



# ***UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR***

TESIS DE DOCTORA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS

“CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE POLEN  
APÍCOLA ARGENTINO SEGÚN EL ORIGEN BOTÁNICO Y  
COMPOSICIÓN QUÍMICA”

Bioquímica María Soledad García Paoloni

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2021

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito de los Departamentos de Química y Agronomía durante el período comprendido entre el 17 de marzo de 2013 y el 31 de diciembre de 2020, bajo la dirección del Dr. Marcelo Fabián Pistonesi, Profesor Adjunto de Química Analítica y la co-dirección de la Dra. Ana Cristina Andrada, Profesora Asociada de Sistemática Vegetal (jubilada).

Bioquímica María Soledad García Paoloni

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p>
<p>La presente Tesis ha sido aprobada el 29 / 4 / 2021, mereciendo la calificación de 10 Sobresaliente.</p>	



---

*“No puedo cambiar la dirección del viento, pero puedo ajustar las velas  
para llegar siempre a mi destino”*

*James Dean*

---



## AGRADECIMIENTOS

Al universo, por darme la posibilidad de involucrarme en la investigación en apicultura a los casi cuarenta años de mi vida.

A los apicultores en general, porque indirectamente dispararon mi curiosidad hacia la diversificación productiva y, particularmente, hacia la producción de polen. Agradezco especialmente a quienes colaboraron con muestras para ser analizadas: José Luis Cuesta, Saúl Ortiz, Germán Balbarrey y Daniel Cuello.

A la institución en la que trabajo, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), que me permitió acceder al programa de capacitación.

A la Universidad Nacional del Sur, institución a la que amo y de la que me siento orgullosa como egresada de la carrera de grado y, ahora, de posgrado.

Como considero que las instituciones son grandes debido a las personas que las integran; en este sentido agradezco particularmente a mis directores: Dr. Marcelo Pistonesi y la Dra. Ana Andrada por su tiempo y orientación en todo el camino recorrido para concretar este trabajo de tesis. En relación a ellos, hago extensivo el agradecimiento a los respectivos equipos de trabajo en los Departamentos de Química y de Agronomía, ya que me hicieron sentir parte de cada grupo compartiendo tanto jornadas laborales como situaciones personales.

También agradezco a todos los profesores que dictaron cada una de las materias cursadas por su aporte a mi formación.

A la Mg. Liliana Gallez por sus consejos en las distintas etapas de este proyecto personal.

A las Dras. Susana Di Nezio, María Centurión y Leticia Fernández por sus aportes en la escritura de la tesis y por su calidad humana.

A mis queridos compañeros del área de apicultura y amigos: Enrique Schmid (Q.E.P.D.) y Esteban Llanquihuen quienes aportaron mucho en el trabajo de campo.

A mis compañeros de trabajo de las diferentes instituciones quienes colaboraron de diferente manera ante mis demandas: Romi Storniolo, Fede Vallese, Gabriela Krepper, Irene Cibanal, Valeria Springer, Luciana Dunel, Cristina Winschel, Alejandro Pezzola, Juan Pablo Renzi, Gabriela Rozas Dennis y Ethel Perez.

Un agradecimiento especial a los Dres. Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz, David Douglas de Sousa Fernandes y José Germano Vêras Neto quienes me iniciaron en el mundo de la quimiometría.

Finalmente, a mi familia: a mis padres, hermanos e hijas por su comprensión y apoyo incondicional durante todo el proceso. También a Diego por su soporte emocional en la última etapa. A ellos va dedicado especialmente este trabajo.

## RESUMEN

El polen apícola es uno de los productos de la colmena más conocido. Las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) lo recolectan como una de sus principales fuentes de alimento. Si bien ha sido utilizado por las civilizaciones egipcia y griega atribuyéndole propiedades terapéuticas y “rejuvenecedoras”, no fue hasta después de la Segunda Guerra Mundial que comenzó a aumentar la producción y su consumo. Actualmente sus características composicionales lo constituyen en un excelente suplemento nutricional y debido a sus propiedades bioactivas es considerado un alimento funcional.

Por otra parte, el polen es uno de los productos de la colmena que presenta mayor variabilidad composicional atribuido principalmente a las diferentes floraciones visitadas por las abejas. En este sentido, el análisis entomopalinológico es apropiado para clasificarlo como multi o monofloral siendo este último más estable composicionalmente, aunque también puede sufrir algunas variaciones según la zona de producción. Por esta razón, es imprescindible caracterizar al polen apícola fisicoquímicamente para poder asegurar su calidad endógena y brindar información completa al potencial consumidor. Así, el principal objetivo de este trabajo de tesis es desarrollar metodologías analíticas que permitan determinar la composición del polen de abeja recolectado en la zona centro de Argentina.

Inicialmente la clasificación entomopalinológica de las muestras se realizó mediante la acetólisis de los granos de polen evitando la separación por colores de las cargas corbiculares, que es la etapa del proceso que demanda más tiempo.

Desde el punto de vista físico-químico se desarrolló una metodología rápida y de bajo costo para la determinación de humedad y proteínas totales en un pool de cargas corbiculares empleando espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR) y técnicas quimiométricas tales como SPA-MLR e *i*SPA-PLS. Además, la utilización del modelo *i*SPA-PLS-DA permitió la clasificación de las muestras en relación a un contenido proteico de 20%.

Por otra parte, se pusieron a punto técnicas de microanálisis para evaluar el contenido de polifenoles, flavonoides y proteínas en cargas corbiculares individuales estableciendo los respectivos coeficientes de variación. De esta manera se confirmó la elevada variabilidad que presentan los mencionados parámetros en la matriz apícola probablemente relacionados al origen botánico. Asimismo, se construyó un modelo quimiométrico en base a espectroscopía NIR para estimar el contenido de polifenoles totales en cargas individuales de polen corbicular.

Finalmente, en relación al tratamiento poscosecha, se llevó adelante un ensayo cuantitativo *in vitro* de actividad antimicrobiana utilizando un extracto etanólico de propóleos como preservante de polen fresco como una alternativa de conservación de bajo costo.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que el polen de abeja recolectado en la zona centro de Argentina presenta muy buenas características nutricionales y bioactivas en base al contenido de proteínas, polifenoles y flavonoides definidos principalmente por los taxones Brassicaceae (mayormente *Diplotaxis tenuifolia*), *Eucalyptus* sp. y *Lotus* sp. La incorporación de las metodologías desarrolladas en este trabajo para realizar el control de calidad de este producto apícola permitiría el correcto rotulado del producto comercial o, incluso definir su destino para las diferentes industrias (alimenticia, farmacéutica, cosmética).

## ABSTRACT

Bee pollen is one of the best-known beehive products. Honey bees (*Apis mellifera* L.) collect it as one of their main food sources. Although it has been used by the Egyptian and Greek civilizations ascribing therapeutic and "rejuvenating" properties to it, it was after the Second World War that the production and consumption increased. Currently, its compositional characteristics make it an excellent nutritional supplement, and due to its bioactive properties, it is considered a functional food.

On the other hand, bee-pollen is the hive product that presents the greatest compositional variability, attributed mainly to the different blooms visited by bees. In this sense, the entomopalynological analysis is suitable to classify it as multi or monofloral, being the latter more stable in its composition, although it may also undergo some variations depending on the production area. For this reason, it is essential to perform a physicochemical characterization of the bee-pollen to ensure its endogenous quality and provide complete information to the potential consumer. Thus, the main objective of this thesis is to develop analytical methodologies that allow determining the composition of the bee-pollen collected in central Argentina.

Initially the entomopalynological classification of the samples was carried out through the acetolysis of the pollen grains, avoiding the separation by colours of the corbicular pellets, which is the stage of the process that requires more time.

From the physicochemical point of view, a rapid and low-cost methodology was developed for the determination of moisture and total proteins in a pool of bee-pollen pellets using near-infrared spectroscopy (NIR) and chemometric techniques such as SPA-MLR and iSPA-PLS. Moreover, the use of the iSPA-PLS-DA model allowed the classification of the samples concerning a protein content of 20%.

On the other hand, microanalysis techniques were developed to evaluate the content of polyphenols, flavonoids and proteins in individual corbicular loads, establishing the respective variation coefficients. In this way, the high variability of the mentioned parameters presented in the apicultural matrix was confirmed, probably related to botanical origin. Likewise, a chemometric model based on NIR spectroscopy was constructed to estimate the total polyphenols content in individual loads of corbicular pollen.

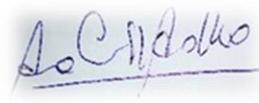
Finally, concerning postharvest treatment, a quantitative in vitro antimicrobial activity test was carried out using an ethanolic extract of propolis as a preservative for fresh pollen as a low-cost conservation alternative.

The results obtained in this thesis indicate that the bee-pollen collected in central Argentina has very good nutritional and bioactive characteristics based on the content of proteins, polyphenols, and flavonoids defined mainly by the Brassicaceae taxa (mostly *Diplotaxis tenuifolia*), *Eucalyptus* sp. and *Lotus* sp. The incorporation of the methodologies developed in this work to carry out the quality control of this beekeeping product would allow the correct labelling of the commercial product or even define its destination for the different industries (food industry, pharmaceuticals, cosmetics).

Certifico que fueron incorporados los cambios y correcciones sugeridas por el jurado



Director  
Marcelo F. Pistonesi



Codirectora  
Ana C. Andrada

## ÍNDICE

### Capítulo 1: Introducción

1.1 Marco de referencia.....	2
1.1.1 Contexto apícola internacional y nacional.....	2
1.1.2 Motivación.....	3
1.2 La colmena: sus habitantes y sus productos.....	5
1.2.1 Reseña histórica de los productos apícolas.....	5
1.2.2 La abeja melífera .....	7
1.2.3 Polen, polen apícola y pan de polen .....	8
1.2.4 Producción de polen apícola.....	10
1.2.5 Composición química .....	14
1.2.6 Importancia del polen apícola para el hombre.....	17
1.3 Objetivos .....	20
1.3.1 Objetivo general .....	20
1.3.2. Objetivos específicos.....	20
1.4 Bibliografía.....	21

### Capítulo 2: Muestras: origen y obtención

2.1 Objetivo.....	25
2.2 Obtención de polen apícola.....	25
2.3 Origen de las muestras .....	26
2.3.1 Sitios de muestreo.....	26
2.3.2 Conformación, acondicionamiento y conservación de muestras.....	28
2.3.3 Caracterización geográfica de la zona de muestreo.....	29
2.3.3.1 Complejo ecosistémico “Planicies y Mesetas Norpatagónicas”.....	33
2.3.3.2 Complejo ecosistémico “Ecotono con Patagonia”.....	34
2.4 Bibliografía.....	36

### Capítulo 3: Determinación del origen botánico: análisis entomopalinológico

3.1 Objetivo.....	39
3.2 Introducción .....	39
3.3 Materiales y métodos .....	46
3.3.1 Muestras utilizadas .....	46
3.3.2 Metodología de análisis .....	49
3.3.2.1 Metodología tradicional (Método de Wodehouse) .....	49
3.3.2.2 Metodología de acetólisis (Erdtman 1969) modificada:.....	51

3.4 Resultados y discusión .....	55
3.4.1 H. Ascasubi.....	63
3.4.2 Médanos.....	66
3.4.3 Viedma.....	71
3.4.4 Villalonga .....	74
3.4.5 Jacinto Arauz .....	75
3.4.6 Clasificación de muestras: .....	76
3.5 Conclusiones parciales .....	79
3.6 Bibliografía.....	80
<b>Capítulo 4: Determinación de humedad y proteínas totales empleando NIR y quimiometría</b>	
4.1 Objetivos .....	86
4.2 Introducción .....	86
4.3 Materiales y métodos .....	88
4.3.1 Muestras.....	89
4.3.2 Determinación de humedad .....	89
4.3.3 Determinación de proteínas totales.....	90
4.3.4 Obtención de espectros NIR .....	92
4.3.5 Preprocesamiento de los espectros y construcción de modelos quimiométricos .....	93
4.4 Resultados y discusión .....	95
4.4.1 Humedad y proteínas totales.....	95
4.4.2 Análisis espectral NIR .....	97
4.4.2.1 Determinación de humedad .....	97
4.4.2.2 Determinación de proteína .....	100
4.4.2.3 Clasificación del polen de abeja según el contenido de proteínas .....	102
4.5 Conclusiones parciales .....	104
4.6 Bibliografía.....	104
<b>Capítulo 5: Análisis de proteínas totales y compuestos bioactivos en cargas individuales de polen corbicular</b>	
5.1 Objetivos .....	109
5.2 Introducción .....	109
5.3 Materiales y métodos .....	110
5.3.1 Muestras.....	110
5.3.2 Determinación de humedad .....	110
5.3.3 Determinación de proteínas totales.....	111
5.3.4 Determinación de polifenoles y flavonoides totales.....	112

5.3.5 Obtención de espectros NIR .....	113
5.3.6 Procesamiento quimiométrico de los datos espectrales.....	114
5.4 Resultados y discusión .....	115
5.4.1 Microanálisis de proteínas, polifenoles y flavonoides totales .....	115
5.4.2 Determinación de polifenoles mediante espectroscopía NIR y PLS.....	118
5.5 Conclusiones parciales .....	120
5.6 Bibliografía.....	121

## Capítulo 6: Evaluación de un extracto etanólico de propóleos como preservante de polen apícola destinado al consumo humano

6.1 Objetivo.....	128
6.2 Introducción .....	128
6.3 Materiales y métodos .....	130
6.3.1 Muestras de polen y propóleos .....	130
6.3.2 Caracterización química del EEP .....	131
6.3.2.1 Determinación de extracto seco:.....	131
6.3.2.2 Cuantificación de polifenoles totales:.....	131
6.3.2.3 Determinación de flavonoides totales:.....	131
6.3.2.4 Espectro Uv-Vis:.....	132
6.3.3 Análisis microbiológicos:.....	132
6.3.4 Análisis estadísticos:.....	133
6.4 Resultados y discusión .....	134
6.5 Conclusiones parciales .....	138
6.6 Bibliografía.....	139

## Capítulo 7: Conclusiones

Conclusiones generales .....	143
------------------------------	-----

## ANEXOS

ANEXO I.....	145
1. Técnica de wodehouse.....	145
2. Técnica de acetólisis (Erdtman, 1960) .....	145
3. Microacetólisis (Pla-Dalmau 1961).....	147
ANEXO II .....	148
ANEXO III.....	150

# Capítulo 1



Introducción



## 1.1 Marco de referencia

### 1.1.1 Contexto apícola internacional y nacional

La miel es el principal producto de la explotación apícola a nivel mundial y se comercializa como un commodity. En el año 2018 la producción mundial fue de aproximadamente 1.9 millones de toneladas, siendo China el principal productor [1].

Argentina es el país con mayor cantidad de colmenas del hemisferio sur y es reconocida por la calidad de la miel que se produce en gran parte de su territorio, con una cantidad aproximada de 28.600 apicultores que explotan alrededor de 2,5 millones de colmenas en todo el país. El complejo productivo apícola constituye un ejemplo de cadena agroalimentaria consolidada. Esta situación no solo lo posiciona dentro de los líderes en producción y exportación de miel, sino que es considerado como referente internacional en el desarrollo de tecnologías de producción gracias a la institucionalidad vinculada al sector productivo [2,3].

Con respecto a la comercialización se exporta aproximadamente el 95% de la miel que se produce, mayormente a granel (tambores de aproximadamente 300 kg), siendo los destinos más importantes Estados Unidos, la Unión Europea (predominantemente Alemania) y Japón. Si bien la miel es el principal producto exportable, también se exporta material vivo, cera, maquinarias e insumos apícolas como así también servicios técnicos de consultoría. Por otra parte, el mercado interno está poco desarrollado comparado con otros países [2,3].

Asimismo, Argentina posee un extenso territorio apto para el desarrollo de la apicultura y, debido a ello, presenta distintos potenciales productivos tanto para la obtención de miel como de los demás productos que elaboran las abejas. La mayor cantidad de colmenas se concentran en la zona central del país, aunque el avance de la frontera agrícola ha traído aparejado un corrimiento de las mismas hacia microrregiones ganaderas generando una fuerte competencia entre apicultores por la flora apícola y, en consecuencia, mermando su rendimiento productivo. A esta situación se le suma el aumento en los costos de producción y los vaivenes de la demanda externa afectando directamente la rentabilidad. A este contexto se le agrega el factor climático adverso relacionado principalmente con las sequías o, incluso, las inundaciones que se registraron en la última década (según la zona geográfica considerada). Como resultado de esta situación multifactorial Argentina ha experimentado una baja en su producción desde el año 2005 (año de producción récord) hasta la actualidad (Figura 1.1) aunque manteniéndose estable



en el ranking de la producción mundial con aproximadamente 80.000 toneladas en el año 2018 [1–5].



**Figura 1.1.** Evolución de las exportaciones de miel de Argentina (2001-2017, en miles de toneladas y miles de USD). Fuente: C. Sanchez, H. Castignani, y M. Rabaglio, “El Mercado Apícola Internacional”, 2018.

### 1.1.2 Motivación

Descubrir la “investigación” cerca de los 40 años de la mano del apasionante mundo vinculado a la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) fue el principal motivo para redireccionar mi incumbencia profesional y comenzar a involucrarme con la apicultura y muchos de los actores de esta cadena productiva. La primera vez que abrí una colmena fue lo que considero un “amor a primera vista” que se consolidó en el transcurso de los años hasta la actualidad y que sigue creciendo cada día que aprendo algo más de estos maravillosos insectos y de todo lo relacionado con ellos.

Pero si bien las protagonistas principales de esta historia son las abejas, no son menos importantes quienes las cuidan: los apicultores. Es debido a la brillante labor que ellos realizan que podemos adquirir y hacer uso de tan nobles productos como la miel, el polen, el propóleos, la jalea real, la cera y también la apitoxina. Gracias al contacto que he tenido con los productores apícolas de la zona donde resido y trabajo (Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Alimentaria: EEA INTA de Hilario Ascasubi) he percibido la problemática relacionada con la pérdida de la rentabilidad productiva mencionada en el punto



anterior. Por esta razón, desde el año 2013, comencé a involucrarme con actividades relacionadas a la diversificación apícola para tratar de mejorar la situación a nivel local. A partir de esta instancia inicié ensayos para conocer la factibilidad de producir tanto polen como propóleos en la zona. El proyecto consideraba evaluar tanto la cantidad producida como la calidad del producto obtenido. En relación a esto último hice contacto con el área de Química Analítica de la Universidad Nacional del Sur. Asimismo, en el mencionado proceso he descubierto mi pasión por el estudio de los productos de la colmena.

Por otra parte, al comenzar a buscar bibliografía sobre la producción de polen entendí que muchos de los trabajos realizados en nuestro país aportaban al conocimiento desde la óptica del manejo de las colmenas (por ejemplo, la relación entre el polen recolectado por las abejas y su nutrición) pero poco sobre los aspectos nutricionales para considerar a este producto de la colmena como un alimento para consumo humano. También observé que, si el mercado interno de la miel en Argentina es mínimo, el vinculado al polen es mucho menor y mayormente debido a la ausencia de información sobre los beneficios que se obtiene al consumir cualquiera de los mencionados productos.

La realidad descrita en la sección 1.1.1 podría considerarse como “debilidad” si se planteara un análisis FODA (“fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas”) para la producción apícola nacional actual, pero también existen “oportunidades” que se deben considerar al momento de pensar en mejoras para el sector. En relación a esto hay una tendencia mundial a una mayor urbanización y una mejora en los ingresos per cápita que propiciarían un cambio en las dietas; es decir existirá un nicho poblacional (tanto en el mercado interno como externo) con alto poder adquisitivo que demandará alimentos de calidad. Simultáneamente aumenta la preferencia de los consumidores a elegir alimentos más naturales y saludables. Los productos de la colmena, entre ellos el polen, cumplen con los requisitos de ser poco procesados y, la mayoría de ellos, hasta son considerados alimentos funcionales. Si bien, éstos pueden considerarse poco accesibles para la mayor parte de la población, está aumentando el consumo mundial en las últimas décadas. En relación a esto último, en el caso particular del polen (aunque puede extenderse el concepto a otros productos apícolas) existe una gran variabilidad en la calidad del mismo en base a su procedencia productiva (diferentes zonas del país o del mundo) principalmente debido a la fuente botánica utilizada por la abeja. Es por esta razón que se hace imprescindible la caracterización del polen producido en una determinada región para poder comercializarlo para consumo humano. Por otra parte, desarrollar nuevas tecnologías de



producción y procesamiento (en el que se incluye el análisis de calidad) favorecerán el valor agregado en origen sumando rentabilidad al sector. Este concepto es básicamente el eje central del objetivo planteado en el presente trabajo de tesis.

