD 3 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	ug/ml
1	4.64	8952	

RAW DATA STORAGE NO. 2

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 5 11/26/02 17:03



INJ NO. OF STD : 1 / 1 REP , 3rd level

D-2500

11/26/02 17:03

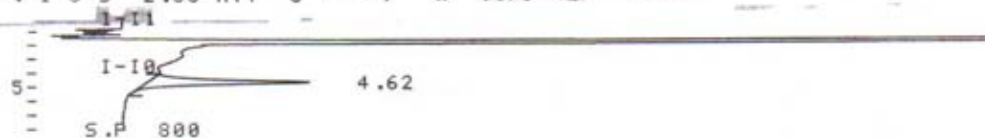
METHOD: CAROTENO TAG: 4 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 3 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	ug/ml	BC
1	4.62	14954	0.500	BB

RAW DATA STORAGE NO. 3

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 5 11/26/02 17:15



INJ NO. OF STD : 1 / 1 REP , 4th level

D-2500

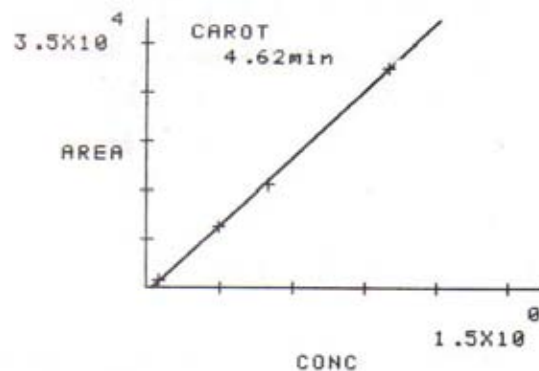
11/26/02 17:15

METHOD: CAROTENO TAG: 5 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 3 CONC: AREA

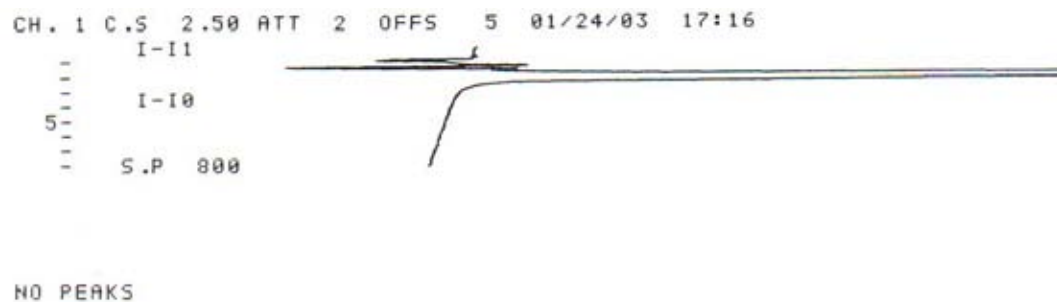
NO.	RT	AREA	ug/ml	BC
1	4.62	31673	1.000	BB

RAW DATA STORAGE NO. 4

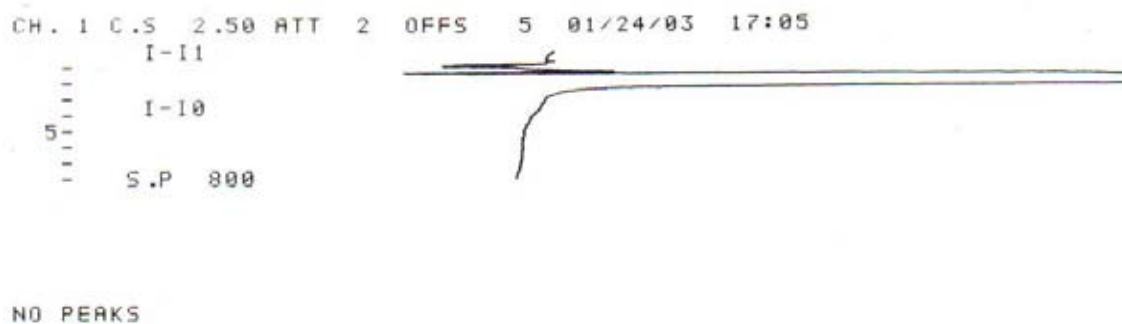


Anexo N° 8 Cromatogramas de la muestra 12 del polen estudiado y el polen comercial.