Dentro de las “fortalezas” se puede considerar a Argentina como un país emergente con el potencial productivo necesario para afrontar la diversificación productiva apícola y satisfacer la demanda de estos productos debido no solo a la riqueza de sus recursos naturales sino también al avanzado complejo productivo. En este sentido se procederá a evaluar la posibilidad de producir polen en una determinada zona geográfica debido a que en la misma existe un gran número de colmenas.

Finalmente, no puedo dejar de incluir en mi motivación la necesidad de abordar el problema desde diferentes ópticas disciplinarias para obtener un resultado que, según mi criterio, será mucho más rico y valioso. En este sentido considero que participar en un grupo de trabajo interdisciplinario permite aprender mucho más de lo estrictamente planteado en el plan de tesis original y, por qué no, hasta perfeccionarlo en el transcurso de su desarrollo. Asimismo, la vinculación interinstitucional (en este caso INTA-Universidad Nacional del Sur) parece ser una interesante manera de llevar adelante proyectos que no podrían desarrollarse en forma individual. Personalmente creo que la modalidad de trabajo interdisciplinaria e interinstitucional debería ser esencial al momento que se tenga que abordar cualquier proyecto de investigación.

En resumen, la motivación para realizar este trabajo es una interesante combinación de la pasión que me despertó la apicultura y sus productos, sus protagonistas y la modalidad de trabajo de manera interdisciplinaria e interinstitucional.

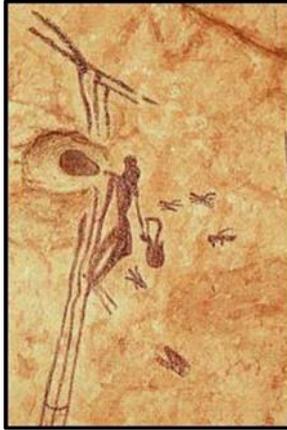
## **1.2 La colmena: sus habitantes y sus productos**

### **1.2.1 Reseña histórica de los productos apícolas**

La abeja melífera (*Apis mellifera* L.) es uno de los insectos sociales de mayor distribución mundial, reconocida desde la antigüedad debido a su principal producto: la miel. Los primeros registros de la adquisición de los productos apícolas por el hombre provienen de las pinturas encontradas en una caverna (Cueva de la Araña) ubicada cerca de la ciudad de Valencia,



España. La pintura (Figura 1.2) representa una persona recolectando miel de abejas silvestres y se cree que pertenecen a la edad de piedra (8.000 – 5.000 a.C.) [6,7].



**Figura 1.2.** Escena de recolección de miel hallada en la Cueva de la Araña (Museo de la Prehistoria, Valencia).  
Fuente: <http://www.hiru.com/arte/el-arte-prehistorico>

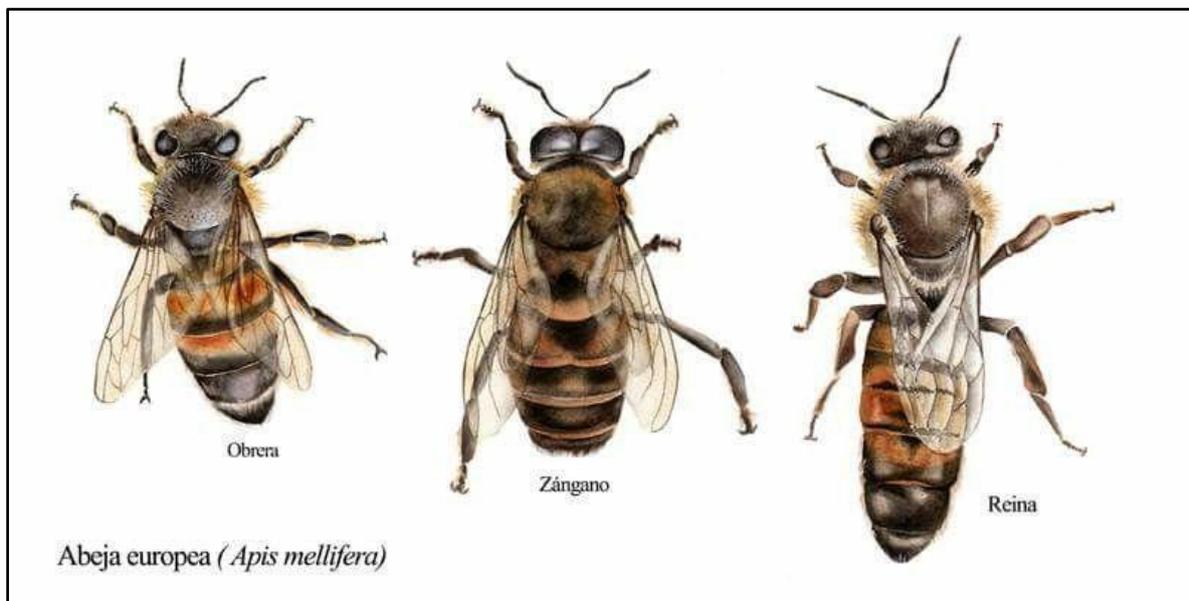
En otra época más actual Aristóteles (384-322 a.C.) menciona algunas observaciones realizadas a las abejas en sus obras *De generatione animalium X* e *Historia animalium IX*. En general los griegos creían que la miel y el polen eran alimento para reyes proporcionándoles no solo la vida sino también juventud; aunque Hipócrates, Plinio el Viejo y Pitágoras ya le atribuían efectos terapéuticos. Asimismo, se hace referencia al polen en las sagradas escrituras, entre ellas la Biblia. No obstante, no fue hasta mediados del siglo pasado que se comenzó a utilizar a mayor escala para consumo humano [6,7].

Los principales productos de las abejas desde tiempos ancestrales (civilizaciones egipcias, griega y china) fueron la miel y la cera; pero luego de la Segunda Guerra Mundial han tomado relevancia otros como polen, propóleos, jalea real y apitoxina. Este cambio fundamental en la producción apícola se debió a que durante la post-guerra tanto los bajos precios de la miel como el reemplazo de la cera por otras sustancias de mayor uso industrial, llevó a los apicultores a diversificar su producción. Además, se generaron nuevas tecnologías para poder resolver los manejos adecuados para la cosecha (por ej. el desarrollo de las trampas para polen), manipulación y conservación de estos productos perecederos de la colmena y, por otra parte, surgió un nuevo concepto de alimentos saludables y suplementos nutricionales entre la población que podía acceder a ellos. Consecuentemente en muchos países se comenzó a buscar mercados para estos nuevos productos [6,8,9].



### 1.2.2 La abeja melífera

La colonia de abejas es básicamente una unidad biológica sin la cual ningún individuo puede sobrevivir en forma independiente. Socialmente se organizan en tres castas: abeja reina, obreras y zánganos (Figura 1.3). Los últimos cumplen principalmente la función de fertilizar a la reina quien luego desovarà huevos fértiles permitiendo la continuidad de la especie. Las obreras son las responsables de la mayoría de las labores para el correcto funcionamiento de la colonia: construcción de los panales, limpieza, alimentación de crías, defensa y recolección (o pecoreo) de agua, néctar, polen y propóleos [6,10].



**Figura 1.3.** Castas de abejas: obrera, zángano y reina.

Fuente: <https://i.pinimg.com/originals/96/eb/86/96eb86b1d2912fdd034a710832bda055.jpg>

Desde el punto de vista nutricional la abeja melífera obtiene todo lo que necesita de las plantas, excepto el agua. Las tareas de recolección de los diferentes insumos para el desarrollo de la colonia y cuidado de la colmena son llevadas a cabo por obreras adultas denominadas “pecoreadoras”, cubriendo distancias de hasta 3 km desde su colmena [11,12]. El néctar es la principal fuente energética; al ser rico en azúcares (principalmente fructosa y glucosa) aporta la energía requerida para los vuelos de pecoreo. Asimismo, es la materia prima para la fabricación de la miel. Por otra parte, el polen es el alimento básico del estado larvario y es la



principal fuente de proteína, aminoácidos, vitaminas y lípidos que son esenciales para el desarrollo de las crías [11]. La cantidad y calidad del polen recogido en el campo por las abejas definirá la productividad de la colmena, ya que afecta directamente la reproducción, la calidad de la cría y, por ende, la longevidad de la colonia [13,14].

Como la mayoría de las abejas sociales *Apis mellifera* L. obtiene su alimento de un gran número de plantas, razón por la cual se las clasifica como “poliléticas”; sin embargo, aunque suele disponer de una gran variedad de fuentes florales dentro del ambiente en el que se encuentra, es extremadamente selectiva. En el caso particular del pecoreo de polen esta selección se basa principalmente en aspectos genéticos de la propia abeja y a un conjunto de estímulos que inducen la recolección, entre otros, la abundancia de la oferta, el aspecto pulverulento del polen y la presencia de sustancias atractivas. El análisis microscópico del polen recolectado permite conocer las plantas poliníferas utilizadas y el aporte de cada una de ellas [11]. Igualmente, este análisis es un componente importante en la determinación de la calidad del polen apícola comercial como se verá más adelante. Según la bibliografía una colonia puede llegar a recolectar entre 50 y 250 g de polen por día [7], aunque productores de polen de la zona del Delta del Paraná llegan a obtener hasta un kg por colmena por día en el pico de la floración local [15].

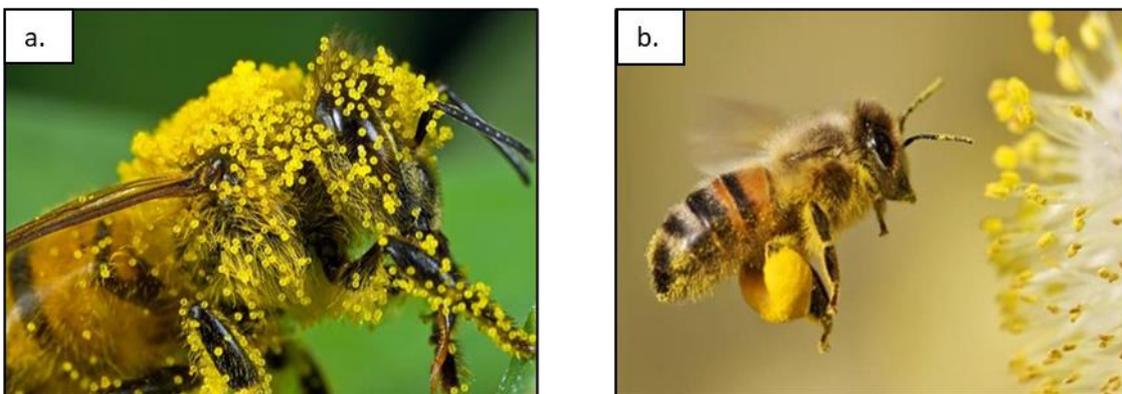
### 1.2.3 Polen, polen apícola y pan de polen

El “polen” como concepto botánico proviene del latín “polleninis” que significa polvo muy fino [16] y hace referencia al polvillo liberado por las plantas productoras de semillas (angiospermas y gimnospermas). Gramaticalmente la palabra polen es un sustantivo colectivo (se refiere a muchos individuos) aunque se lo suele utilizar como sustantivo individual. Al “individuo” se lo denomina “grano de polen”. Entonces el “polen” está constituido por microscópicos granos de polen que guardan en su interior las células reproductivas masculinas (gametos masculinos o anterozoides). Su función biológica es alcanzar la estructura femenina de una planta de su misma especie y hacer posible la fecundación de la ovocélula (gameto femenino). En este sentido el traslado del polen desde el órgano donde se ha formado hasta la parte femenina de la flor se conoce como polinización. En relación a este concepto la abeja melífera es uno de los



polinizadores más reconocido en todo el mundo (polinización entomófila); de ella depende la producción de muchos de los alimentos que consumimos [13,16].

Las abejas melíferas pueden realizar la recolección del polen tanto de manera activa como pasiva. La última modalidad es la más común y es debido a que el cuerpo de la pecoreadora (cargado positivamente) genera un débil campo electrostático al posarse en la estructura floral (cargada negativamente) atrayendo cientos o miles de granos polínicos sobre su cuerpo [18]. Luego este insecto inicia el procedimiento recolector que consiste básicamente en “cepillar” las pequeñas partículas depositadas sobre su cuerpo (Figura 1.4.a) con movimientos de limpieza. Durante este proceso, el polen es humedecido con el néctar regurgitado desde el buche melario de la pecoreadora permitiendo que los granos se adhieran entre sí. Finalmente lo comprimen y depositan en una estructura especial en su tercer par de patas denominado corbícula para poder transportarlo hasta la colmena en forma de “pelotitas” denominadas cargas corbiculares, cargas polínicas o polen corbicular (Figura 1.4.b) [6,12,13]. Este producto elaborado por la abeja es el denominado polen apícola. El peso promedio del polen transportado por una abeja es de 7,5 mg aproximadamente [7].



**Figura 1.4.** Abeja melífera **a.** cubierta de polen., **b.** transportando cargas corbiculares.

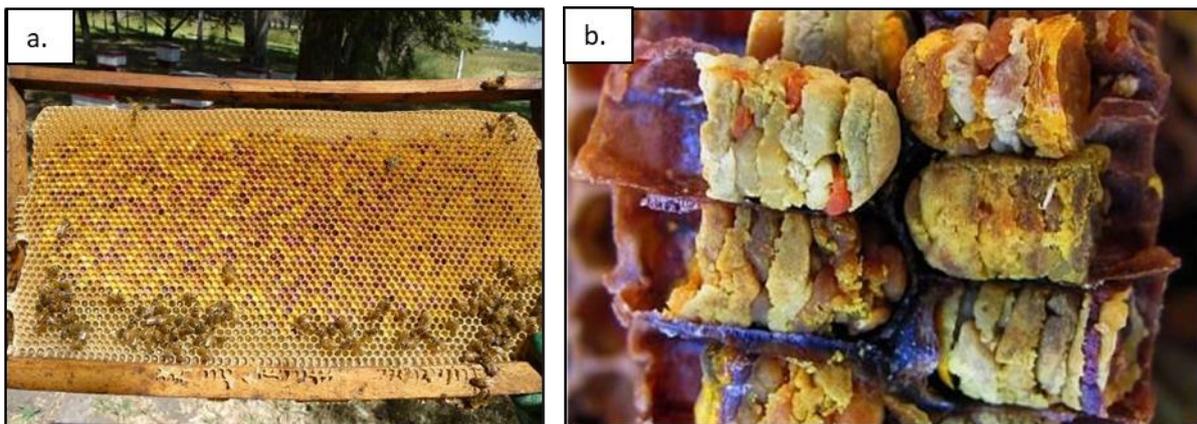
Fuente: a. <http://www.islandcrisis.net/fascinating-health-benefits-of-bee-pollen-revealed>; b. <http://www.feelguide.com/2013/06/19/everything-you-need-to-know-about-bee-pollen-one-of-the-most-powerful-superfoods-on-earth>

En general, las cargas polínicas individuales pertenecen a una misma especie vegetal debido al elevado grado de constancia floral que las abejas poseen (son fieles a una determinada especie de planta en cada viaje recolector). Por esta razón las cargas tienen tamaño, color y formas característicos según el origen botánico lo que facilita su clasificación [6,11,12,17,18,19]. Sin



embargo, puede suceder que existan cargas mixtas, es decir conformadas por polen de diferentes flores [20]. Según Baldi Coronel y col. [16], alrededor de un 0,3% de las corbículas pueden tener esta característica.

Las abejas no consumen el polen corbicular como tal; cuando llegan a la colmena las cargas polínicas son depositadas en las celdas (Figura 1.5.a) y son “empaquetadas” con el agregado de miel, enzimas digestivas y ácidos orgánicos provenientes de las glándulas salivares de las abejas. De esta manera este polen sufre un proceso de fermentación láctica gracias a la presencia de bacterias del tipo *Lactobacillus* y las condiciones de anaerobiosis. Este proceso de “ensilado” dentro del panal transforma el polen corbicular traído del campo en lo que se denomina “pan de polen” (Figura 1.5.b) el cual aumenta su valor nutritivo y la digestibilidad debido a la acción microbiana. Asimismo, la presencia de ácido láctico producto del proceso fermentativo permite su conservación. El pan de polen también se comercializa en algunos países para consumo humano [7,13,14].



**Figura 1.5.a.** Vista de un panal en el que se ha almacenado polen. **b.** Detalle del polen “empaquetado” dentro de las celdillas. Fuente: a. Propia; b. <http://kylevialli.com/bee-bread-the-truth-about-bee-pollen/>

### 1.2.4 Producción de polen apícola

La producción mundial de polen es aproximadamente de 1.500 toneladas por año; siendo el principal productor España, seguido por China, Australia y Argentina [21]. Según datos publicados en el Programa Apícola Nacional para el trienio 2011-2013 de Portugal [22] desde el punto de vista comercial los mayores exportadores mundiales de polen son España, China, Argentina y Hungría; y los principales países importadores de este producto apícola son EEUU,



Reino Unido, Alemania, Francia e Italia. Aunque en los informes de coyuntura del Ministerio de Agroindustria de Argentina no figura que el polen sea un producto de exportación [23].

En Argentina existen zonas de gran tradición polinífera; según Cornejo [19] se puede considerar como excelente una zona que produzca al menos cinco a siete kilos por colmena por año. Las provincias de Tucumán y Santiago del Estero, con grandes extensiones boscosas y un clima que les permite cosechar polen tanto en la primavera como a fines del verano y otoño, son las principales productoras. Le siguen en importancia Santa Fé y Chaco con un rendimiento por colmena por año que oscila entre dos y seis kilos. En Entre Ríos se puede llegar a cosechar entre nueve y diez kilos en las denominadas zonas “eucalipteras”. En zonas de riego de la provincia de Mendoza en un año se puede obtener entre cuatro y cinco kilos por colmena según el manejo y las posibilidades climáticas. Cierta región de San Juan produce entre cuatro y siete kilos por colmena en una temporada. Algunos de estos datos pertenecen a apiarios en producción del tipo fijista, otros deben trasladar las colmenas siguiendo determinadas floraciones [15,18,23]. Por otra parte, en base a una revisión bibliográfica que incluye trabajos de más de veinte países, Thakur y Nanda [18] publicaron que una colmena podría recolectar entre 15 y 40 kg por año.

Se podría considerar que la obtención de polen apícola se da en dos etapas: una producción a campo relacionada con el manejo de las colmenas en la que se llega a la “cosecha” a través de la colocación de trampas cazapolen y una etapa de procesamiento poscosecha para poder comercializarlo.

El apicultor que opta por producir polen debe realizar un particular manejo de sus colmenas que no se diferencia demasiado del necesario para la obtención de miel. Se debe considerar que la ubicación del apiario en producción sea cercana a fuentes florales polínicas (productoras de polen); igualmente es relevante el mantenimiento del estado sanitario y nutricional de las colmenas como también la calidad y condición de las reinas (jóvenes, sanas, vigorosas y prolíficas) [19]. Asimismo, es recomendable evitar las cercanías a carreteras de alto tránsito vehicular, zonas industriales o de cultivos intensivos [24,25].

El tratamiento poscosecha comienza con un pronto traslado del producto obtenido en el campo a un lugar de procesamiento. El transporte debe ser en contenedores adecuados que lo protejan tanto de contaminaciones ambientales como de la luz solar directa. Luego se lo debe colocar en freezers durante dos días para inactivar huevos y larvas de insectos (mayormente lepidópteros,



ácaros y/o gorgojos) que generalmente se encuentran entre las cargas corbiculares. Una vez descongelado se realizan los procesos de secado, limpieza y acondicionamiento para su almacenaje [8].

La finalidad del proceso de secado es disminuir el porcentaje de humedad que contiene el polen cosechado en el campo (alrededor de 20 a 30 g de agua por 100 g de polen) en el menor tiempo posible para evitar la pérdida de los compuestos volátiles [8,15,24,25]. El manejo de la temperatura y del tiempo de secado es crucial para mantener las propiedades biológicas y nutricionales del polen apícola. No existe una convención internacional sobre los valores de estos parámetros y todavía se está trabajando mucho sobre este tema; por ejemplo Campos y col. [26] sugieren que la temperatura de secado no debe sobrepasar los  $42 \pm 1$  °C mientras que Bogdanov [8] sugiere una temperatura de  $30 \pm 1$  °C en un corto plazo para prevenir la pérdida de las vitaminas. En el caso particular de Argentina, la normativa indica que el proceso de secado debe ser artificial y que la temperatura de la corriente de aire utilizada en el proceso debe ser menor a los  $55 \pm 1$  °C (muy por encima de las recomendaciones de varios autores de trabajos sobre esta temática); incluso desalienta el secado mediante la exposición solar directa [27].

Por otra parte, un excesivo proceso de secado (menor al 3%) también es indeseable porque puede generar decoloración y desarrollo de reacciones químicas (por ejemplo, la caramelización de la fructosa – reacciones de Maillard – y peroxidación de lípidos) lo que resulta en la aparición de olores desagradables y rancidez afectando las propiedades organolépticas [27,28].