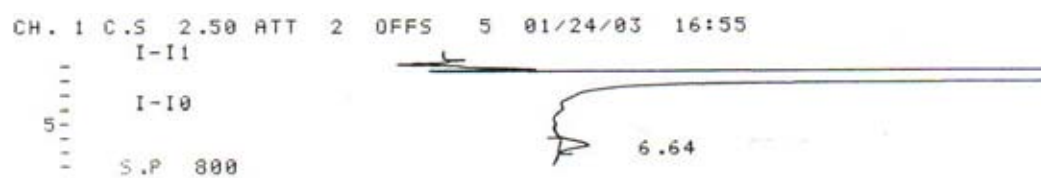
Muestra 12 Amarillo:



Muestra 12 Verde:



Muestra 12 Naranja:



D-2500 01/24/03 16:55

METHOD: CAROTENO TAG: 5 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 3 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	ug/ml	BC
1	6.64	3752	0.138	BB
TOTAL		3752	0.138	
PEAK REJ :		1000		
SF :		1.000		

Muestra de Polen comercial:



D-2500

01/24/03 16:41

METHOD: CAROTENO TAG: 4 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 3 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	ug/ml	BC
1	6.62	3062	0.116	BB
TOTAL		3062	0.116	
PEAK REJ :	1000			
SF :	1.000			

Anexo 9 Nivel de predominancia de una especie botánica específica en cada muestra corbicular.

MUESTRA	% PREDOMINANCIA	MUESTRA	% PREDOMINANCIA
1 A	96,6	11 A	94,7
1 N	78,3	11 N	93,4
1 V	60,1	11 V	-----
2 A	-----	12 A	-----
2 N	95,2	12 N	99,8
2 V	60,1	12 V	44,9
3 A	-----	13 A	-----
3 N	93,5	13 N	94,1
3 V	94,2	13 V	-----
4 A	99,2	14 A	100,0
4 N	73,3	14 N	88,4
4 V	-----	14 V	-----
5 A	98,6	15 A	99,7
5 N	-----	15 N	98,3
5 V	96,0	15 V	77,3
6 A	96,8	16 A	98,5
6 N	90,5	16 N	85,3
6 V	82,9	16 V	-----
7 A	99,4	17 A	100,0
7 N	100,0	17 N	94,1
7 V	54,2	17 V	62,1
8 A	95,4	18 A	100,0
8 N	81,4	18 N	63,6
8 V	38,3	18 V	65,7
9 A	97,0	19 A	100,0
9 N	90,3	19 N	62,0
9 V	52,7	19 V	-----
10 A	98,0	PROMEDIO:	84,60 %
10 N	88,1		
10 V	60,8		

A: Muestra color amarillo, N: Muestra color naranja, V: Muestra color verde.

Anexo N° 10 Resultados de la identificación botánica.

MUESTRA	ESPECIE PREDOMINANTE	MUESTRA	ESPECIE PREDOMINANTE
1 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>	11 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>
1 N	<i>Sisymbrium sagittatum</i>	11 N	<i>Satureja darwinii</i>
1 V	<i>Eucalyptus globulus</i>	11 V	-----
2 A	-----	12 A	-----
2 N	<i>Rubus ulmifolius</i>	12 N	<i>Quillaja saponaria</i>
2 V	<i>Malus pumila</i>	12 V	<i>Vicia faba</i>
3 A	-----	13 A	-----
3 N	<i>Fagaria chiloensis</i>	13 N	<i>Bahia ambrosoides</i>
3 V	<i>Amomyrtus luma</i>	13 V	-----
4 A	<i>Fagara mayu</i>	14 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>
4 N	<i>Fagaria chiloensis</i>	14 N	<i>Satureja darwinii</i>
4 V	-----	14 V	-----
5 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>	15 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>
5 N	-----	15 N	<i>Cryptocaria alba</i>
5 V	<i>Eucalyptus globulus</i>	15 V	<i>Eucalyptus globules</i>
6 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>	16 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>
6 N	<i>Satureja darwinii</i>	16 N	<i>Satureja darwinii</i>
6 V	<i>Eucalyptus globulus</i>	16 V	-----
7 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>	17 A	<i>Geranium core – core</i>
7 N	<i>Rubus ulmifolius</i>	17 N	<i>Bahia ambrosoides</i>
7 V	<i>Eucalyptus globulus</i>	17 V	<i>Fagara mayu</i>
8 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>	18 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>
8 N	<i>Satureja darwinii</i>	18 N	<i>Rubus ulmifolius</i>
8 V	<i>Eucalyptus globulus</i>	18 V	-----
9 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>	19 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>
9 N	<i>Cychorium intibus</i>	19 N	<i>Bahia ambrosoides</i>
9 V	<i>Sisymbrium sagittatum</i>	19 V	-----
10 A	<i>Sisymbrium sagittatum</i>	A : N : V :	Muestra color amarillo Muestra color naranja Muestra color verde
10 N	<i>Lithrea caustica</i>		
10 V	<i>Eucalyptus globulus</i>		