El proceso de secado es crítico para la conservación del producto en el tiempo; se trata de eliminar el exceso de humedad evitando el desarrollo de hongos y bacterias. Para ello se utilizan diferentes modelos de estufas eléctricas o a gas generalmente con circulación interna de aire. En la figura 1.6.a se muestra uno de los modelos más comúnmente utilizado [15,24,25].

Por otra parte, el polen corbicular cosechado de las colmenas contiene impurezas (restos de abejas o plantas, cera, otros insectos pequeños, etc.) que deben ser eliminadas. El método más eficiente para remover estas partículas es a través de flujos de aire que atraviesan finas capas de polen. Existen máquinas de diferentes diseños construidas para tal fin (Figura 1.6.b). Finalmente, el polen limpio y seco puede envasarse con diferentes presentaciones como por ejemplo en bolsas de polietileno que se introducen posteriormente en bidones o cajas de cartón



de 150 o 50 kg como así también en fracciones de menor peso en diferentes envases rígidos [16] según se comercialice al por mayor o en el mercado minorista. Una vez finalizadas las etapas de secado y limpieza el polen debe almacenarse en recipientes plásticos o de vidrio en un lugar fresco y seco. Es importante que el envase elegido posea un buen cierre pudiendo utilizarse tapas a rosca o cerrado al vacío en el caso de utilización de bolsas plásticas (Figura 1.6.c) [8].



**Figura 1.6.** Procesamiento poscosecha de polen. **a.** Secado: modelo de una secadora de polen. **b.** Limpieza: máquina limpiadora de polen (diseño de un productor de polen de Jacinto Arauz). **c.** y **d.** Envasado: diferentes presentaciones comerciales. Fuente: a. <http://edmundofgabus.blogspot.com.ar>; b. y c. propia; d. Angel Dovicó (Cooperativa Amuyén).

En lo que respecta al comercio minorista, dentro del territorio argentino existe una normativa que especifica que el polen se envasará en recipientes bromatológicamente aptos de hasta 250 g de vidrio o plástico rígido transparente (para poder observar bien el contenido) y con buen cierre para evitar que el producto absorba humedad. También define el rotulado del producto como “POLEN” con descripción del peso neto y fecha de envasado en un lugar bien visible en



la etiqueta. Asimismo, deben constar las siguientes leyendas: “Personas alérgicas no consumir”, “Conservar en lugar fresco y seco” y “Consumir preferentemente dentro de los 180 días de la fecha de elaboración” [27].

### 1.2.5 Composición química

El polen es el producto de la colmena que muestra la mayor variabilidad composicional. Su composición varía principalmente según el origen botánico, aunque dentro de una misma especie pueden encontrarse pequeñas diferencias atribuidas a la ubicación geográfica, a la estacionalidad y a los factores climáticos [6,20].

Por otra parte, las prácticas utilizadas para la recolección (cosecha), los tratamientos poscosecha necesarios para su comercialización (limpieza, secado y fraccionado) y el método utilizado para su conservación pueden alterar la composición del polen corbicular [8,25].

Los principales componentes del polen son hidratos de carbono, sustancias nitrogenadas (aminoácidos libres y proteínas) y lípidos. Entre los constituyentes minoritarios se encuentra el contenido de vitaminas, pigmentos (básicamente flavonoides y carotenoides), enzimas (provenientes principalmente de las glándulas salivales de la abeja) y minerales [13,18,25].

Los **carbohidratos** son los componentes mayoritarios y éstos, a su vez, están mayormente representados por almidón y material de la pared celular. El contenido total varía entre 13 y 55 g/100 g de materia seca (valor obtenido por cálculo relacionando los contenidos de agua, proteínas y lípidos). Es importante considerar que el polen apícola contiene mayor cantidad de hidratos de carbono respecto del polen obtenido de las plantas debido al agregado de néctar por parte de la abeja pecoreadora para poder compactar la carga corbicular [6,13,29]. Si bien dentro de los carbohidratos los azúcares se encuentran en una proporción pequeña, el 90% de estas moléculas de bajo peso molecular están representados principalmente por glucosa, fructosa y sacarosa [26].

En cuanto a los **compuestos nitrogenados** generalmente se evalúan proteínas totales a través del método de Kjeldahl que determina el contenido de nitrógeno. El contenido proteico varía entre 10 y 40 g/100 g de materia seca. La décima parte de la fracción proteica está conformada por aminoácidos libres, dentro de los cuales se han hallado aminoácidos esenciales. Los



predominantes son prolina (suele hallarse en cantidades que superan ampliamente la mitad del total de aminoácidos), ácido glutámico y aspártico, lisina y leucina. En este aspecto, la importancia por conocer el perfil aminoacídico del polen apícola va más allá del punto de vista nutricional ya que es utilizado para realizar controles de calidad de este producto [25,29]. Se propuso a la variación de la relación prolina/ácido glutámico como un indicador de la manipulación y estado de conservación del polen. Respecto al tiempo de conservación el contenido de prolina tiende a aumentar y el de ácido glutámico a disminuir por lo que la relación entre ambos tiende a aumentar cuando los períodos de conservación son largos [16].

En relación al **contenido lipídico** se puede encontrar variaciones desde 1 hasta 13 g/100 g de materia seca según el origen botánico y el método empleado (desde extracciones Soxhlet con diferentes solventes hasta cromatografía gaseosa). El 3% de la fracción lipídica corresponde a ácidos grasos libres y alrededor de la mitad de ellos son los ácidos grasos insaturados oleico, linoleico (omega-6) y linolénico (omega-3). Muchos pólenes contienen lecitina y esteroides (fitoesteroides) aunque en menor cantidad [25,29,30].

Dentro de los componentes minoritarios se encuentran los **minerales** cuya presencia varía principalmente según el origen botánico, aunque también la cantidad composicional está influenciada por el contenido de aminoácidos, fosfolípidos y enzimas. Las determinaciones generalmente se realizan sobre la matriz carbonizada y mayormente con métodos analíticos basados en espectroscopía de absorción atómica [25,29,31].

Otro componente minoritario, aunque relevante debido a que le confieren parte de la actividad biológica, son las **vitaminas**. La mayoría de ellas están representadas por las pertenecientes al grupo del complejo B (B1: Tiamina, B2: Riboflavina, B3: Niacina, B5: Ácido pantoténico y B6: Piridoxina) pero según la especie floral visitada por la abeja pecoreadora se encuentran pólenes que también pueden contener pro-vitamina A ( $\beta$ -caroteno), vitamina E (Tocoferol), vitamina C (Ácido ascórbico), Ácido fólico y/o Biotina [25,29,30,32].

Otras sustancias que se encuentran en pequeñas cantidades dentro de los componentes del polen apícola y que también son responsables de la actividad biológica son ciertos pigmentos entre los que se encuentran principalmente algunos flavonoides (polifenoles) y carotenoides. Las sustancias polifenólicas constituyen uno de los principales grupos metabólicos de las plantas y son esenciales en la fisiología vegetal contribuyendo básicamente a la morfología (forma y estructura) de las mismas, aunque el interés en estos compuestos ha aumentado debido a su



capacidad antioxidante. Entre ellos los flavonoides y los ácidos fenólicos son los principales responsables de la actividad biológica del polen. Los flavonoides además son los responsables del sabor amargo y de la coloración de los granos de polen vegetal (variaciones desde el incoloro hasta rosa, púrpura y azul). Por otra parte, los **carotenoides** comprenden una amplia familia de aproximadamente 600 compuestos de naturaleza lipídica derivados de los isoprenoides (terpenos) y determinan colores que van desde los amarillos hasta los rojos [8,29].

Argentina es uno de los pocos países que ha establecido parámetros oficiales de calidad para la comercialización del polen apícola destinado al consumo humano. En el año 1990 (Resolución 1550, 12.12.90) fue incorporado en el Capítulo X del Código Alimentario Argentino (CAA) correspondiente a los “Alimentos azucarados”. En el artículo 785 se define el producto y se detalla las características analíticas de su composición, básicamente en relación a proteínas e hidratos de carbono; aunque también especifica un rango de pH permitido como también los valores máximos para la determinación de la humedad y las cenizas. Asimismo, se define las características microbiológicas y se menciona conceptos relacionados al procesamiento (limpieza y envasado) y al rotulado del producto final destinado a la comercialización [27].

Actualmente no existe un consenso internacional para definir los parámetros analíticos que definan la calidad del polen apícola para consumo humano, pero Campos y col. [26] han hecho una propuesta muy interesante desde lo analítico y metodológico. En la tabla 1.1 se muestra en forma resumida los valores composicionales relevados por estos autores de una variada bibliografía internacional en comparación con lo exigido por el CAA para el polen apícola producido en nuestro país.



**Tabla 1.1** Valores comparativos de los componentes del polen apícola en base seca relevado por Campos *et. al.* (2008) y CAA. \* No declara.

Componentes	Campos <i>et. al.</i> (2008)	CAA
<i>Proteínas</i>	10 - 40 g / 100 g	15 - 28 %
<i>Lípidos</i>	1 - 13 g / 100 g	*
<i>Carbohidratos totales</i>	13 - 55 g / 100 g	45 - 55 %
<i>Cenizas</i>	2 - 6 g / 100 g	máximo 4 %
<i>Minerales:</i>		
Potasio	4.000 - 20.000 mg/kg	*
Magnesio	200 - 3.000 mg/kg	*
Calcio	200 - 3.000 mg/kg	*
Fósforo	800 - 6.000 mg/kg	*
Hierro	11 - 170 mg/kg	*
Zinc	30 - 250 mg/kg	*
Cobre	2 - 16 mg/kg	*
Manganeso	20 - 110 mg/kg	*
<i>Vitaminas:</i>		
Pro- vit. A ( $\beta$ -caroteno)	10 - 200 mg/kg	*
B1 (Tiamina)	6 - 13 mg/kg	*
B2 (Rivoflavina)	6 - 20 mg/kg	*
B3 (Niacina)	40 - 110 mg/kg	*
B5 (Ac. Pantoténico)	5 - 20 mg/kg	*
B6 (Piridoxina)	2 - 7 mg/kg	*
C (Ac. Ascórbico)	70 - 560 mg/kg	*
Biotina	0,5 - 0,7 mg/kg	*
Ac. Fólico	3 - 10 mg/kg	*
E (Tocoferol)	40 - 320 mg/kg	*

Fuente: elaboración propia en base a la cita bibliográfica mencionada en el texto.

### 1.2.6 Importancia del polen apícola para el hombre

En base a la composición química descrita anteriormente, el polen corbicular puede considerarse como fuente de alimento no solo para los insectos polinizadores sino también para



el hombre [6,25,33]. En los últimos años el consumo de polen recolectado por las abejas como parte de la dieta humana ha cobrado un interés creciente.

Si bien en el hemisferio occidental este producto de la colmena es usado mayormente como suplemento nutricional, en Europa y Asia se promociona ampliamente entre la población añosa como un tónico para mejorar los efectos del envejecimiento (en concordancia a la creencia en la antigua Grecia). En este sentido la demanda del polen apícola está aumentando y consecuentemente muchas compañías farmacéuticas y de alimentos lo incluyen en una gran variedad de productos que fabrican. Por otro lado, en el Este europeo y en el continente asiático, el polen corbicular de diferentes orígenes florales ha sido utilizado en la medicina tradicional por siglos aliviando o curando estados gripales, úlceras, anemias, colitis, reacciones alérgicas, prostatitis y enteritis. También se le atribuye efectos benéficos en el tratamiento para la depresión, propiedades ansiolíticas, mejoramiento de la memoria y efectos antiepilépticos entre otros [29,33,34].

En los últimos años y en base a los estudios científicos recientemente publicados, el polen apícola es considerado un alimento funcional debido a un aumento en la variedad de efectos en la salud humana relacionado a sus propiedades nutricionales. Concretamente en el año 2006 la Unión Europea lo incluyó en el “Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo” en la sección de “Health Claims” relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos [8,34–36].

Los principales componentes con función biológica son los flavonoides que cumplen con importantes actividades fisiológicas y farmacológicas. Poseen diferentes propiedades como cardioprotectores, antioxidantes, antienvjecimiento, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, antiateroscleróticos y mejoradores de la función endotelial; la mayoría de estas acciones atribuidas a su capacidad reductora intrínseca, aunque también ofrecen protección en forma indirecta activando sistemas de defensa endógenos y modulando diferentes procesos fisiológicos. La acción terapéutica de valor clínico más destacada es su efecto profiláctico y curativo en desórdenes prostáticos que, si bien fue comprobado más efectivamente en preparaciones comerciales de pólenes vegetales, también se encontraron resultados positivos con polen de abejas [8,30,37].

Otro importante grupo de compuestos con propiedades funcionales son los fitoesteroles. La actividad biológica más destacada es la disminución del colesterol en sangre debido a la



inhibición parcial de la absorción intestinal; aunque se cree que también poseen acción antiaterogénica, antiinflamatoria e inmunoestimulante principalmente a través del  $\beta$ -sitosterol. Además, está surgiendo evidencia que los esteroides vegetales actuarían contra el desarrollo de diferentes tipos de cánceres como el colorectal, el de mama y el de próstata. Otros estudios mencionan efectos anti-anemia, anti-osteoporosis y anti-alérgicos (principalmente para el tratamiento de la fiebre del heno) aunque mayormente probados en animales [8,30].

Por otra parte, existen varios trabajos en los que se demuestra actividad antibacteriana (frente a diferentes especies bacterianas según el origen botánico del polen apícola) y antifúngica. Asimismo, como consecuencia de su capacidad antioxidante (como captador de radicales libres) podría prevenir daños producidos por diferentes radiaciones. Estos resultados proceden de trabajos con animales expuestos a distintas dosis de rayos-x, donde se observaron diferencias significativas entre el grupo suplementado con polen en su dieta contra el grupo control. Es importante resaltar también la capacidad hepatoprotectora del polen apícola contra el potencial efecto de diferentes sustancias tóxicas evaluadas en varios ensayos con animales [8].

En general los productos de la colmena poseen relativamente pocos efectos colaterales siendo aptos para ser utilizados en diferentes aplicaciones en clínica. La mayoría de estos efectos secundarios están vinculados con las alergias que pueden generar en los organismos susceptibles que los consumen. Si bien se han publicado casos de alergias debido al consumo de miel, jalea real y polen; en el caso de este último (e igualmente del propóleo) los estudios reportados no superan a los casos de alergias surgidos por otros alimentos o medicinas naturales [9]. Es por esta situación que en la mayoría de los países en los que existe alguna reglamentación para la producción y comercialización de polen de abeja (entre los que se encuentra Argentina) se menciona que debe existir una leyenda en la etiqueta del producto comercial que alerte a las personas alérgicas sobre su consumo [27].

Como consecuencia de la creciente demanda del polen apícola en el mundo muchos apicultores se dedican a su recolección, procesamiento y comercialización. En este contexto se hace imprescindible conocer la calidad del mismo (al igual que el resto de los productos apícolas) para garantizar su inocuidad y mantener la imagen de alimento saludable, limpio y natural [26]. El desarrollo de este trabajo de tesis pretende aportar al conocimiento de la calidad de polen obtenido en la zona centro de Argentina pensando en su comercialización para consumo humano.



## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo de tesis es caracterizar el polen apícola producido en la región central de la República Argentina con el fin de utilizarlo para consumo humano. La determinación de su origen botánico como así también la de sus propiedades nutricionales y/o bioactivas permitirán establecer su calidad para una futura estrategia de producción y comercialización, incluyendo la posibilidad de gestionar algún sello de calidad o de identidad geográfica. Asimismo, se buscará implementar nuevas metodologías analíticas que reduzcan los tiempos de procesamiento y la generación de residuos.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Adquirir las muestras de polen de apiarios ubicados en la región.
- Determinar el origen botánico del polen recolectado en la zona centro de la República Argentina.
- Encontrar la relación entre los taxones identificados en las cargas corbiculares y la ecorregión donde fueron recolectados estableciendo el primer paso para una denominación de origen.
- Clasificar las muestras en base a los resultados obtenidos del análisis entomopalinológico.
- Determinar las características físico-químicas del polen para establecer una correlación con el origen botánico.
- Implementar y validar una metodología analítica para la determinación de los parámetros físico-químicos que sea rápida y amigable con el ambiente en relación a los métodos de referencia.
- Evaluar la implementación de una metodología analítica rápida y amigable con el ambiente que permita reducir los costos y los tiempos de análisis como así también los residuos químicos generados en los métodos convencionales.
- Estudiar una metodología de preservación del polen apícola “fresco” (sin el proceso de secado) considerando el potencial deterioro debido a la carga microbiológica propia.



## 1.4 Bibliografía

- [1] “FAOSTAT”. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. [Consultado: 05-jul-2020].
- [2] R. Cardín, “Informes de cadenas de valor apícola. Ministerio de Hacienda. Secretaría de Política Económica. Subsecretaría de Programación Microeconómica.”, Buenos Aires, 2018.
- [3] “Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Análisis tecnológicos y prospectivos sectoriales. Complejo productivo apícola.”, 2016.
- [4] T. Bragulat, E. Angón, A. García, A. Giorgis, C. Barba, y J. Perea, “Influencia de la capacidad gerencial del apicultor en la viabilidad de unidades de producción apícola en la Pampa Argentina”, *Rev. Mex. Ciencias Pec.*, vol. 9, núm. 1, pp. 32–47, 2018.
- [5] C. Sanchez, H. Castignani, y M. Rabaglio, “El Mercado Apícola Internacional”, 2018.
- [6] E. Crane, *Bees and beekeeping. Science, practice and world resources*. Oxford: Heinemann Newnes, 1990.
- [7] M. Kieliszek, K. Piwowarek, A. M. Kot, S. Blazejak, y A. Chlebowska-Śmigiel, “Pollen and bee bread as new health-oriented products : A review”, *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 71, pp. 170–180, 2018.
- [8] S. Bogdanov, “Pollen : Production , Nutrition and Health : A Review”, *Bee Product Science*, 2014. [En línea]. Disponible en: [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net).
- [9] K. Münstedt y S. Bogdanov, “Bee products and their potential use in modern medicine”, *J. ApiProduct ApiMedical Sci.*, vol. 1, núm. 3, pp. 57–63, 2009.
- [10] Ż. Bargańska y J. Namieśnik, “Pesticide Analysis of Bee and Bee Product Samples”, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 40, núm. 3, pp. 159–171, 2010.
- [11] A. Forcone y A. C. Andrada, *Flora melífera de las regiones Pampeana Austral y Patagonia Extra-Andina*, Editorial. Bahía Blanca, 2007.
- [12] R. A. Morse y T. Hooper, *Enciclopedia ilustrada de apicultura*, El Ateneo. Buenos Aires, 1992.
- [13] S. Bogdanov, “Pollen : Nutrition , Functional Properties , Health”, *Bee Prod. Sci.*, núm. August, pp. 1–31, 2016.
- [14] H. Human y S. W. Nicolson, “Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae)”, *Phytochemistry*, vol. 67, pp. 1486–1492, 2006.
- [15] “En vivo | Facebook”, *Campo y Abejas. Encuentros entre mate y miel. Conversando junto a Ángel Dovico sobre cosecha, procesado y comercialización de polen.*, 2020. [En línea]. Disponible en: [https://www.facebook.com/watch/live/?v=727966988016917&ref=watch\\_permalink](https://www.facebook.com/watch/live/?v=727966988016917&ref=watch_permalink). [Consultado: 09-jul-2020].
- [16] B. Baldi Coronel, D. Grasso, S. Chaves Pereira, y G. Fernández, “Caracterización bromatológica del polen apícola argentino”, *Ciencia, Docencia y Tecnol.*, vol. 15, núm.