Anexo N° 11 Imágenes de los granos de pólenes predominantes (Aumento de 40 X).



*Sisymbrium
sagittatum*



*Fagara
mayu*



Geranium core - core



*Rubus
ulmifolius*



*Fragaria
chiloensis*



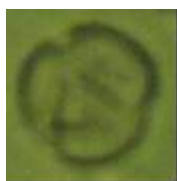
*Satureja
darwinii*



*Cychorium
intibus*



*Lithrea
caustica*



*Quillaja
saponaria*



*Bahia
ambrosoides*



*Cryptocaria
alba*



*Eucalyptus
globulus*



*Amomyrtus
luma*



*Lathyrus
hookeri*

Anexo N ° 12 Resultados del análisis colorimétrico.

MUESTRA	COLOR	VALOR “X”	VALOR “Y”	COLOR DR LANGE
1	Amarillo	0,49	0,41	Naranja amarillento
1	Anaranjado	0,57	0,37	Naranja
1	Verde	0,42	0,52	Verde amarillento
2	Amarillo	-----	-----	-----
2	Anaranjado	0,51	0,42	Naranja
2	Verde	0,39	0,55	Verde amarillento
3	Amarillo	-----	-----	-----
3	Anaranjado	0,58	0,35	Naranja rojizo
3	Verde	0,39	0,54	Verde amarillento
4	Amarillo	0,47	0,39	Naranja amarillento
4	Anaranjado	0,54	0,41	Naranja
4	Verde	0,39	0,53	Verde con leve matiz amarillo
5	Amarillo	0,47	0,44	Amarillo
5	Anaranjado	0,54	0,39	Naranja
5	Verde	0,33	0,59	Verde con leve matiz amarillo
6	Amarillo	0,49	0,42	Naranja amarillento
6	Anaranjado	0,57	0,36	Naranja rojizo
6	Verde	0,39	0,57	Verde amarillento
7	Amarillo	0,44	0,43	Naranja amarillento
7	Anaranjado	0,47	0,39	Naranja rosa
7	Verde	0,37	0,56	Verde con leve matiz amarillo
8	Amarillo	0,49	0,42	Naranja amarillento
8	Anaranjado	0,52	0,44	Naranja amarillento
8	Verde	0,32	0,57	Verde con leve matiz amarillo
9	Amarillo	0,45	0,43	Naranja amarillento
9	Anaranjado	0,54	0,41	Naranja
9	Verde	0,36	0,54	Verde con leve matiz amarillo
10	Amarillo	0,50	0,44	Naranja amarillento
10	Anaranjado	0,60	0,33	Naranja rojizo
10	Verde	0,38	0,53	Verde amarillento