- 29, pp. 145–181, 2004.
- [17] G. D. Jones y S. D. Jones, “The Uses of Pollen and its Implication for Entomology”, *Neotrop. Entomol.*, vol. 30, núm. 3, pp. 341–350, 2001.
- [18] M. Thakur y V. Nanda, “Composition and functionality of bee pollen: A review”, *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 98, pp. 82–106, 2020.
- [19] Cornejo Luis G., *Polen. Tecnología de su producción, procesado y comercialización*, Editorial. La Plata, 1994.
- [20] K. Komosinska-Vassev, P. Olczyk, J. Kafmierczak, L. Mencner, y K. Olczyk, “Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application”, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, p. 6, 2015.
- [21] L. M. Estevinho, S. Rodrigues, A. P. Pereira, y X. Feás, “Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation”, *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 47, núm. 2, pp. 429–435, 2012.
- [22] “Ministerio de Agricultura, de Desenvolvimento Rural e das Pescas. Programa Apícola Nacional Triénio de 2011-2013.”, Portugal, 2010.
- [23] “Ministerio de Producción y Trabajo. Secretaría de Agroindustria. Cadena Apícola. Informe de coyuntura mensual.”, Buenos Aires, 2019.
- [24] J. M. y colaboradores Folgar Bessone, “Campo y abejas. Edición especial Polen.”, Folgar Bessone J. M., Buenos Aires, p. 88, 2007.
- [25] S. Bogdanov, “Quality and Standards of Pollen and Beeswax”, *Apiacta*, vol. 38, pp. 334–341, 2004.
- [26] M. G. R. Campos *et al.*, “Pollen composition and standardisation of analytical methods .”, *J. Apic. Res.*, vol. 47, núm. 2, pp. 156–163, 2008.
- [27] “Ministerio de Salud. ANMAT. Código Alimentario Argentino.” [En línea]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>. [Consultado: 05-jul-2020].
- [28] F. Serdá, “Estudio de la calidad nutricional del polen recolectado por *Apis mellifera* (la abeja domestica) en un colmenar en el Bajo Delta Bonaerense.”, CAECE, 2008.
- [29] C. Nogueira, A. Iglesias, X. Feás, y L. M. Estevinho, “Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins : A Comprehensive Approach”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, núm. 9, pp. 11173–11187, 2012.
- [30] R. Mărgăoan, L. A. Mărghitas, D. Dezmirean, C. M. Mihai, y O. Bobis, “Bee Collected Pollen – General Aspects and Chemical Composition”, *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Anim. Sci. Biotechnol.*, vol. 67, núm. 1–2, pp. 254–259, 2010.
- [31] M. G. R. Campos, C. Frigerio, J. Lopes, y S. Bogdanov, “What is the future of Bee-Pollen?”, *J. ApiProduct ApiMedical Sci.*, vol. 2, núm. 4, pp. 131–144, 2010.
- [32] G. Formicki, A. Greń, R. Stawarz, B. Zyśk, y A. Gał, “Metal Content in Honey , Propolis , Wax , and Bee Pollen and Implications for Metal Pollution Monitoring”, *Pol. J. Environ. Stud.*, vol. 22, núm. 1, pp. 99–106, 2013.
- [33] B. Rodrigues de S. *et al.*, “Physicochemical parameters and content of B-complex



- vitamins: an exploratory study of bee pollen from southern Brazilian states.”, *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 45, núm. 3, pp. 232–242, 2018.
- [34] J. S. Araújo, E. D. Chambó, M. A. P. de C. Costa, S. M. P. C. da Silva, C. A. L. de Carvalho, y L. M. Estevinho, “Chemical composition and biological activities of mono- and heterofloral bee pollen of different geographical origins”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, núm. 5, p. 15, 2017.
- [35] A. Rzepecka-Stojko *et al.*, “Polyphenols from Bee Pollen: Structure, absorption, metabolism and biological activity”, *Molecules*, vol. 20, pp. 21732–21749, 2015.
- [36] K. Fatrcová-Šramková, J. Nôžková, M. Kačániová, M. Máriássyová, K. Rovná, y M. Stričík, “Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen”, *J. Environ. Sci. Heal. Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, vol. 48, núm. 2, pp. 133–138, 2013.
- [37] Comisión Europea, “Reglamento (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo del 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos”, 2006.
- [38] M. Antonelli, D. Donelli, y F. Firenzuoli, “Therapeutic efficacy of orally administered pollen for nonallergic diseases: An umbrella review”, *Phyther. Res.*, vol. 33, núm. 11, pp. 2938–2947, 2019.

## Capítulo 2



Muestras: origen y obtención



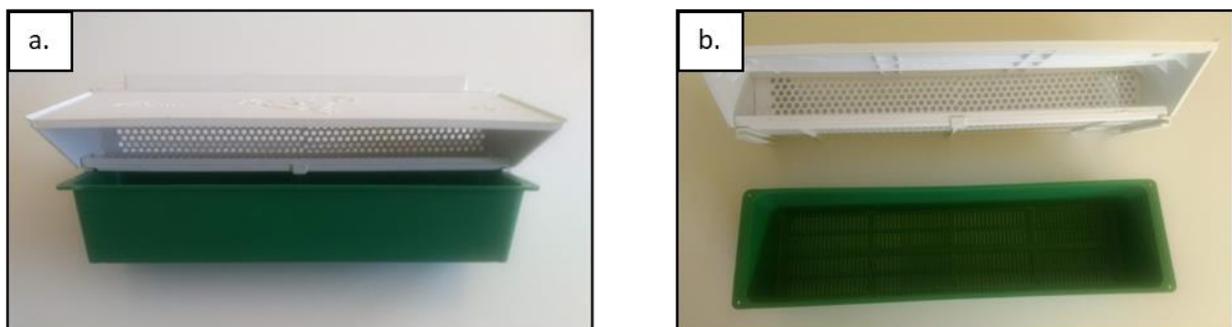
## 2.1 Objetivo

El objetivo de este capítulo fue realizar una descripción de la región a la que pertenecen los diferentes sitios de muestreo, así como también la metodología de la obtención de las muestras de polen apícola.

## 2.2 Obtención de polen apícola

Para obtener polen de una colmena se debe colocar trampas cazapolen de las que existen diferentes modelos. En Argentina se usan mayormente trampas externas del tipo intermedias [1]. En general las trampas obligan a las abejas que traen el polen del campo a pasar a través de una especie de rejilla con orificios (aproximadamente 4,5 mm de diámetro) que permite el paso ajustado de la pecoreadora haciendo que se desprenda la carga corbicular que traen en sus patas traseras las cuales van acumulándose en un recipiente contenedor en la parte inferior y que finalmente es “cosechado” por el apicultor [2,3] (Figura 2.1).

La eficiencia de estas trampas se mide como el porcentaje de polen retenido en las mismas y nunca llega al 100% [4]; de esta manera no se restringe totalmente el ingreso de este importante nutriente a la colonia. La cantidad del polen recolectado es muy variable dentro de las colmenas de un apiario como también lo es entre diferentes apiarios en producción (en este último caso debido a variaciones de la oferta floral y del clima). El polen recién colectado es denominado polen “fresco” y debe ser procesado lo más rápido posible para mantener su composición original [4–6].



**Figura 2.1.** Detalle de trampa de polen (uso externo y tipo intermedia) comercial: **a.** vista de frente con colector montado. **b.** Trampa desmontada en la que se puede observar las ranuras presentes en la parte inferior del recipiente recolector. Fuente: propia.

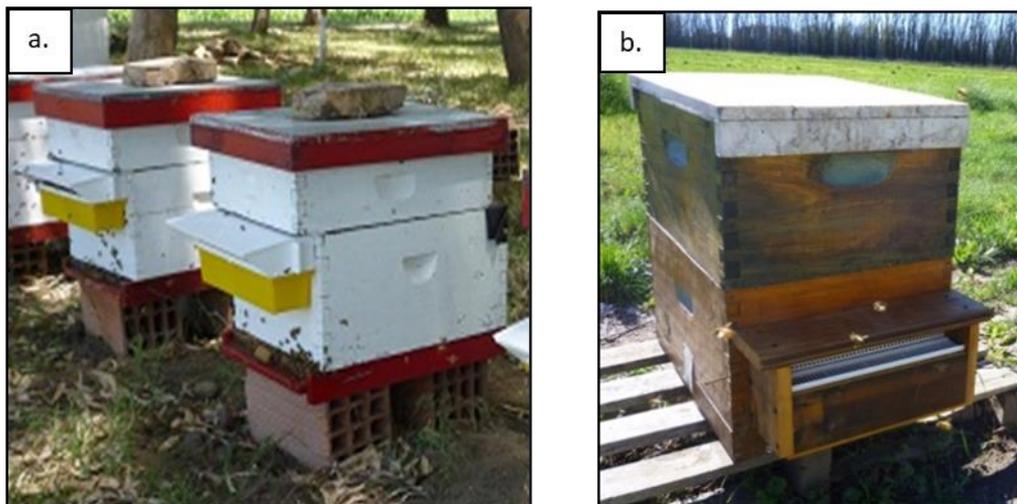


## 2.3 Origen de las muestras

### 2.3.1 Sitios de muestreo

Las muestras utilizadas para el trabajo de tesis se obtuvieron principalmente del apiario de la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Hilario Ascasubi (EEA INTA H. Ascasubi) y de apiarios particulares de apicultores de la región. De esta manera se adquirieron 50 muestras de cinco sitios de muestreo pertenecientes a la zona centro de Argentina.

Las muestras se recolectaron a partir de la colocación de trampas de polen externas de tipo intermedia mayormente comerciales, excepto en uno de los sitios en el que se utilizó trampas de elaboración “casera” (realizadas por el propio apicultor con madera de monte) (Figura 2.2.a y b).



**Figura 2.2.** Fotografías de los dos modelos de trampas de polen utilizadas para la obtención de muestras: **a.** modelo plástico comercial, **b.** modelo de fabricación casera.

Fuente: propia (colmenas en ensayo de producción de polen en la EEA INTA H. Ascasubi y en Viedma).

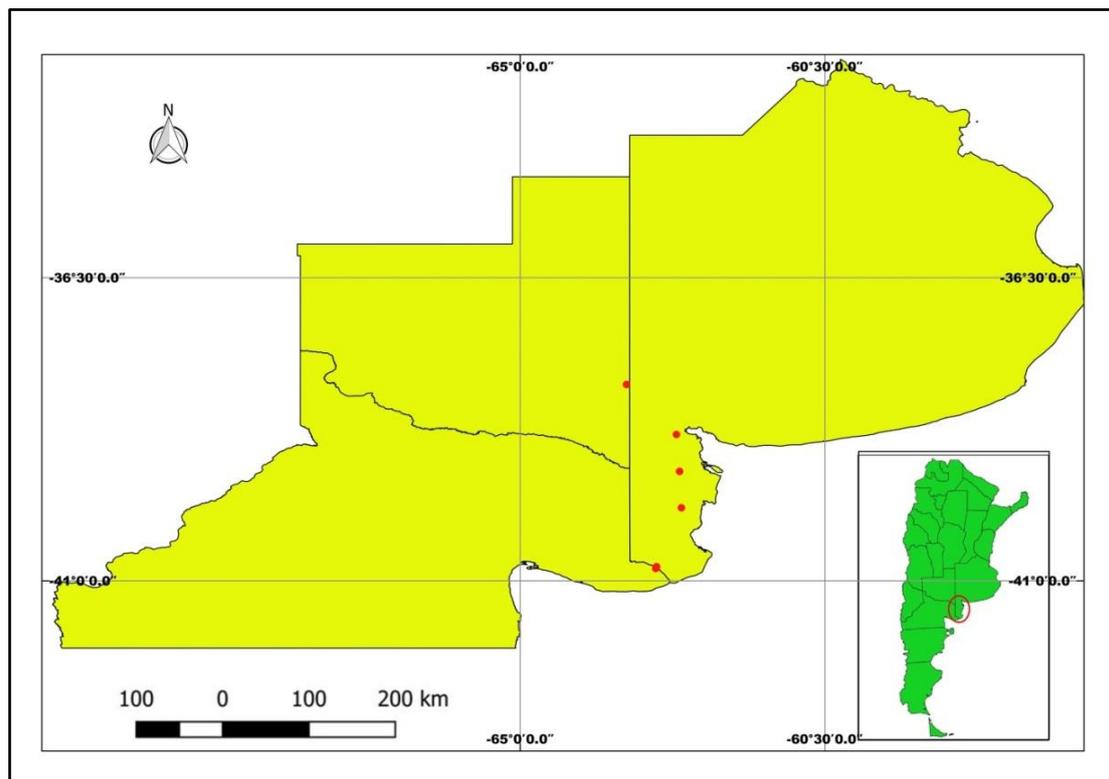
En general las fechas de cosecha fueron variables, aunque todas están comprendidas en el transcurso de dos temporadas apícolas de los años 2013-2014 y 2014-2015. La distribución de los apiarios y la correspondiente cantidad de muestras obtenida en cada localidad se detalla en la tabla 2.1. La ubicación geográfica se puede apreciar en la figura 2.3.



**Tabla 2.1.** Distribución geográfica de los apiarios de los que se obtuvieron las muestras.

Provincia	Localidad	Apiario	Cantidad de muestras
<i>Buenos Aires</i>	Hilario Ascasubi	A1	23
		A2	1
	Médanos	M	13
	Villalonga	VI	1
<i>La Pampa</i>	Jacinto Arauz	JA	2
<i>Rio Negro</i>	Viedma	Vd1	6
		Vd2	2
		Vd3	2

Fuente: elaboración propia.



**Figura 2.3.** Mapa con la ubicación geográfica de los apiarios donde fueron cosechadas las muestras. Fuente: Laboratorio de Teledetección y SIG (EEA INTA H. Ascasubi).

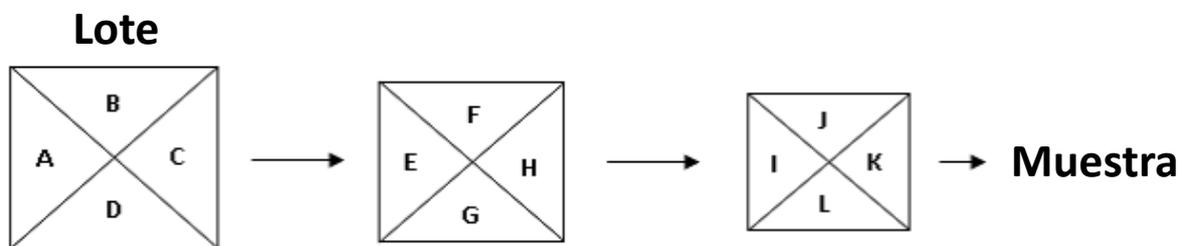


### 2.3.2 Conformación, acondicionamiento y conservación de muestras

Cada lote de muestras (pool de cargas de polen) proviene de un conjunto de colmenas ubicado en alguno de los sitios de muestreo en una fecha determinada. En general se utilizaron entre 10 y 30 colmenas según el apiario considerado; excepto los casos particulares de los “apiarios” A2 y VI cuyos lotes se conformaron con solo dos colmenas.

Una parte de los mencionados lotes se conservaron en fresco y se trasladaron en una conservadora refrigerada y con premura hasta el laboratorio donde se realizó una limpieza manual retirando toda partícula extraña (restos de insectos o de vegetales, cera, etc.). Este grupo de muestras presentó valores de humedad entre 5,8 y 27,2% (Anexo I) y se hará referencia a él como “Grupo A”. Por otra parte, algunos lotes fueron sometidos a un proceso de secado en estufa por 24 horas a una temperatura de  $37 \pm 1$  °C alcanzando valores de humedad entre 2,2 y 4,1%. A este conjunto de muestras se lo denominó “Grupo B”.

Para asegurar la representatividad de las respectivas muestras de laboratorio se procedió a un proceso de cuarteo. El mismo consistió en acomodar cada lote en una pila uniforme sobre una superficie limpia y seca, cuyo espesor fue el mismo en todos los cuarteos que se realizaron. Luego se dividió en 4 partes (A, B, C, D) aproximadamente iguales (Figura 2.4). Una vez realizado se rechazaron los cuartos B y D (opuestos) recolectándose los cuartos A y C que se mezclaron para el segundo cuarteo, en el cual se operó de manera análoga. A continuación, se descartó F y G, apartando y volviendo a mezclar E y H. En el tercer cuarteo, análogo a los anteriores, se rechazaron los cuartos J y L reservando los cuartos I y K, los cuales se mezclaron obteniendo un total de aproximadamente 50 g de muestra de polen.



**Figura 2.4.** Diagrama del proceso de cuarteo al que fueron sometidas las muestras.  
Fuente: elaboración propia.



Las muestras obtenidas del proceso de cuarteo fueron colocadas en recipientes de vidrio o polietileno con tapa a rosca debidamente identificados. Finalmente se conservaron en freezer a  $-15 \pm 1$  °C hasta la realización de las diferentes determinaciones. En todas las situaciones en que se realizaron traslados de muestras frescas el mismo se realizó refrigerado.

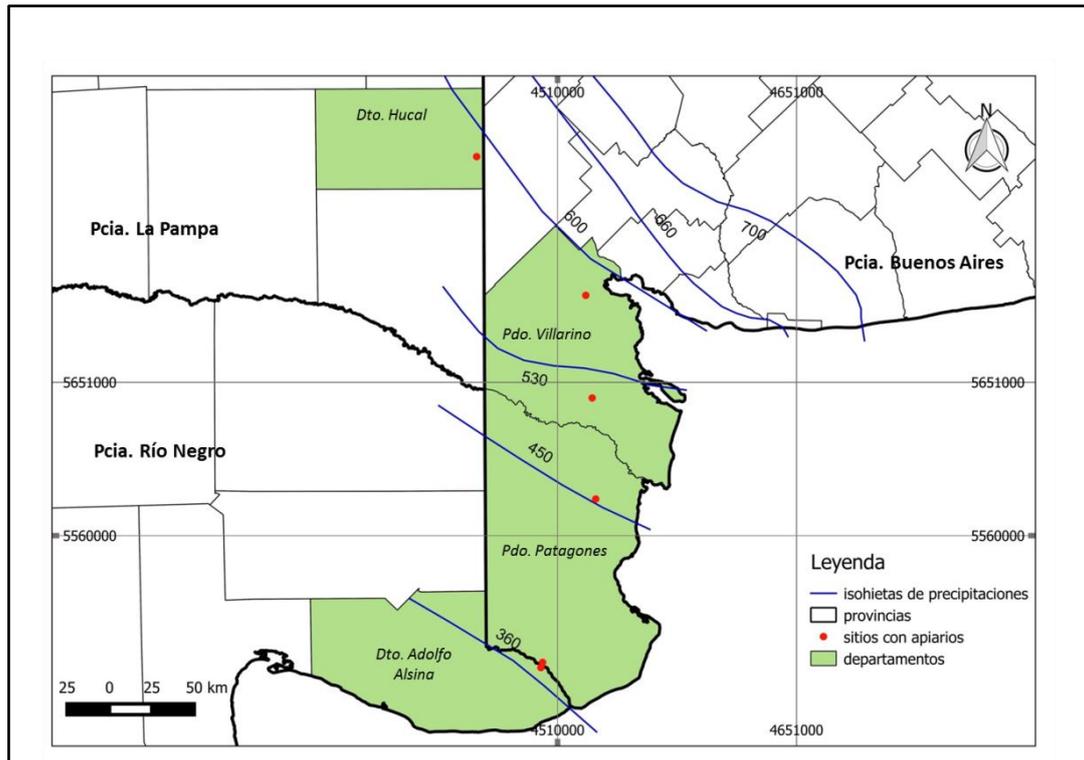
La cantidad de muestras utilizadas para cada determinación varió según el objetivo de trabajo y la metodología utilizada razón por la cual se describirá el caso particular de selección de “muestras” y uso en cada uno de los correspondientes capítulos.

### **2.3.3 Caracterización geográfica de la zona de muestreo**

Los siete apiarios de los que se obtuvieron las muestras se distribuyen en tres provincias de la zona centro de la República Argentina. Tres de ellos se ubican al sur de la provincia de Buenos Aires (dos en el Partido de Villarino y uno en el Partido de Patagones), otro en el sudeste de la provincia de La Pampa, cerca del meridiano V (Departamento Hucal) y los tres restantes en la zona de chacras de la ciudad de Viedma, perteneciente a la provincia de Río Negro (Departamento de Adolfo Alsina).

En general es una región semiárida, comprendida entre las isohietas de 600 y 350 mm anuales con decrecimiento en dirección este-noreste a sur-suroeste (Figura 2.5). Existe una progresiva aridez que alcanza grados de clima patagónico a la altura del Río Negro. Los máximos valores de lluvia se observan en febrero-marzo y en septiembre-octubre. El balance hídrico muestra que no existe exceso de agua, o sea que las lluvias no siempre son suficientes para los cultivos sin riego [7].

El uso del suelo está destinado exclusivamente a la explotación agrícola-ganadera, que se torna la actividad fundamental. La zona de riego definida por los valles de los ríos Negro (Valle Inferior del Río Negro-VIRN) y Colorado (Valle Bonaerense del Río Colorado-VBRC) origina un sector destinado principalmente a cultivos fruti-hortícolas, aunque se dan como alternativas frecuentes cereales y pasturas. Las tierras de escasa aptitud, arenales y litorales, están destinadas a un uso pecuario creciente [7,8].