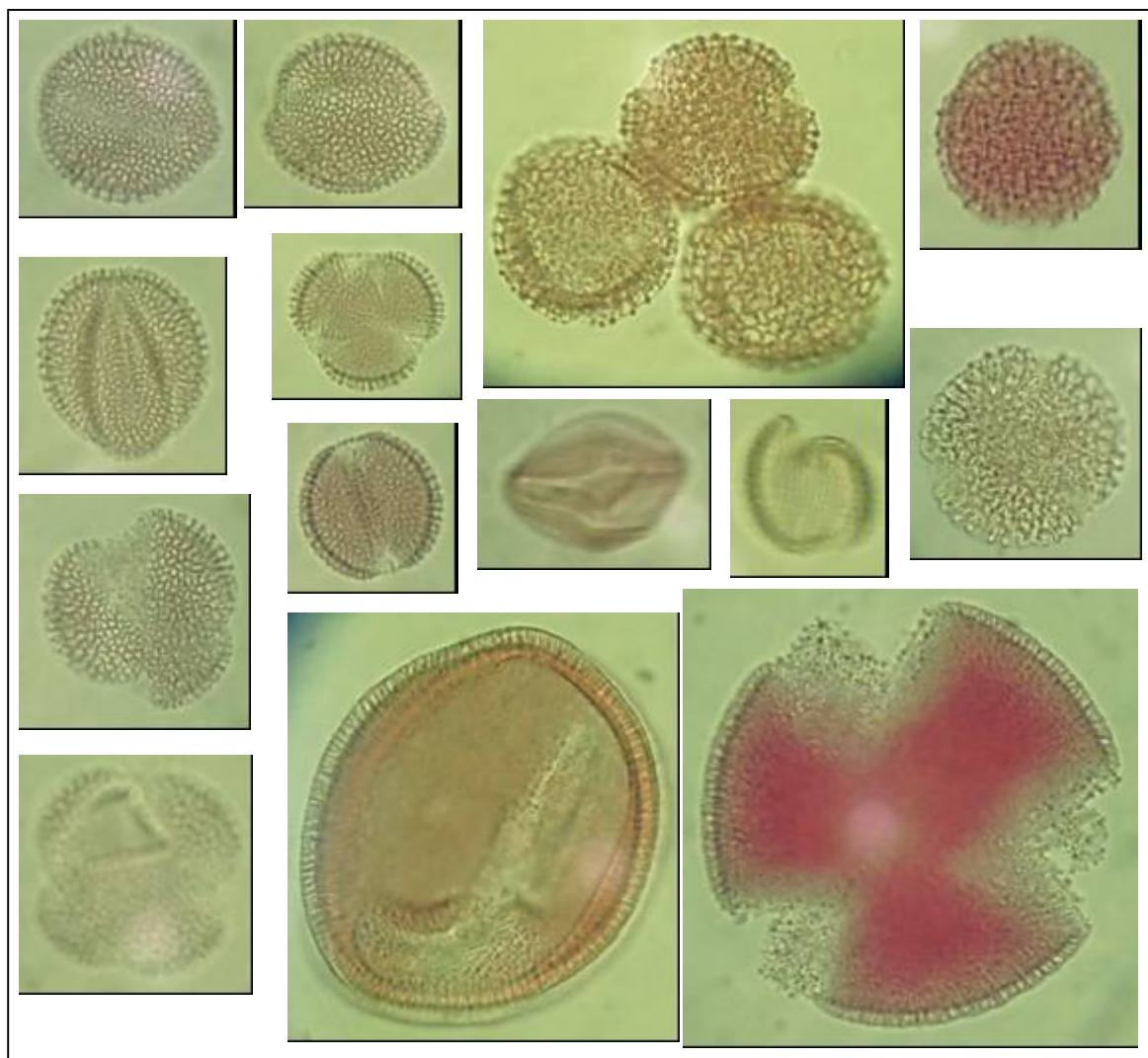
MUESTRA	COLOR	VALOR “X”	VALOR “Y”	COLOR DR LANGE
11	Amarillo	0,46	0,49	Amarillo
11	Anaranjado	0,53	0,39	Naranja rojizo
11	Verde	0,35	0,59	Verde con leve matiz amarillo
12	Amarillo	0,45	0,43	Amarillo
12	Anaranjado	0,58	0,38	Naranja rojizo
12	Verde	0,35	0,58	Verde con leve matiz amarillo
13	Amarillo	0,47	0,42	Naranja amarillento
13	Anaranjado	0,54	0,40	Naranja
13	Verde	0,33	0,60	Verde con leve matiz amarillo
14	Amarillo	0,46	0,44	Amarillo
14	Anaranjado	0,56	0,38	Naranja rojizo
14	Verde	0,42	0,53	Verde amarillento
15	Amarillo	0,46	0,44	Amarillo
15	Anaranjado	0,51	0,41	Naranja
15	Verde	0,32	0,57	Verde con leve matiz amarillo
16	Amarillo	0,45	0,43	Amarillo
16	Anaranjado	0,51	0,44	Naranja
16	Verde	0,33	0,61	Verde con leve matiz amarillo
17	Amarillo	0,43	0,42	Amarillo
17	Anaranjado	0,55	0,40	Naranja rojizo
17	Verde	0,39	0,54	Verde amarillento
18	Amarillo	0,45	0,45	Amarillo
18	Anaranjado	0,45	0,40	Naranja
18	Verde	0,33	0,54	Verde con leve matiz amarillo
19	Amarillo	0,46	0,45	Amarillo
19	Anaranjado	0,53	0,44	Naranja
19	Verde	0,35	0,59	Verde con leve matiz amarillo
Control	Amarillo	0,50	0,49	Amarillo
Control	Anaranjado	0,50	0,40	Naranja
Control	Verde	0,10	0,30	Verde azulado