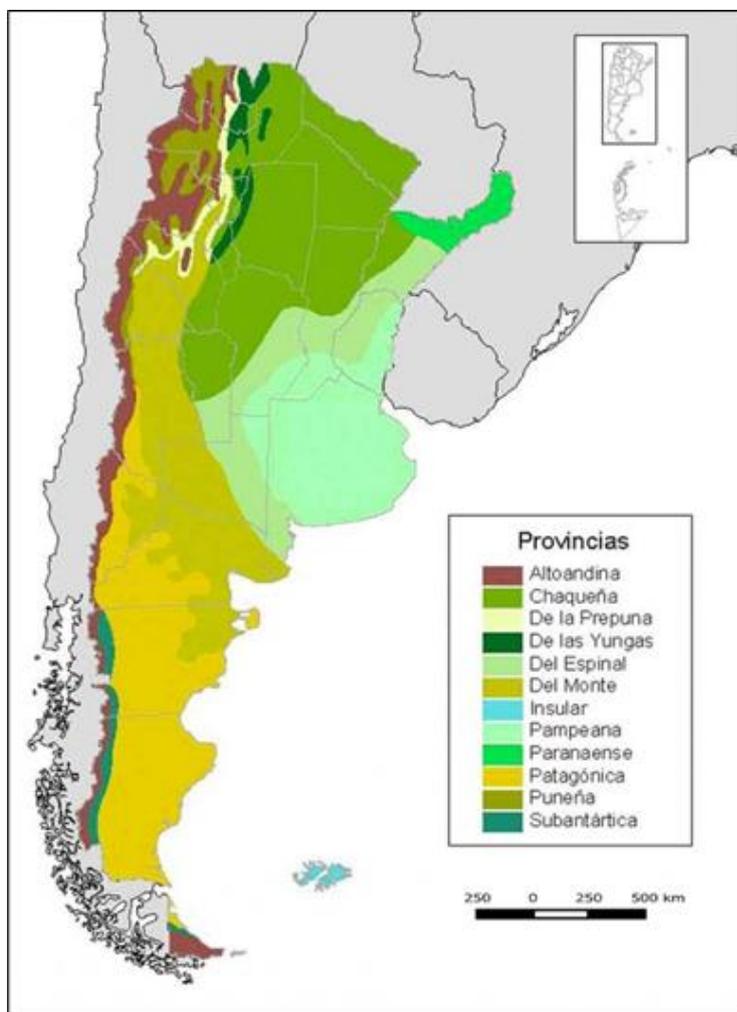
**Figura 2.5.** Ubicación y distribución de sitios de muestreo en relación a las isohietas de precipitación. Fuente: Laboratorio de Teledetección y SIG (EEA INTA H. Ascasubi).

Las provincias de La Pampa y Buenos Aires pertenecen a la Región Pampeana y la de Río Negro a la Patagonia. Estas regiones se definen en base a características geológicas, físicas (climatología y topografía) y a sus economías. Si bien cada una de ellas tiene características particulares, los sitios de muestreo se ubicaron en zonas limítrofes tanto desde el punto de vista de la división política como de las mencionadas regiones geográficas por lo que se considera que comparten las características generales de clima y recursos. Esta situación puede comprenderse mejor considerando el concepto de **regiones fitogeográficas** que es un modo de regionalización biogeográfica que comprende conceptos ecológicos e históricos. Básicamente una provincia fitogeográfica es un área con una fisonomía propia (bioma) y una composición florística que la define [9]. Como la matriz de estudio tiene un origen vegetal se considera que la regionalización desde el punto de vista fitogeográfico es clave dado que las principales características del polen dependen del origen floral.

En Argentina la mayoría de los investigadores que necesitan definir unidades fitogeográficas para sus estudios utilizan el sistema desarrollado por Cabrera [10,11]. La figura 2.6 muestra un mapa con las provincias fitogeográficas de Argentina siguiendo su criterio. Bajo esta



concepción los sitios de muestreo pertenecen a dos Provincias (también vecinas): “Provincia del Monte” y “Provincia del Espinal”. La primera se extiende como una franja vertical desde Salta hasta el nordeste de Chubut incluyendo territorio perteneciente al centro de Catamarca y La Rioja, centro y este de San Juan, Mendoza y Neuquén, oeste de La Pampa y centro-este de Río Negro. En cambio la Provincia del Espinal se extiende en forma de arco irregular desde el centro de Corrientes y norte de Entre Ríos hasta el sur de Buenos Aires abarcando zonas del centro de Santa Fé y Córdoba, gran parte de San Luis y centro de La Pampa [10,12]. Cabrera definió los límites de cada una de las diferentes provincias en la década de 1970 del siglo pasado; en estos últimos años se aprecian trabajos en los que varios de ellos están discutidos y reformulados [9,11–13].



**Figura 2.6.** Mapa de la República Argentina con las provincias fitogeográficas definidas según Cabrera (1971).

Fuente:  
<http://www.cofema.gob.ar/aplicaciones/mapoteca/mostrar.asp?idmapa=7>

Morello y col. [12], presentan un interesante trabajo de regionalización actualizado considerando variables dinámicas en relación a los cambios naturales y antrópicos ocurridos en las últimas décadas del siglo XX y en el transcurso del XXI por lo que se considera que es la



mejor fuente para describir la zona de muestreo. En su libro se definen tres niveles jerárquicos espaciales: ecorregión, subregión y complejo de ecosistemas lo cual permite describir de manera más precisa la zona de los diferentes sitios de muestreo. En este sentido en la tabla 2.2 se presenta la jerarquización correspondiente a las dos ecorregiones de interés relacionadas con las regiones fitogeográficas del “Monte” y del “Espinal” descritas por Cabrera [10]. Asimismo, en base a la regionalización de Morello y col. [12] los cinco sitios de muestreo se distribuyen en las ecorregiones de “Monte de Llanuras y Mesetas” y del “Espinal” resaltándose en la mencionada tabla (casillas con fondo coloreado) las respectivas subregiones y complejos ecosistémicos que serán descriptos individualmente a continuación.

**Tabla 2.2.** Detalle de la jerarquización de las dos ecorregiones relacionadas con los sitios de muestreo según criterios de Morello y col.

Ecorregión	Subregión	Complejos ecosistémicos
<i>Monte de Llanuras y Mesetas</i>	Septentrional	Bolsones endorreicos
		Faldeos de la Payunia
	Austral	Planicies y Mesetas Norpatagónicas
		Borde Oriental del Macizo Norpatagónico
		Planicies y Terrazas del Chubut
		Sierras de Lihuel Calel
<i>Espinal</i>	Cuenca del Paraná con Ñandubay	Cuchillas Mesopotámicas
		Pampas Llanas Húmedas
		Terrazas y Valles de inundación
	Llanura Chaco Pampeana con Algarrobo	Pampas Llanas Altas
		Pampas Pedemontanas
		Pampas Periserranas
	Llanura Chaco Pampeana con Caldenal	Pampas Arenosas con Pastizal Psamófilo
		Pampas Arenosas con Arbustal Pastizal
		Complejo Ecotono con Patagonia

Fuente: elaboración propia en base al libro Ecorregiones y complejos ecosistémicos argentinos [12].



### 2.3.3.1 Complejo ecosistémico “Planicies y Mesetas Norpatagónicas”

Perteneciente a la Subregión Austral de la Ecorregión Monte de Llanuras y Mesetas, el clima es templado árido a semiárido, con precipitación media anual entre 100 y 300 mm. La temperatura media anual es de 15 °C. Hacia el oeste y el sur se incrementan las condiciones de aridez. Las precipitaciones tienden a ser en invierno y son muy variables tanto anual como interanualmente [12].

Este complejo es tan extenso que incluye un conjunto variado de geoformas; aunque el paisaje es netamente patagónico, con predominio de mesetas segmentadas por la acción de los ríos. La red hidrográfica está formada por grandes ríos (Negro y Colorado) que atraviesan el mencionado complejo de oeste a este. Otras geoformas tienen una distribución localizada, como las dunas enanas, producto de fenómenos asociados a la actividad eólica, que en algunos sectores alcanzan las dimensiones propias de los médanos, tal como ocurre en algunos tramos del valle del Río Colorado entre otros. Por otra parte, en todo el Complejo se encuentran depresiones, de las cuales las más destacadas se orientan desde el noroeste al sudeste en forma casi paralela al Río Negro. Son áreas complejas, ya que en sus bordes externos actúan procesos morfodinámicos diferentes a los que ocurren en la parte central de las mismas, que se han convertido en lagunas y salitrales [12].

En cuanto a los patrones recurrentes predominan las estepas arbustivas semiáridas (Figura 2.7.a) de “jarillas” *Larrea divaricata* con *Larrea ameghinoi* en las mesetas más altas y xéricas y la de *Larrea divaricata* con *Geoffroea decorticans* (“chañar”) y *Capparis* sp. en los sitios más húmedos, hacia el este. En esta última estepa el chañar forma un estrato alto de hasta 2 a 2,5 m de altura, con un estrato inferior rico en gramíneas. Alrededor de los bajos en los que se acumula agua, el chañar puede formar bosques de 4 a 5 m de alto (Figura 2.7.b). La monotonía de la cubierta vegetal de los jarillares es sólo interrumpida en los bajos, donde aparecen comunidades halófilas. También hay bosques ribereños de “sauce criollo”, “mimbre” y “mimosas”. Una característica importante de este complejo es que marca un ecotono entre la vegetación de monte y la patagónica, cuyo límite puede establecerse en el Río Colorado [12].



**Figura 2.7.** Paisajes característicos de la subregión “Austral” perteneciente a la ecorregión “Monte de Llanuras y Mesetas”. **a.** Estepa arbustiva; **b.** vista de un típico islote de “chañares” (*Geoffroea decorticans*) con distintos estadios de floración. Fuente: a. Gentileza de Cristina Winschel y Alejandro Pezzola (Laboratorio de Teledetección y SIG, EEA INTA H. Ascasubi); b. propia.

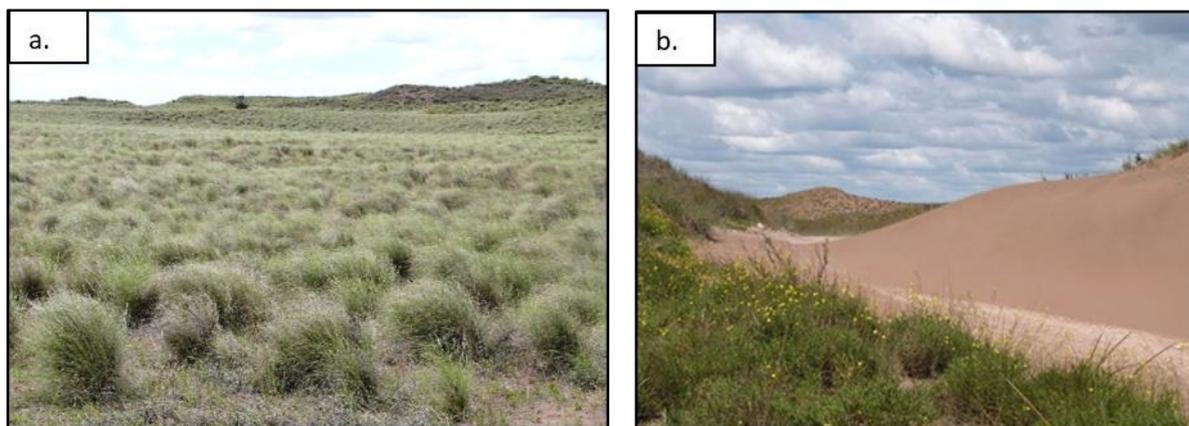
### 2.3.3.2 Complejo ecosistémico “Ecotono con Patagonia”

Este complejo, con una extensión de 20.684 km<sup>2</sup>, constituye el extremo austral de la ecorregión Espinal, en el extremo sur de la provincia de Buenos Aires y rincón noreste de la provincia de Río Negro. Ocupa casi completamente el partido de Carmen de Patagones, el extremo sudeste



del partido de Villarino de la provincia de Buenos Aires y el extremo nordeste del departamento de Adolfo Alsina de la provincia de Río Negro [12].

El clima es semiárido, transicional a árido de estepa. La temperatura media anual es de 15 °C. La precipitación media anual varía entre 300 y 100 mm. Las formas de relieve y los materiales superficiales se parecen más a los típicos de la ecorregión “Estepa Patagónica”, que aquellos de las ecorregiones Espinal o Monte. Se encuentran antiguos valles que atraviesan la meseta de oeste a este, que son depresiones alargadas de hasta 10 km de ancho y actualmente están colmatadas con arena, con formaciones medanosas (Figura 2.8.a y b). Al sur, se encuentra una serie de valles menores, médanos y lomadas orientados hacia la depresión de Bahía Blanca. A lo largo del límite entre las mesetas y los antiguos valles se encuentran amplias depresiones convertidas en salitrales, muchos de los cuales se concentran en las cercanías de la costa Atlántica [12].



**Figura 2.8.** Formaciones medanosas presentes en la zona meridional de la Subregión “Llanura Chaco Pampeana con Caldenal” perteneciente a la ecorregión del Espinal **a.** cubierta por pastizales; **b.** médano vivo. Fuente: gentileza de Cristina Winschel y Alejandro Pezzola (Laboratorio de Teledetección y SIG, EEA INTA H. Ascasubi).

La vegetación constituye un ecotono entre las ecorregiones Monte y Espinal, y se encuentran en las fisonomías y elementos de ambas. Hacia el oeste predominan los matorrales del Monte y hacia el este el caldenal. El matorral es más o menos denso, con arbustos que alcanzan de 1,5 a 3 m de altura, entre los que se desarrolla una estepa herbácea de escasa cobertura con predominio de gramíneas bajas (Figura 2.8.a). Tiene un estrato arbóreo bajo formado por “chañares” (*Geoffroea decorticans*), generalmente en isletas. Al sur del complejo, en el partido Patagones (provincia de Buenos Aires), se encuentran estepas arbustivas de ecotono entre el



Monte y el caldenal. La zona ha sido poco modificada. La vegetación dominante es la estepa arbustiva xerófila que fisonómicamente se presenta como un matorral más o menos denso, con arbustos de hasta 3 m de altura, con escasa cobertura herbácea. En el área hay muchos salitrales desprovistos de vegetación en su mayor parte y con vegetación halófila en algunos sectores [12].

Este Complejo se encuentra entre las zonas más afectadas por las sequías en el período 1996-2007 y ha estado frecuentemente bajo emergencia climática. Sin embargo, la existencia de sequías ininterrumpidas entre 1991 y 2005, hace pensar que se trata de condiciones climáticas más que de eventuales emergencias climáticas [12].

En resumen, se considera que la zona de procedencia de las muestras presenta la particularidad de que los límites no son exactos ni excluyentes, al contrario, se considera una zona de ecotono o transicional entre ecorregiones vecinas. Aquí los límites son difusos debido a la mezcla de diferentes condiciones como la calidad de sitio, especies y estructuras vegetales de las dos regiones contiguas. Por otra parte los cambios en las condiciones climáticas (como por ejemplo el desplazamiento de isohietas) más que alterar la vegetación natural dominante, influye sobre las actividades económicas anulando cualquier indicio de vegetación original (como indicadora de límite fitogeográfico) debido al avance de la frontera agropecuaria [12,13].

La descripción de la zona de muestreo relacionada específicamente con la presencia de especies vegetales se desarrollará en el capítulo correspondiente a la determinación de origen botánico (capítulo 3).

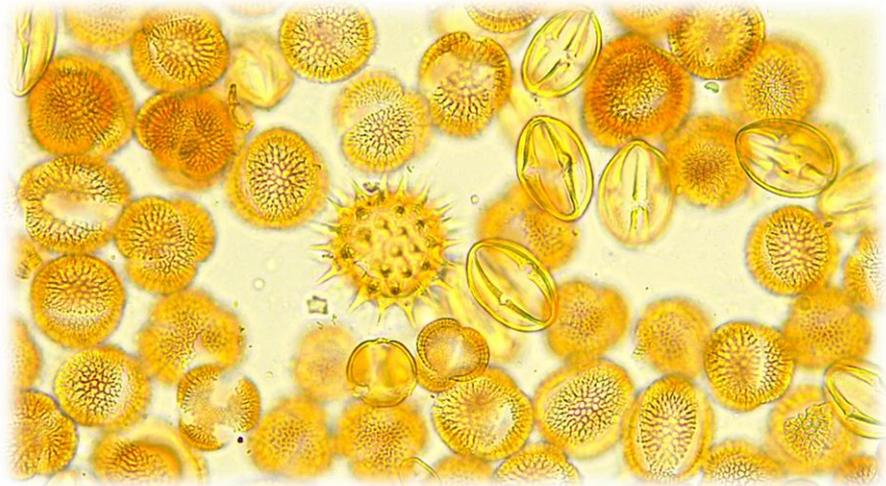
## 2.4 Bibliografía

- [1] J. M. y colaboradores Folgar Bessone, “Campo y abejas. Edición especial Polen.”, Folgar Bessone J. M., Buenos Aires, p. 88, 2007.
- [2] B. Baldi Coronel, D. Grasso, S. Chaves Pereira, y G. Fernández, “Caracterización bromatológica del polen apícola argentino”, *Ciencia, Docencia y Tecnol.*, vol. 15, núm. 29, pp. 145–181, 2004.
- [3] Cornejo Luis G., *Polen. Tecnología de su producción, procesado y comercialización*, Editorial. La Plata, 1994.



- [4] M. G. R. Campos, C. Frigerio, J. Lopes, y S. Bogdanov, “What is the future of Bee-Pollen?”, *J. ApiProduct ApiMedical Sci.*, vol. 2, núm. 4, pp. 131–144, 2010.
- [5] S. Bogdanov, “Quality and Standards of Pollen and Beeswax”, *Apiacta*, vol. 38, pp. 334–341, 2004.
- [6] M. G. R. Campos *et al.*, “Pollen composition and standardisation of analytical methods .”, *J. Apic. Res.*, vol. 47, núm. 2, pp. 156–163, 2008.
- [7] A. Pezzola y C. Winschel. Informe técnico. Proyecto RIAP. "Descripción de la zona I, partidos bonaerenses de Villarino y Patagones, área de influencia de la EEA INTA Hilario Ascasubi.", 2011.
- [8] G. Peri, “La agricultura irrigada en Río Negro y su contribución al desarrollo regional”, Buenos Aires, 2004.
- [9] M. J. Apodaca, J. V Crisci, y L. Katinas, “Las provincias fitogeográficas de la República Argentina: definición y sus principales áreas protegidas”, en *El deterioro del suelo y el ambiente en la Argentina. Tomo 1*, Primera., R. R. Casas y G. F. Albarracín, Eds. Buenos Aires: Fundación Ciencia, Educación y Cultura, 2015, pp. 79–101.
- [10] A. L. Cabrera, “Fitogeografía de la república Argentina”, *Boletín la Soc. Argentina Botánica*, vol. 14, pp. 1–50, 1971.
- [11] A. M. Ribichich, “El modelo clásico de la fitogeografía de Argentina: un análisis crítico”, *Interciencia*, vol. 27, núm. 12, pp. 669–675, 2002.
- [12] J. Morello, S. D. Matteucci, A. F. Rodriguez, y M. E. Silva, *Ecorregiones y Complejos ecosistemicos argentinos*. Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora, 2012.
- [13] U. O. Karlin, M. S. Karlin, R. M. Zapata, R. O. Coirini, A. M. Contreras, y M. Carnero, “La Provincia Fitogeográfica del Monte: límites territoriales y su representación”, *Multequina*, núm. 26, pp. 63–75, 2017.

## Capítulo 3



Determinación del origen botánico:  
análisis entomopalinológico

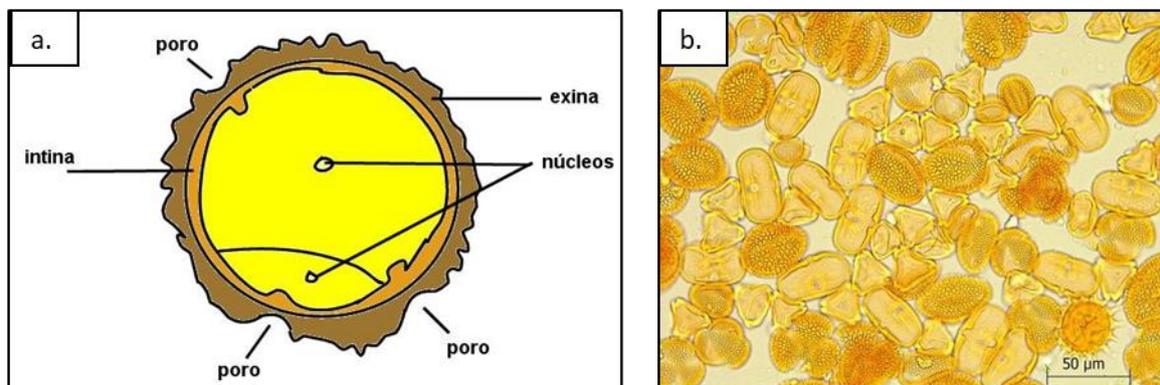


### 3.1 Objetivo

El objetivo de este capítulo fue conocer el origen botánico de las muestras de polen corbicular obtenidas en los diferentes sitios de muestreo a través del análisis entomopalinológico con el fin de aportar a su caracterización.

### 3.2 Introducción

Los granos de polen albergan las células sexuales masculinas de las plantas con semillas (Angiospermas y Gimnospermas); en este sentido se puede decir que el polen representa la flora terrestre [1]. El grano de polen maduro está protegido por una capa externa (exina) constituida por varias subcapas muy resistentes formadas por sustancias terpenoides (esporopolenina) que protegen el contenido vivo. Más internamente, y adosada a la exina, hay una segunda capa, la intina, de naturaleza celulósica y péctica (Figura 3.1.a). Los diferentes pólenes se caracterizan por su tamaño y forma como así también por la estructura y escultura de su exina, lo cual permite realizar una clasificación sistemática diferenciando las distintas especies botánicas (Figura 3.1.b). La ciencia que estudia el polen y las esporas se denomina **Palinología** [1–4]. Dentro de esta se distingue la **Entomopalinología** que estudia específicamente el polen asociado con los insectos. Este campo de estudio incluye varias disciplinas que contemplan la investigación de abejas, mieles, distancias de pecoreo, la biología de la polinización y los patrones migratorios entre otros [1,5].



**Figura 3.1.a.** Estructura de un grano de polen. **b.** Fotografía de diferentes granos de polen obtenida con la cámara del microscopio Leica ICC50E (40x). Fuente: **a.** <http://e-educativa.catedu.es>, **b.** propia.



Considerando al polen corbicular como alimento humano el análisis entomopalinológico hace referencia a su origen botánico y, por ende, lo vincula a un área geográfica donde fue obtenido, lo cual es imprescindible en el caso de producciones con sello de certificación de origen. Asimismo, el conocimiento de los taxones a los que pertenecen las cargas corbiculares permite inferir aspectos composicionales relacionados a características nutricionales y/o terapéuticas [6–9].

Un criterio de clasificación del polen apícola lo relaciona con la cantidad de especies florales que lo componen basándose en el análisis entomopalinológico. De esta manera el polen “heterofloral” o “**multifloral**” tendrá una composición variable según el promedio de las flores que hayan sido visitadas por las abejas, es decir, estará conformado por cargas obtenidas de plantas de diferentes taxones. Este tipo de polen es el que se encuentra más frecuentemente en el ámbito comercial. Si, por el contrario, la muestra contiene un predominio mayoritario de un taxón en particular, se clasifica a ese polen como “**monofloral**” [7,9,10]. Desde un punto de vista económico la determinación de un origen monofloral puede incrementar el valor de este producto de la colmena [9]; asimismo tendrá mayor consistencia composicional y, por lo tanto, será utilizado más exitosamente en nutrición y/o en medicina según sus características [6,9,11].

Por otra parte, la entomopalinología permite conocer las plantas poliníferas utilizadas y los aportes nutricionales de cada una de ellas para las abejas, proporcionándole al apicultor información relevante para un óptimo manejo de sus colmenas [5]. En general estos estudios generan un importante conocimiento dentro del área de nutrición apícola en todo el mundo [12-15].

Las muestras analizadas en este trabajo de tesis pertenecen a dos zonas fitogeográficas diferenciadas según el criterio de Cabrera [16], las Provincias del Espinal y la del Monte, como se describió en el capítulo 2. En este capítulo se ampliará la descripción incorporando la composición florística de cada una de ellas.

Si bien la vegetación dominante en una provincia fitogeográfica está definida por el bioma que impera en ella, los sitios de muestreo se encuentran en una zona limítrofe para ambas provincias en la que se puede considerar una franja transicional (ecotono) entre la Provincia del Espinal y la del Monte. Como la asignación de límites entre las provincias de este territorio no son exactas ni excluyentes, en muchos casos estos pueden aparecer de manera difusa por la aparición de condiciones donde se mezclan, por ejemplo, calidad de sitio, especies y estructuras vegetales



de dos regiones contiguas [17,18]. En este sentido la descripción botánica de las zonas relativas a la ubicación de los apiarios de los que se obtuvieron las muestras coincide ampliamente tanto en lo mencionado por Cabrera [16] como por Morello y col. [19]. Por esta razón se especificará la presencia de los diferentes taxones haciendo referencia a la región “Espinal” y “Monte” para simplificar la denominación de ambas regiones o ecorregiones.

Vale definir un concepto específico mencionado por Cabrera [16] para comprender bien su significado. Se denomina “comunidad clímax” a la etapa final madura en la sucesión geobotánica; es decir, una comunidad vegetal que representa territorialmente la etapa de máximo biológico estable. Se puede emplear como una expresión de la etapa final o asociación estable de una serie de vegetación. En la práctica, la clímax, puede considerarse sinónimo de vegetación potencial [20].

En cuanto a la fisonomía de la vegetación perteneciente al “**Espinal**” (Figura 4.2.) se puede decir que es bastante homogénea, con ligeras diferencias relacionadas con la topografía, donde predominan los pastizales en las zonas más bajas y los árboles y arbustos en las zonas más altas (Figura 3.2.a). La comunidad clímax es el bosque de “caldén” (*Prosopis caldenia*) (Figura 3.2.b); aunque también existen árboles secundarios como “algarrobos” (*Prosopis nigra*, *Prosopis flexuosa*), “chañar” (*Geoffroea decorticans*) (Figura 3.2.c) y especies como el “molle” (*Schinus fasciculatus*) y “sombra de toro” (*Jodina rhombifolia*). Entre la población arbustiva se puede encontrar “piquillín” (*Condalia microphylla*), “alpataco” (*Prosopis alpataco*), “jarilla” (*Larrea divaricata*), “manca caballo” (*Prosopidastrum globosum*) y “llaollín” (*Lycium chilense*) entre otras. En el estrato herbáceo predominan Poáceas (principalmente pertenecientes a los géneros *Stipa* o *Setaria*) (Figura 3.2.b) como así también algunas dicotiledóneas relacionadas a los géneros *Glandularia*, *Plantago* y *Baccharis* entre otros. En esta zona se destaca un grupo de especies consideradas como malezas que, si bien fueron introducidas, hoy se encuentran naturalizadas. Entre ellas sobresalen por su abundancia “flor amarilla” (*Diploaxis tenuifolia*) (Figura 3.2.c), “abrepuño de flor amarilla” (*Centaurea solstitialis*), “mostacillas” (*Sisymbrium irio* y *Hirschfeldia incana*), “alfilerillos” (*Erodium* sp.), “trébol de carretilla” (*Medicago minima*) y distintas especies de “cardos” (*Carduus* sp., *Carthamus lanatus*, etc.) entre los más relevantes [5,16,19].



**Figura 3.2.** Región del Espinal **a.** Paisaje de camino vecinal donde se aprecian algunos “caldenes”, pastizales y arbustos característicos. **b.** Porte arbóreo del “caldén” (*Prosopis caldenia*) y estrato herbáceo con predominio de Poáceas. **c.** “Flor amarilla” (*Diplotaxis tenuifolia*) rodeando un montecito de “chañares”



(*Geoffroea decorticans*). Fuente: gentileza de Cristina Winschel y Alejandro Pezzola (Laboratorio de teledetección y SIG, EEA INTA H. Ascasubi).

El tipo de vegetación predominante en la región del “**Monte**” (Figura 3.3.a) es el matorral o la estepa arbustiva xerófila, sammófila o halófila, aunque también existen bosques marginales de algarrobos o de sauces. En general se puede considerar una estepa arbustiva abierta, de altura variable y escasa cobertura herbácea. Desde el punto de vista florístico la provincia se caracteriza por la presencia de especies del género *Larrea* y *Prosopis* arbustivos. La comunidad clímax es el “jarillal”, una asociación de “jarillas” (*Larrea divaricata*, *L. cuneifolia* y *L. nitida*), “mata sebo” (*Monttea aphylla*) y “monte negro” (*Bougainvillea spinosa*). También puede encontrarse otras especies acompañantes como el “llaollín” (*Lycium chilense*), “chilladora” (*Chuquiraga erinacea*), “algarrobo” (*Prosopis flexuosa*), “alpataco” (*Prosopis alpataco*), “solupe” (*Ephedra ochreatea*) y “piquillín” (*Condalia microphylla*). Asimismo, en el límite con la Provincia Patagónica, pueden observarse isletas de “chañar” (*Geoffroea decorticans*) (Figura 3.3.b) y matorrales de “atamisqui” (*Capparis atamisquea*) y “brea” (*Cercidium praecox*) [5,16,19].





**Figura 3.3.** Región del Monte **a.** Paisaje característico con matorral arbustivo de alturas variables; **b.** vista interna de una típica isleta de “chañares” (*Geoffroea decorticans*). Fuente: gentileza de Cristina Winschel y Alejandro Pezzola (Laboratorio de teledetección y SIG, EEA INTA H. Ascasubi).

Por otra parte, en los valles fluviales del río Colorado y del río Negro la presencia de agua permanente permite el desarrollo de abundante vegetación herbácea y constituyen zonas aptas para el cultivo. En general se practica la agricultura bajo riego donde se destacan los cultivos de especies forrajeras, plantas hortícolas (Figura 3.4.a) y frutales. Asociadas a estos cultivos se encuentran plantas naturalizadas de amplia distribución como “trébol de olor blanco” (*Melilotus albus*), “trébol blanco” (*Trifolium repens*), “alfalfa” (*Medicago sativa*), “mostaza negra” (*Brassica nigra*), “cardos” (*Carduus* sp.), “diente de león” (*Taraxacum officinale*) y “alfilerillo” (*Erodium cicutarium*) entre otras [5,21–23].



**Figura 3.4.** Zona de riego del Rio Colorado (valle inferior): cultivos de **a.** cebolla (*Allium cepa*); **b.** alfalfa (*Medicago sativa*, para producción de semilla) con algunos ejemplares de “flor amarilla” (*Diplotaxis tenuifolia*). Fuente: a. gentileza de Cristina Winschel y Alejandro Pezzola (Laboratorio de teledetección y SIG, EEA INTA H. Ascasubi); b. propia.



Actualmente no existe un consenso internacional en cuanto a la metodología para determinar el origen botánico del polen corbicular, aunque algunos autores como Barth y col. [24,25] están proponiendo una estandarización para ello. Los métodos más tradicionales se basan en una observación microscópica de los granos de polen según las características morfológicas en los cuales se utiliza criterios de clasificación que se comparten con el estudio del polen contenido en las mieles, denominados estudios melisopalinológicos [7]. Tampoco existe un consenso sobre el valor de corte para la consideración de polen monofloral ya que Campos y col. [7] proponen el valor de 80% y Freitas y col. [10] el 90%. Como estos métodos son muy laboriosos e insumen mucho tiempo de estudio [26,27], en los últimos años están surgiendo nuevas propuestas analíticas como el análisis de imágenes [28,29] o la determinación del perfil de flavonoides [30] para dar respuestas sobre el origen o calidad del polen analizado con fines comerciales. Incluso Haba [27] propone una alternativa de detección molecular para definir la identificación botánica del polen recolectado por abejas melíferas.

El desarrollo de este capítulo se basa en la determinación del origen botánico de las muestras de polen obtenidas en la zona centro de Argentina como parte de la caracterización de las mismas.

### **3.3 Materiales y métodos**

#### **3.3.1 Muestras utilizadas**

Las muestras utilizadas para este trabajo corresponden al total de las 50 descritas en el capítulo 2, pertenecientes a los siete apiarios ubicados en las tres provincias de la zona central de la República Argentina (Buenos Aires, La Pampa y río Negro). El período de recolección se relaciona con dos temporadas apícolas consecutivas correspondientes a los años 2013-2014 y 2014-2015. En la tabla 3.1 se puede observar la distribución de las mismas en base a la ubicación geográfica de los apiarios. Asimismo, se especifican los períodos de muestreo relacionados con cada sitio. El detalle de las fechas de recolección de cada muestra se presentará en una tabla al final de la discusión de este capítulo junto con la correspondiente clasificación (Tabla 3.6).



**Tabla 3.1:** Detalle de la distribución de muestras analizadas según la localización geográfica de los apiarios y los períodos de tiempo en los que se obtuvieron.

Localidad	Provincia	Apiarios	Cantidad de muestras	Períodos de muestreo
<i>Hilario Ascasubi</i>	Buenos Aires	2	24	Diciembre 2013 a marzo 2014
				Diciembre 2014 a marzo 2015
<i>Médanos</i>	Buenos Aires	1	13	Febrero a abril 2014
				Noviembre 2014 a mayo 2015
<i>Villalonga</i>	Buenos Aires	1	1	Marzo 2014
<i>Jacinto Arauz</i>	La Pampa	1	2	Marzo a abril 2014
<i>Viedma</i>	Rio Negro	3	10	Diciembre 2013 a marzo 2014
				Octubre a diciembre 2014

Fuente: Elaboración propia.

El sitio denominado H. Ascasubi es el más importante desde el punto de vista de cantidad de muestras (24), frecuencia y estacionalidad de las recolecciones. El polen perteneciente a este sitio de muestreo fue recolectado en dos temporadas apícolas consecutivas entre los meses de diciembre a marzo. Además, como puede observarse en la tabla 3.1, se han considerado dos apiarios. Uno de ellos correspondiente al de un apicultor que suministró una única muestra (número 37) recolectada a mediados de diciembre del año 2013, razón por la cual fue incluida dentro de la primera temporada apícola. Las 23 muestras restantes pertenecen a colmenas ubicadas en el predio de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de H. Ascasubi (Figura 3.5.a).

El sitio correspondiente a la localidad de Médanos está representado por un único apiario (Figura 3.5.b), propiedad de un apicultor local, quien tomó las muestras en ambas temporadas, coincidiendo en este aspecto con el sitio anterior. Igualmente, en las localidades de Villalonga y Jacinto Arauz (Figura 3.5.d) las muestras fueron obtenidas por apicultores en sus respectivos apiarios, aunque la recolección de ese polen fue en fechas aisladas. Finalmente, el sitio de



Viedma (Figura 3.5.c) está representado por la mayor cantidad de apiarios, todos ellos ubicados en la zona de riego del valle inferior del río Negro, específicamente sobre la margen sur, en un sector de chacras conocido como Valle de IDEVI (Instituto de Desarrollo del Valle Inferior). La recolección de polen de estas muestras se realizó en diferentes momentos de las dos temporadas apícolas mencionadas.



**Figura 3.5.** Apiarios donde se obtuvieron las muestras correspondientes al sitio **a.** H. Ascasubi, **b.** Médanos, **c.** Viedma y **d.** Jacinto Arauz. Fuente: propia.

Como se describió en la sección 2.3.2, todas las muestras fueron conservadas en freezer hasta su procesamiento. Para el análisis entomopalinológico se separaron aproximadamente 10,0 g de las muestras congeladas (mismo proceso de cuarteo manual descrito en el capítulo anterior) y se colocaron en estufa a  $40 \pm 2$  °C por 24 horas (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Muestras luego del proceso de secado. Fuente: propia.

### 3.3.2 Metodología de análisis

#### 3.3.2.1 Metodología tradicional (Método de Wodehouse)

En una primera instancia se optó por la metodología convencional que consistió en una separación por color previa a la identificación microscópica. Para la implementación de este método se utilizaron 4,0 g de polen según las conclusiones obtenidas en el trabajo de Armaza [31].

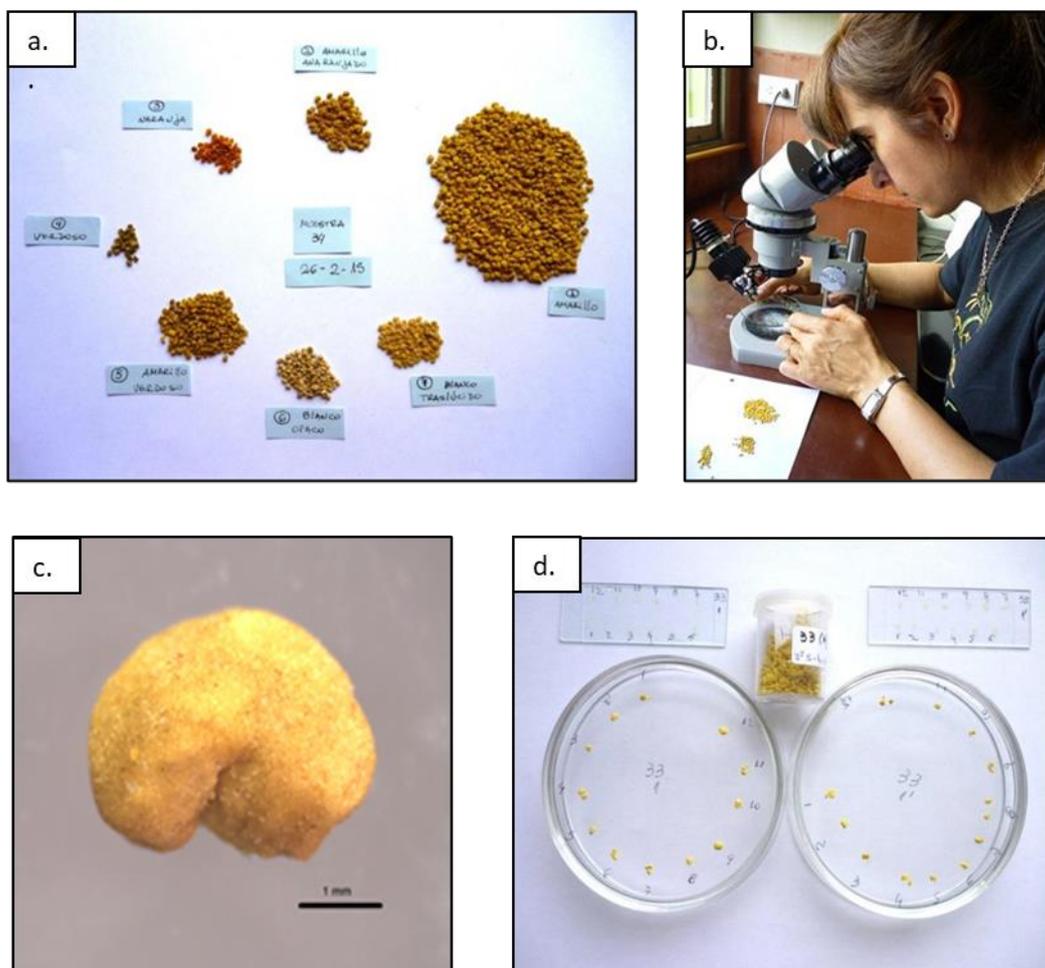
Esta clasificación insume mucho tiempo ya que comprende dos etapas: una primera separación a simple vista en la que se distribuyen las diferentes cargas en grupos en base al color y tamaño. La realización sobre una superficie blanca facilita el proceso (Figura 3.7.a). Como las cargas agrupadas en un mismo color pueden presentar diferentes tipos polínicos (en este trabajo se observó particularmente en el grupo perteneciente a los tonos amarillos) es necesaria una segunda etapa en la cual las cargas de cada grupo se analizan bajo lupa para evaluar el brillo y la textura (Figuras 3.7.b y c).

Posteriormente se realizó la determinación y confirmación del origen botánico a través de la observación microscópica de los granos montados según la técnica de Wodehouse [32] (Figura 3.7.d). En el caso que no pueda concretarse la identificación se recurre a una micro-acetólisis [33]. Finalmente, la importancia relativa de cada tipo polínico presente en la muestra analizada se determina gravimétricamente a través de la expresión de un porcentaje según Louveaux [34].

Para llevar adelante el mencionado procedimiento en este trabajo de tesis, se utilizó un microscopio estereoscópico binocular Nikon 76468 para la evaluación de las diferentes cargas



y un microscopio óptico Zeiss Axiostar para el recuento e identificación de los granos de polen en los respectivos preparados. La identificación botánica de las cargas se realizó mediante la comparación de la morfología de los granos de polen de los preparados microscópicos con los de la Palinoteca del LabEA UNS-CIC (Laboratorio de Estudios Apícolas - Universidad Nacional del Sur – Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires), atlas palinológicos y publicaciones varias. Tanto la técnica de Wodehouse como la de Pla Dalmau se detallan en el Anexo I.



**Figura 3.7.** a. Clasificación de la muestra según color y tamaño; b. evaluación del brillo y textura de cada carga bajo lupa; c. detalle de la observación bajo lupa de una carga corbicular (barra de escala=1mm); d. identificación de cargas y armado de los preparados para la observación microscópica. Fuente: Propia.



### 3.3.2.2 Metodología de acetólisis (Erdtman 1969) modificada:

Para poder cumplir el objetivo de este capítulo en tiempo y forma se implementó una metodología más rápida que pudiera brindar la información sobre la presencia de los principales tipos polínicos en cada muestra. Luego de una nueva revisión bibliográfica se decidió realizar una técnica de acetólisis [35] que evita el paso de clasificación por color. La misma consiste en una digestión ácida en caliente que destruye el protoplasma y la intina de los granos de polen. De esta manera la destrucción del primero permite la transmisión de la luz facilitando la observación de las características morfológicas de la exina (resistente al proceso de digestión) permitiendo analizar sus características morfológicas a través de la observación al microscopio óptico.