Anexo N° 13 Resultados de la caracterización morfológica de las corbículas.

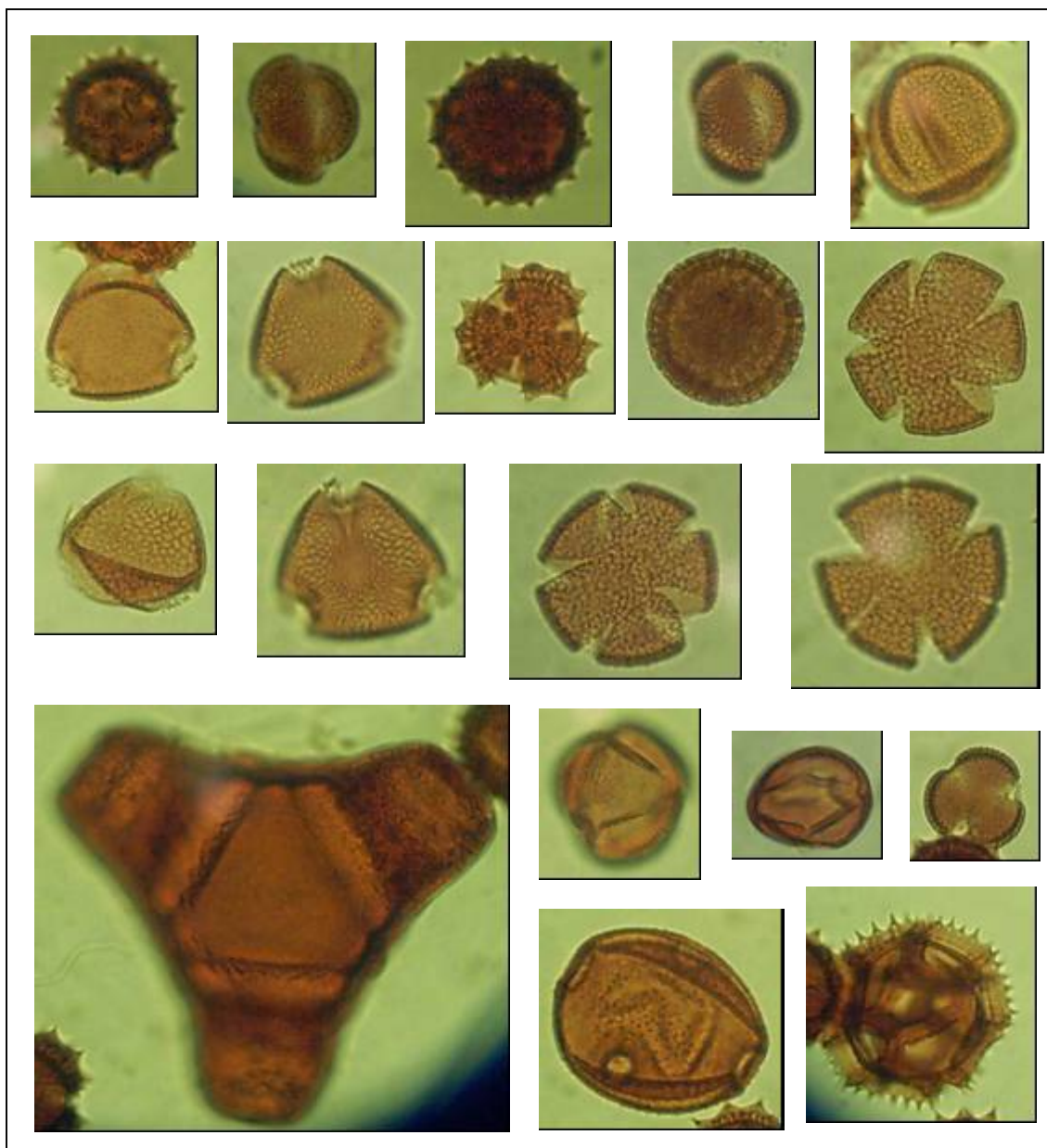
MUESTRA	COLOR	FORMA	TAMAÑO (mm)	PESO (mg)
1	Amarillo	Aplanado	3,4	9,72
1	Anaranjado	Aplanado	2,6	12,00
1	Verde	Redonda	2,6	12,75
2	Amarillo	-----	-----	-----
2	Anaranjado	Redonda	3,1	11,99
2	Verde	Redonda	2,5	11,65
3	Amarillo	-----	-----	-----
3	Anaranjado	Redonda	2,7	12,87
3	Verde	Redonda	3,2	17,02
4	Amarillo	Aplanado	3,0	8,02
4	Anaranjado	Redonda	2,9	11,32
4	Verde	Irregular	2,8	13,06
5	Amarillo	Aplanado	3,2	9,88
5	Anaranjado	Irregular	3,0	16,56
5	Verde	Irregular	2,8	14,30
6	Amarillo	Aplanado	3,2	9,03
6	Anaranjado	Irregular	3,1	12,77
6	Verde	Aplanado	3,0	15,50
7	Amarillo	Redonda	3,2	10,32
7	Anaranjado	Aplanado	3,4	19,64
7	Verde	Irregular	3,0	18,68
8	Amarillo	Redonda	3,1	9,15
8	Anaranjado	Irregular	2,7	11,68
8	Verde	Redonda	3,0	15,10
9	Amarillo	Irregular	3,3	8,69
9	Anaranjado	Irregular	2,9	11,29
9	Verde	Irregular	3,1	17,19
10	Amarillo	Redonda	2,9	11,12
10	Anaranjado	Redonda	3,2	14,06
10	Verde	Irregular	2,9	14,25