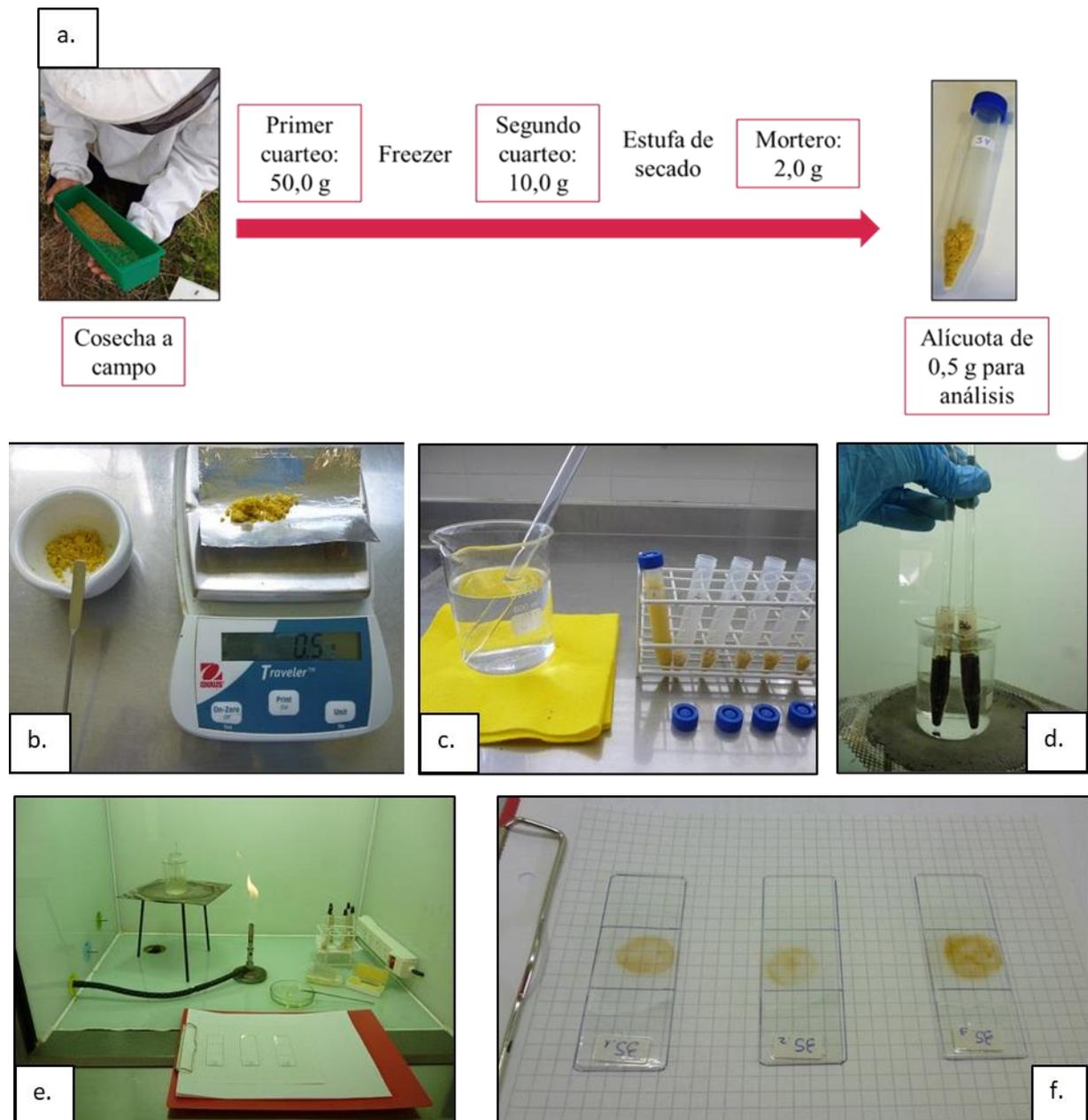
Para esta metodología, de los 10,0 g de polen secado en estufa (sección 3.3.1), se tomó una submuestra de 2,0 g [25,36,37]. La misma fue sometida a un tratamiento previo a la acetólisis en base a una modificación de la técnica de Barth y col. [25]. En la figura 3.8.a se ilustra el manejo integral de la muestra original (proveniente del apiario) hasta llegar a la obtención de la unidad de análisis. Inicialmente cada submuestra (en adelante mencionada como muestra) fue triturada en morteros. El desagregado resultante fue homogeneizado y de él se extrajo una alícuota de 0,5 g (Figura 3.8.b) que se colocó en un tubo tipo Falcon graduado de 15 mL de capacidad. Seguidamente se realizaron dos lavados según el siguiente procedimiento: se agregó agua destilada a una temperatura de  $30 \pm 2$  °C llevando aproximadamente a un volumen de 13 mL y se agitó con varilla de vidrio hasta la suspensión completa del material (Figura 3.8.c). Luego se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante.

Posteriormente, el residuo obtenido (granos de polen y restos sólidos) se trató con ácido acético glaciado (AAG) que permitió la conservación de la muestra hasta el procedimiento de acetólisis propiamente dicho. Todas las muestras fueron procesadas hasta este paso y se reservaron a temperatura ambiente.

Para iniciar el proceso de acetólisis cada muestra se trasvasó a un tubo de centrifuga térmico graduado de capacidad de 10 mL previa resuspensión del contenido con ayuda de un agitador tipo vortex. A continuación se agregaron aproximadamente 5 mL de mezcla acetolítica (9 anhídrido acético : 1 ácido sulfúrico) y se llevó a un baño térmico a ebullición por un período de tres minutos mientras se agitaba manualmente con una varilla (Figura 3.8.d). Posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada y luego se le incorporó 1 mL de una solución de



glicerina en agua (1:1) agitando con una varilla de vidrio. Finalmente se completó con agua destilada y se centrifugó descartando el sobrenadante. El residuo resultante fue montado sobre porta-objetos con gelatina-glicerina y parafina (Figuras 3.8.e y f). La técnica de acetólisis utilizada se detalla en el Anexo I.

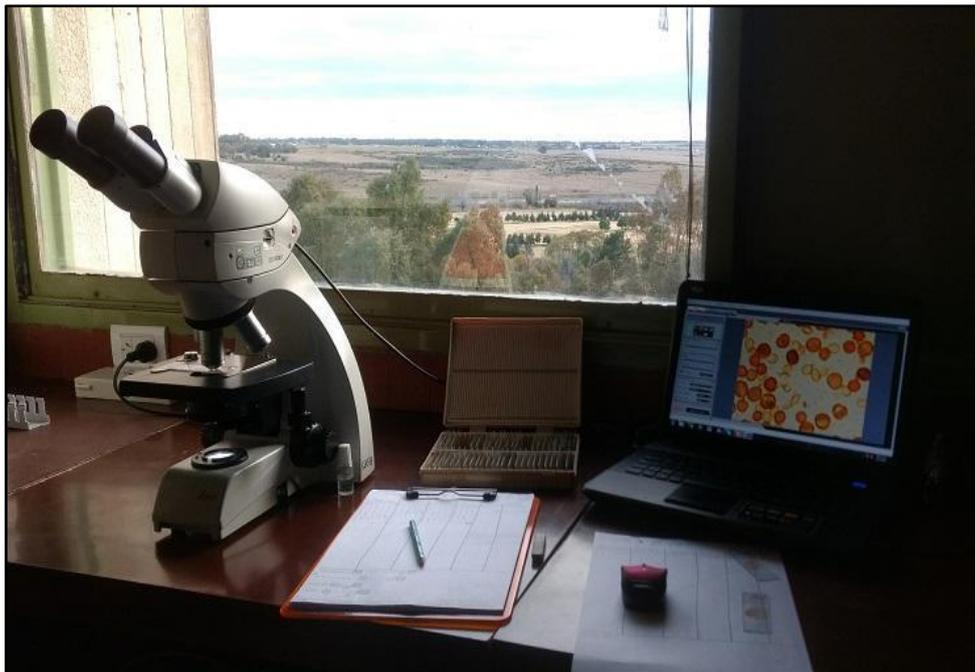


**Figura 3.8.a.** Gráfico del proceso de conformación de la unidad de análisis. Método de acetólisis: **b.** muestra homogeneizada en mortero y armado de submuestras, **c.** proceso de lavado, **d.** baño térmico con mezcla acetolítica (acetólisis propiamente dicha), **e** y **f.** montaje con gelatina-glicerina y parafina. Fuente: Propia.



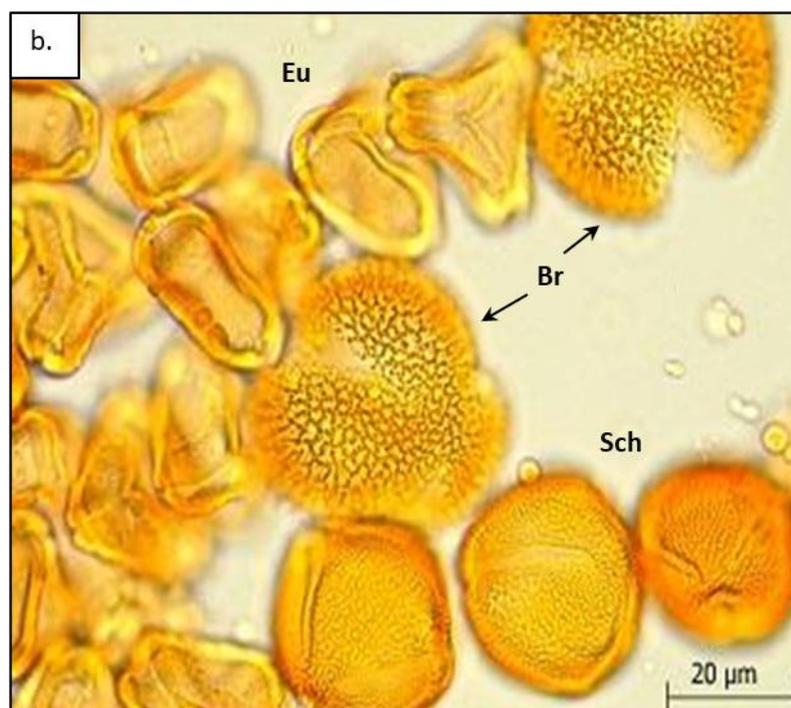
Para cada muestra se realizaron tres preparados contándose aproximadamente 1500 elementos en cada uno de ellos. Sobre la base de este recuento se obtuvo un promedio de los porcentajes de representación de cada tipo polínico presente en cada muestra.

La caracterización morfológica de los granos de polen se realizó teniendo en cuenta tanto la forma, el tamaño y el tipo de aperturas como la estructura y escultura de la exina. Para ello se utilizó un microscopio binocular Leica DM 500 con cámara digital Leica modelo ICC50E (Figura 3.9).



**Figura 3.9.** Microscopio Leica modelo ICC50E utilizado para la identificación morfológica de los granos de polen acetolizados. Fuente: Propia.

El diagnóstico realizado en base a la morfología de los granos de polen permitió la identificación de los taxones a diferentes niveles en la jerarquía taxonómica, es decir, familia, tribu, género y en algunos pocos casos, especie (Figuras 3.10. a y b). En este sentido se optó por la expresión “tipo polínico” para generalizar la identificación taxonómica de las muestras la cual puede hacer referencia a varias especies del mismo género, a géneros próximos que presentan las mismas características polínicas como así también a una especie en particular [38].



**Figura 3.10.** Fotografías obtenidas con la cámara del microscopio Leica ICC50E: **a.** varios tipos polínicos (40x), **b.** detalle de tres tipos polínicos (100x) característicos de la región de estudio: Brassicaceae (Br), *Eucalyptus* sp. (Eu) y *Schinus* sp. (Sch). Fuente: Propia.



En el caso de hallar elementos con características morfológicas dudosas con muy baja frecuencia de aparición se decidió denominarlos como “NN X<sub>n</sub>” (con el subíndice X=número de muestra en donde fue encontrado y con n=1, 2... en caso que se hayan encontrado más de un NN por muestra). Esta denominación reemplazó la identificación del taxón, dado que en este trabajo solo se pretende reconocer la presencia de los tipos polínicos predominantes y no la totalidad y especificidad de los granos de polen presentes. Este criterio se condice con lo sugerido por Campos y col. [7] para lo concerniente al “examen microscópico” (específicamente en lo relacionado a la determinación de origen botánico) y por Freitas y col. [10].

Los diferentes tipos polínicos identificados se clasificaron, en virtud del porcentaje alcanzado, en categorías propuestas por Louveaux y col. [34] para análisis melisopalinológicos: “**polen dominante**” (PD) cuando una unidad sistemática está presente en más del 45%; “**polen secundario**” (PS) cuando la frecuencia de presentación está comprendida entre 16 y 45%; “**polen de menor importancia**” (PM) para los tipos polínicos que se encuentran entre 3 y 15%; “polen minoritario” los que aparecen con una frecuencia menor al 3% [10,25,38]. A los fines de cumplir con el objetivo de este trabajo solo se mostrarán en tabla las frecuencias de los taxones con valores mayores al 3%.

### 3.4 Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se presentan en tablas individuales según el sitio de muestreo para el caso de los apiarios localizados en H. Ascasubi, Médanos y Viedma (Tabla 3.2; 3.3 y 3.4 respectivamente). En estas tablas la variación en la coloración del fondo se relaciona con los diferentes períodos de la toma de muestras. Los pertenecientes a las localizaciones de Villalonga y Jacinto Arauz se muestran en la tabla 3.5. En este último caso el período de recolección de muestras fue durante los meses de marzo y abril de 2014 por lo que se consideraron dentro de la misma temporada apícola, razón por la cual el color de fondo es uniforme. Cada tabla hace referencia a la cantidad (incluyendo los NN) y la distribución de tipos polínicos hallados en cada muestra.



**Tabla 3.2** Cantidad y distribución de los tipos polínicos identificados en las muestras pertenecientes a **Hilario Ascasubi**. El fondo blanco indica el período de muestreo de diciembre de 2013 a marzo de 2014 y el fondo coloreado el período de diciembre de 2014 a marzo de 2015. TP: tipos polínicos.

Número de muestra	Cantidad TP	Polen Dominante	Polen Secundario	Polen de menor importancia
1	9		<i>Lotus</i> (41.3%) - <i>Eucalyptus</i> (35.7%) - Brassicaceae (18.2%)	<i>Tamarix</i> (3.3%)
2	10	<i>Eucalyptus</i> (57.5%)	<i>Lotus</i> (22.6%) - Brassicaceae (17.7%)	
3	9	<i>Lotus</i> (49.0%)	<i>Eucalyptus</i> (24.6%) - Brassicaceae (19.4%)	<i>Centaurea</i> (5.4%)
4	11		<i>Lotus</i> (41.1%) - Brassicaceae (26.8%) - <i>Eucalyptus</i> (17.8%) -	<i>Centaurea</i> (4.7%) - Asteraceae (3.6%)
5	10		<i>Lotus</i> (44.1%) - Brassicaceae (24.0%)	<i>Eucalyptus</i> (13.9%) - <i>Lycium</i> (8.3%) - Heliantheae (4.9%)
6	11	<i>Lotus</i> (63.2%)	Brassicaceae (18.2%)	Melilotus (10.1%) - Plantago (3.2%)
7	7	Brassicaceae (70.1%)	<i>Lotus</i> (18.8%)	<i>Tamarix</i> (4.3%) - Plantago (3.5%)
8	13		Brassicaceae (37.5%) - <i>Lotus</i> (24.9%)	Liliaceae (12.6%) - <i>Lamium</i> (6.1%) - <i>Eucalyptus</i> (3.7%) - Plantago (3.6%)
9	15	<i>Lotus</i> (59.0%)	Brassicaceae (22.9%)	Plantago (7.0%) - <i>Lycium</i> (3.7%) - <i>Tamarix</i> (3.5%)
10	11	Brassicaceae (52.1%)	Liliaceae (17.9%)	<i>Lotus</i> (15.6%) - <i>Lycium</i> (7.1%) - <i>Lamium</i> (4.5%)
11	9	Brassicaceae (74.5%)		Liliaceae (9.3%) - <i>Lycium</i> (8.8%) - <i>Lamium</i> (3.7%)
12	9	Brassicaceae (77.5%)		<i>Lycium</i> (8.8%) - Liliaceae (5.2%) - <i>Lamium</i> (4.2%) - <i>Lotus</i> (3.0%)
37	3	Brassicaceae (85.7%)		<i>Eucalyptus</i> (13.1%)
45	4	<i>Lotus</i> (99.0%)		
46	7	<i>Eucalyptus</i> (66.5%)	<i>Lotus</i> (30.0%)	
47	4	<i>Lotus</i> (99.6%)		
48	3	<i>Eucalyptus</i> (86.4%)		<i>Lotus</i> (12.6%)



49	4	<i>Lotus</i> (86.9%)		<i>Eucalyptus</i> (12.8%)
50	6	<i>Lotus</i> (91.9%)		<i>Eucalyptus</i> (6.0%)
51	3	<i>Lotus</i> (97.6%)		
52	3	<i>Lotus</i> (74.0%)	Brassicaceae (25.8%)	
53	7	Brassicaceae (61.9%)	<i>Lotus</i> (31.4%)	<i>Baccharis</i> (3.2%)
54	6	Brassicaceae (91.7%)		<i>Lycium</i> (4.4%)
55	7	Brassicaceae (87.5%)		<i>Lycium</i> (9.0%)

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 3.3** Cantidad y distribución de los tipos polínicos identificados en las muestras pertenecientes a **Médanos**. El fondo blanco indica el período de muestreo de febrero a abril de 2014 y el fondo coloreado el período de noviembre de 2014 a mayo de 2015. TP: tipos polínicos.

Número de muestra	Cantidad TP	Polen Dominante	Polen Secundario	Polen de menor importancia
29	6	<i>Condalia microphylla</i> (56.9%)	<i>Styphnolobium japonicum</i> (31.3%)	Brassicaceae (11.0%)
30	6	Brassicaceae (61.7%)	<i>Schinus</i> (21.1%)	Asteraceae (15.7%)
31	6	<i>Schinus</i> (50.2%) - Brassicaceae (47.8%)		
32	5	Brassicaceae (60.4%)	<i>Schinus</i> (37.6%)	
33	4	Brassicaceae (92.0%)		<i>Schinus</i> (6.9%)
38	6	<i>Eucalyptus</i> (49.4%)	Brassicaceae (37.7%)	<i>Vicia</i> (11.9%)
39	3	<i>Eucalyptus</i> (96.7%)		
40	5	<i>Eucalyptus</i> (89.8%)		<i>Schinus</i> (6.7%)
41	5	<i>Eucalyptus</i> (86.8%)		<i>Schinus</i> (7.3%) - Brassicaceae (4.3%)
42	6	<i>Schinus</i> (56.9%)	Brassicaceae (31.3%)	<i>Styphnolobium japonicum</i> (11.0%)
43	11		Brassicaceae (34.2%) - Liliaceae (31.9%) - <i>Schinus</i> (22.5%)	<i>Centaurea</i> (6.0%)
44	7	Brassicaceae (90.1%)		<i>Schinus</i> (5.6%)
63	2	Brassicaceae (96.0%)		Astereae (4.0%)

Fuente: Elaboración propia.



**Tabla 3.4** Cantidad y distribución de los tipos polínicos identificados en las muestras pertenecientes a **Viedma**. El fondo blanco indica el período de muestreo de diciembre de 2013 a marzo de 2014 y el fondo coloreado de octubre a diciembre de 2014. TP: tipos polínicos

Número de muestra	Cantidad TP	Polen Dominante	Polen Secundario	Polen de menor importancia
25	11		<i>Tamarix</i> (37.8%) - Brassicaceae (27.5%)	<i>Eucalyptus</i> (10%) - <i>Trifolium</i> (7.4%) - <i>Melilotus</i> (6.3%) - <i>Adesmia</i> (3.3%) - <i>Plantago</i> (3.2%)
26	14		<i>Galega</i> (38.6%) - <i>Melilotus</i> (22.4%) - <i>Eucalyptus</i> (20.4%)	Brassicaceae (7.6%) - <i>Plantago</i> (4.8%)
27	8	Brassicaceae (73.4%)	<i>Melilotus</i> (18.9%)	Amaranthaceae (4.0%)
56	4	Brassicaceae (98.5%)		
57	5	Brassicaceae (91.1%)		NN (7.2%)
58	4	Brassicaceae (97.7%)		
59	4	Brassicaceae (94.6%)		
60	7	Brassicaceae (75.3%)		<i>Tamarix</i> (14.8%) - <i>Salix</i> (8.3%)
61	11	<i>Trifolium</i> (47.1%)		<i>Adesmia</i> (15.0%) - Brassicaceae (14.7%) - <i>Tamarix</i> (7.8%) - <i>Melilotus</i> (4.1%) - <i>Condalia microphylla</i> (3.8%) - <i>Vicia</i> (3.6%)
62	12	<i>Tamarix</i> (48.8%)	<i>Eucalyptus</i> (33.3%)	Brassicaceae (7.6%) - <i>Melilotus</i> (4.2%)

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 3.5** Cantidad y distribución de los tipos polínicos obtenidos durante marzo y abril de 2014 en las muestras pertenecientes a **Villalonga** (muestra 34) y **J. Arauz** (muestras 35 y 36). TP: tipos polínicos

Número de muestra	Cantidad TP	Polen Dominante	Polen Secundario	Polen de menor importancia
34	6	Brassicaceae (90.1%)		<i>Tamarix</i> (4.7%) - <i>Melilotus</i> (4.1%)
35	7	Brassicaceae (65.4%)	Liliaceae (21.3%)	Astereae (6.1%) - <i>Eucalyptus</i> (5.4%)
36	5	Brassicaceae (90.7%)		<i>Schinus</i> (7.4%)

Fuente: Elaboración propia.