MUESTRA	COLOR	FORMA	TAMAÑO (mm)	PESO (mg)
11	Amarillo	Aplanado	3,1	10,90
11	Anaranjado	Redonda	3,3	17,12
11	Verde	Aplanado	3,0	20,26
12	Amarillo	Aplanado	3,0	10,20
12	Anaranjado	Redonda	2,9	11,76
12	Verde	Irregular	2,9	15,37
13	Amarillo	Irregular	2,9	9,23
13	Anaranjado	Irregular	2,8	14,38
13	Verde	Aplanado	3,0	14,20
14	Amarillo	Irregular	3,0	10,34
14	Anaranjado	Aplanado	2,9	11,58
14	Verde	Irregular	2,8	13,19
15	Amarillo	Aplanado	3,1	10,40
15	Anaranjado	Irregular	3,3	13,86
15	Verde	Aplanado	2,9	17,32
16	Amarillo	Irregular	3,2	10,35
16	Anaranjado	Aplanado	2,7	12,50
16	Verde	Irregular	2,9	11,31
17	Amarillo	Irregular	2,7	9,33
17	Anaranjado	Redonda	2,9	12,78
17	Verde	Irregular	3,0	13,48
18	Amarillo	Redonda	3,4	9,96
18	Anaranjado	Redonda	2,8	14,74
18	Verde	Aplanado	2,6	11,54
19	Amarillo	Redonda	3,0	8,08
19	Anaranjado	Irregular	2,7	11,08
19	Verde	Aplanado	2,8	12,12
Control	Amarillo	Aplanado	3,2	9,52
Control	Anaranjado	Redonda	3,6	10,36
Control	Verde	Redonda	2,4	9,75

Anexo N° 14 Granos de polen encontrados en la muestra 17 amarillo.



Anexo N° 15 Granos de polen encontrados en la muestra 17 naranjo.



Anexo N° 16 Granos de polen encontrados en la muestra 3 verde.