Considerando la totalidad de los sitios de muestreo puede apreciarse una variabilidad importante en la cantidad de los tipos polínicos encontrados; siendo la muestra 63 (correspondiente a la localización de Médanos) la menos variable con solo dos tipos polínicos mientras que la muestra número 9, perteneciente al apiario de H. Ascasubi, contiene 15. Esta variación está relacionada con la fecha en que fueron recolectadas las muestras y la época de floración de las especies que se ubican en las inmediaciones de los respectivos apiarios. Particularmente la muestra número 63 fue recolectada en la primera quincena de mayo, época del año en la que se encuentra escasa vegetación en flor en esta región geográfica.

En general puede observarse que la mayoría de los tipos polínicos identificados corresponden a taxones descritos en las correspondientes zonas fitogeográficas. También existe coincidencia con los taxones encontrados en los diferentes trabajos de Andrada [39,40] en los meses correspondientes. Es relevante señalar que muchas de las especies mencionadas en la descripción de las ecorregiones florecen en la primavera [39] y, al respecto, este período del año se contempla mayormente en el sitio de muestreo correspondiente a Viedma.

Se observa un predominio de los tipos pertenecientes a los taxones **Brassicaceae** (82%), **Eucalyptus** (38%) y **Lotus** (40%); con la particularidad que los dos primeros están presentes en todos los sitios de muestreo, en cambio, el último solo puede encontrarse en el apiario de H. Ascasubi.

La familia de las Brasicáceas incluye tanto especies hortícolas como forrajeras, aunque algunas son consideradas malezas. Se hará referencia a las características de este grupo en cada sitio de muestreo. *Lotus* es un género perteneciente a la familia de las Fabáceas que agrupa diferentes especies forrajeras de sumo interés para los productores agropecuarios [22,41]. Se describirá con más detalle en el apartado 3.4.1.

Por otra parte, el género *Eucalyptus*, comprendido dentro de la familia de las Mirtáceas, fue introducido en Argentina desde Australia a fines del siglo XIX como forestal. La mayoría de las especies de este género poseen porte arbóreo, razón por la cual actualmente integra cerca del 30% de la superficie de los bosques cultivados en el territorio nacional. Además, se le asigna una importancia económica-comercial relacionada a la producción de maderas [42]. Asimismo, muchas de las especies tienen una gran importancia apícola debido a que sus flores (Figura 3.16.a) son una fuente importante de néctar y de polen. Los periodos de floración son muy variables en cuanto a fechas, concentración y producción de néctar y polen. Si bien esta



situación está relacionada principalmente con la especie, también influyen las condiciones climáticas [43].

Dentro de cada muestra, la diversidad de los tipos polínicos encontrados puede relacionarse con la clasificación del polen obtenido en el correspondiente apiario. En este sentido se advierte que la mayoría de las muestras analizadas pueden clasificarse como multiflorales aunque existe la posibilidad de obtener polen monofloral en algunos sitios y en determinadas fechas como se detalla más adelante.

Por otra parte, no se puede realizar comentarios sobre ninguna normativa ya que en el artículo 785 del CAA no se hace referencia alguna a análisis entomopalinológicos, solo se hace alusión a “análisis microscópicos” (sin especificar aspectos técnicos) mencionando al respecto que los pólenes con “anormalidades en la observación microscópica” no serán aptos para el consumo humano [44]. A nivel internacional Campos y col. [7] definen mejor este concepto y lo incluyen dentro de los criterios de calidad que debieran estandarizarse. En primera instancia consideran que se debe evitar la presencia de ácaros, insectos o impurezas como propóleos, cera o residuos provenientes de plantas o de suelo; concepción vinculada estrictamente al proceso de limpieza. Sin embargo, en este mismo análisis, expresan la necesidad de conocer el origen botánico y, particularmente, el porcentaje del taxón o de los taxones más representados a través del método de Louveaux y col. [34]; aunque también contemplan el uso de HPLC/UV para alcanzar el mismo objetivo.

En cuanto a la mencionada técnica de Louveaux es necesario considerar que además del tiempo empleado, es imprescindible la experiencia de un experto en palinología [26,27]. En los últimos años se han propuesto técnicas de automatización para simplificar esta metodología; por ejemplo Holt y col. [28] describen un “sistema holístico” (hardware y software) basado en el empleo de robótica, procesamiento de imágenes y tecnología de redes neuronales para ubicar, captar la imagen y clasificar polen en un extendido. Además, hay sugerencias para poder determinar los grupos de plantas visitadas por las abejas (para la obtención de polen apícola) a través de la determinación de un perfil de flavonoides por HPLC [30].

Hasta el momento no existe una normativa que permita establecer la clasificación del polen de abeja (mono o multifloral), es decir, no hay un acuerdo establecido sobre el valor del porcentaje que debería tener el tipo polínico más representado. Esta situación se observa tanto en el territorio nacional como a nivel internacional. Al respecto solo se pudo encontrar cierta



especificación (aunque no coincidente) en los trabajos realizados por Campos y col. [7] y Freitas y col. [10] quienes utilizaron valores de 80% y de 90% respectivamente. Asimismo, en ambos casos, no se justifica el criterio utilizado. En este sentido tal vez debería considerarse una amplia discusión para definir un correcto valor de corte.

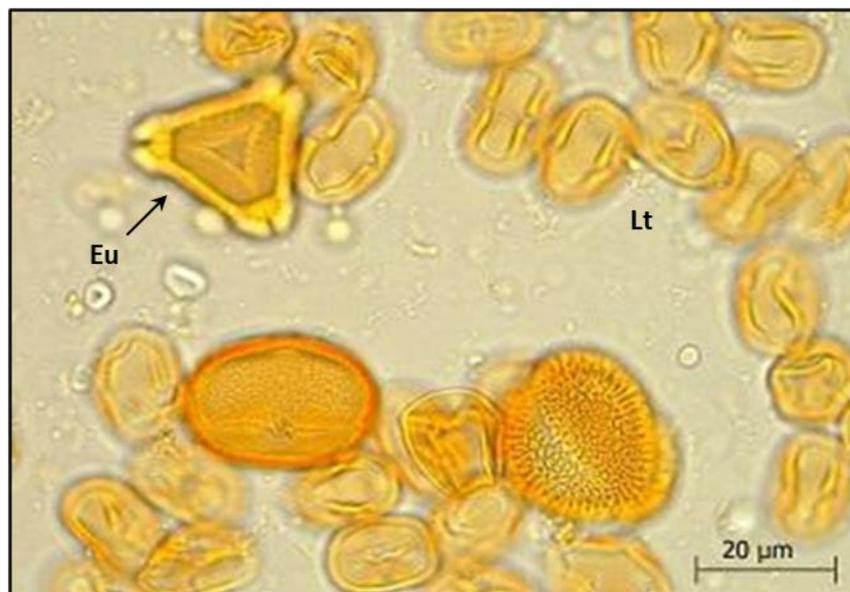
Uno de los puntos a discutir se basa en el criterio tomado por Louveaux y col. [34] para clasificar las mieles desde el punto de vista palinológico (metodología más consensuada a nivel internacional). En general se considera como monofloral a la miel que presenta una frecuencia de clases de más del 45% (definido como “polen dominante” por estos autores). Como la presencia de granos de polen en la miel (y por ende el porcentaje de representación) depende de varios factores, existen algunas excepciones para considerar en este análisis cuantitativo. Si dentro de los factores mencionados se pone especial atención a la capacidad de una planta de producir más o menos polen en sus flores, como así también al tamaño y forma del grano de polen producido, se puede hablar de pólenes sub o sobrerrepresentados. En el primer caso se puede mencionar las mieles de algunos cítricos (*Citrus* sp.) o de alfalfa (*Medicago sativa*) en las que se considera un porcentaje composicional de entre 10% y 20% para que sean clasificadas como tal, mientras que en el caso de las mieles monoflorales con pólenes sobrerrepresentados se encuentra la miel de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) con una frecuencia de representatividad del 70%. Estos mismos ejemplos (entre otros) son los establecidos en la normativa argentina para la tipificación de mieles (Res. 274/95) [45].

Por otra parte, Chile también presenta una normativa oficial para la clasificación de las mieles producidas en el vecino territorio. La NCh 2981 Of. 2005 plantea los criterios para la denominación de origen botánico mediante ensayo melisopalínológico y, al igual que en nuestro país, el valor de corte para considerar a una miel como monofloral es de 45%. Pero en esta normativa, a diferencia de la argentina, se contempla la posibilidad de clasificar una miel como “bifloral” si en su composición polínica se encuentra polen de dos especies, ambas mayor o igual al 45% y en proporción similar, con una diferencia menor al 5% [46].

En relación al análisis entomopalínológico, si bien la legislación nacional no contempla una normativa similar para la clasificación de polen, debería considerarse algún criterio semejante al utilizado para la miel, basado principalmente en la gran variabilidad que existe en el tamaño de los granos de polen (desde 4 hasta 250  $\mu\text{m}$ ) [1] y cómo se distribuyen en el preparado que será observado al microscopio. Para discernir entre los criterios de Campos y col.[7] y Freitas y col. [10] y, para el caso particular de los taxones encontrados en las muestras analizadas en



este trabajo de tesis (considerando los de mayor representación), se podría aplicar este razonamiento a los pólenes correspondientes a los taxones de *Eucalyptus* sp. y *Lotus* sp. (Figura 3.11), los cuales, debido a su pequeño tamaño, deberían evaluarse como sobrerrepresentados (más allá de las características biológicas y/o fisiológicas de las flores de estos géneros). Tal vez en estos casos sería más razonable considerar el valor de corte más alto (90%) para poder establecer la clasificación como monofloral y para el resto de los taxones se podría considerar el valor de 80%. Asimismo, sería interesante incluir la condición de **bifloral** en aquellas muestras que presenten dos especies, ambas con un valor de al menos 45% y con una diferencia entre ellas inferior al 5%.



**Figura 3.11.** Fotografía obtenida con la cámara del microscopio Leica ICC50E (100x). Tamaño comparativo de los tipos polínicos *Eucalyptus* sp. (Eu) y *Lotus* sp. (Lt). Fuente: Propia.

Con el fin de cumplir con uno de los objetivos planteados en este trabajo de tesis (determinar la clasificación del polen obtenido en los diferentes sitios de muestreo) y, ante la ausencia de una normativa nacional para discernir al respecto, se considerará cada caso en particular. Para ello se tomará en cuenta el criterio expresado en el párrafo anterior. Al final de esta sección se presentará una tabla donde se resuman los resultados de la clasificación de cada muestra (Tabla 3.6).



Tal como se expresó anteriormente el propósito del presente capítulo es determinar el origen floral de las muestras de polen analizadas para relacionarlas con sus características físico-químicas. Al igual que en el caso de la miel (Res. 274/95), la definición del concepto monofloral estará finalmente determinado al relacionar los resultados entomopalinológicos logrados en este capítulo con los valores de los diferentes parámetros físico-químicos obtenidos en los capítulos siguientes. También sería importante realizar una evaluación sensorial que no ha sido contemplado en esta tesis. Se considera la posibilidad de incorporar las características sensoriales en el futuro inmediato.

Planteada la discusión general se procederá a analizar los resultados obtenidos en cada sitio de muestreo.

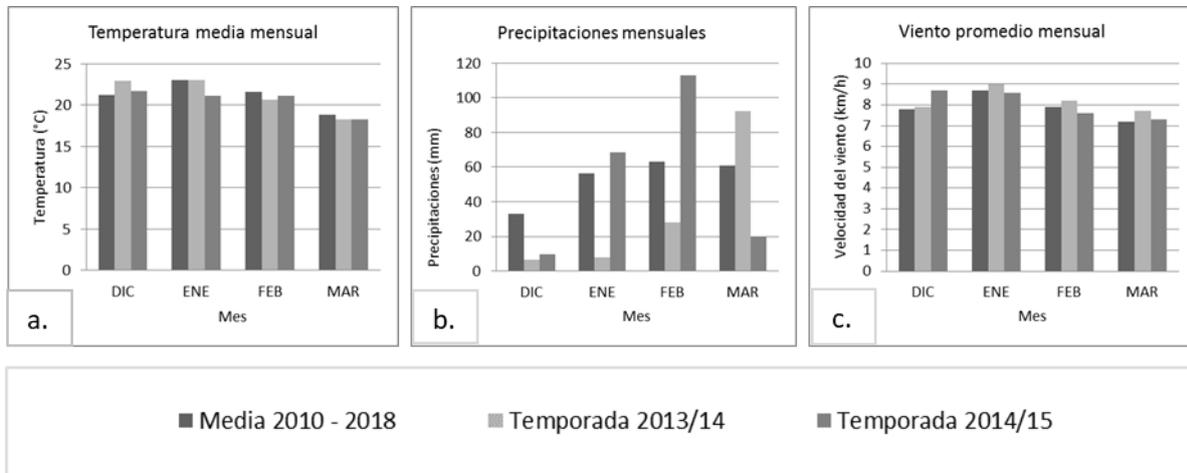
### 3.4.1 H. Ascasubi

Según el porcentaje de aparición (considerando las tres categorías) se destacan los tipos polínicos *Lotus sp.* (83,3%), **Brassicaceae** (70,8%) y *Eucalyptus sp.* (41,6%). Cualquiera de estos taxones se encuentra mayormente como PD o PS; inclusive los dos primeros, generaron la posibilidad de clasificar algunas muestras como monoflorales (siete de las veinticuatro) considerando el criterio discutido anteriormente (Tabla 3.6).

Como puede observarse en la tabla 3.2 existe una marcada diferencia en la cantidad de tipos polínicos encontrados en cada temporada. En la **primera** de ellas (muestras 1 a 12 y muestra 37) se advierte mayor diversidad (entre siete y 15) respecto a la temporada siguiente (tres a siete). Asimismo, también se destaca la obtención de mayor cantidad de muestras monoflorales en la segunda temporada (muestras 45 a 55). Estas diferencias probablemente se relacionen con una variabilidad climática debido a que las temperaturas, precipitaciones y viento influyen tanto en la flora como en el trabajo de pecoreo de las abejas [39]. En la figura 3.12 se muestran los gráficos que representan los datos obtenidos en la propia estación meteorológica de la EEA. Como se puede observar no hubo diferencias entre ambas temporadas respecto a la temperatura media (Figura 3.12.a) y a la velocidad del viento (Figura 3.12.c), pero sí se puede percibir una gran discordancia en las precipitaciones (Figura 3.12.b), parámetro que afecta directamente la disponibilidad de la flora apícola. En base a ello se podría asumir que la diferencia existente



(tanto en la cantidad como en la calidad del polen) entre ambos períodos de muestreo podría deberse a una mayor precipitación en la segunda temporada respecto a la primera.



**Figura 3.12.** Representación gráfica de los parámetros meteorológicos correspondientes al sitio de H. Ascasubi: **a.** temperatura media mensual (°C), **b.** precipitaciones mensuales (mm) y **c.** velocidad promedio mensual del viento (km/h). Fuente: Elaboración propia en base a los datos obtenidos de la estación meteorológica automática (EMA) Davis Pro II ubicada en la EEA INTA H. Ascasubi.

En cuanto a los taxones más representativos de la primera temporada se destaca la presencia de *Brassicáceas* en la totalidad de las muestras (100%), mayormente como PS. En este período de recolección solo se obtuvo una muestra monofloral (muestra 37) correspondiente a la mencionada familia. El segundo taxón destacado es *Lotus* sp. (84,6%), también predominantemente como PS, aunque ninguna muestra logró calificarse como monofloral. Finalmente, un poco más de la mitad de las muestras (53,8%) contienen el tipo polínico correspondiente al género *Eucalyptus*, siendo este el tercero en importancia en lo que respecta a frecuencia de aparición. La presencia de estos taxones no sorprende debido a la existencia de varias especies pertenecientes a los respectivos géneros o familia dentro del predio de la EEA y en chacras aledañas.

Incluido en el grupo PS de la primera temporada también se encontró una muestra (número 10) con el tipo polínico característico de la familia *Liliaceae*. Es muy probable que esto sea debido a la floración de alguna plantación de cebolla (*Allium cepa*: principal hortícola cultivada en el valle bonaerense del río Colorado) que puede florecer entre los meses de noviembre a febrero según las condiciones climáticas y el manejo utilizado [47].

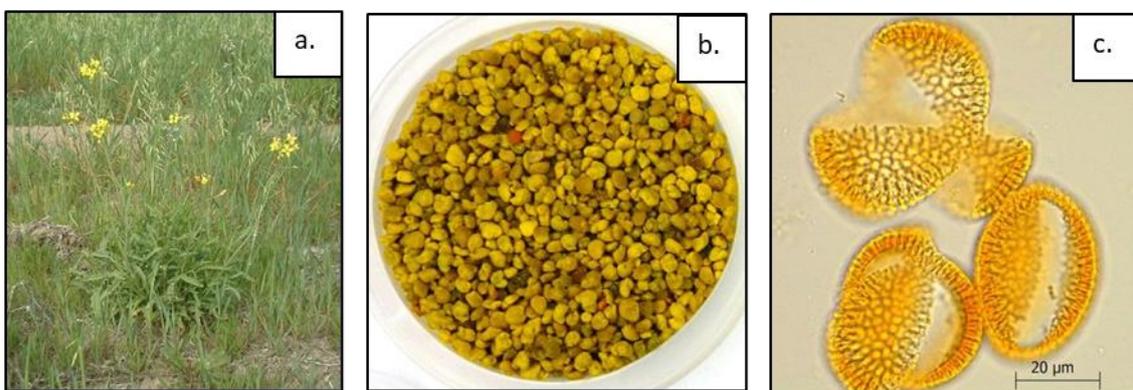
Considerando los pólenes menos representados (incluidos en el grupo de los PM) se han encontrado otros taxones como *Lycium*, *Lamium*, *Plantago* y *Tamarix*. En algunas muestras



aisladas se hallaron tipos pertenecientes a los géneros *Melilotus* y *Centaurea*, como así también representantes polínicos de las tribus Astereae y Heliantheae.

Con respecto a la **segunda temporada** se distingue el género *Lotus* en la mayoría de las muestras (81,8%). Su porcentaje de representación es muy alto (mayor al 90%) en las muestras 45 (Figura 3.14.b y c), 47, 50 y 51 lo que permite clasificarlas como monoflorales según el criterio asumido en este trabajo de tesis (Tabla 3.6). Asimismo, el taxón Brassicaceae solo se observa en cuatro de las muestras (52 a 55) correspondientes a los muestreos realizados entre fines de febrero y mediados de marzo de 2015. Las dos últimas muestras de esta temporada pueden clasificarse como monoflorales de Brasicáceas (Tabla 3.6), y asignarlas a *Diplotaxis tenuifolia*, vulgarmente conocida como “flor amarilla” (Figura 3.13.b y c). Esto es debido a que es la única especie que puede encontrarse en flor en esta zona en la mencionada época del año y además es el período en que su floración es más abundante [48].

*D. tenuifolia* (Figura 3.13.a) es una planta originaria de Europa que fue introducida en esta zona de Argentina en 1923 como planta melífera; sin embargo, en la actualidad se considera una maleza invasora perenne que ha cubierto una gran extensión de la zona sur de la región pampeana. Florece desde fines de agosto hasta mayo [49]. Tiene un importante protagonismo como flora apícola debido a que la abeja la utiliza como fuente de néctar y de polen; aún más, en los partidos de Villarino y Patagones es muy común la obtención de mieles monoflorales de esta especie. Desde el punto de vista melisopalinológico la asociación de los tipos polínicos *D. tenuifolia*, *Eucalyptus* sp. y *Centaurea* sp. se considera “marcador geográfico” de las mieles producidas en el S.O. bonaerense [5,50,51].

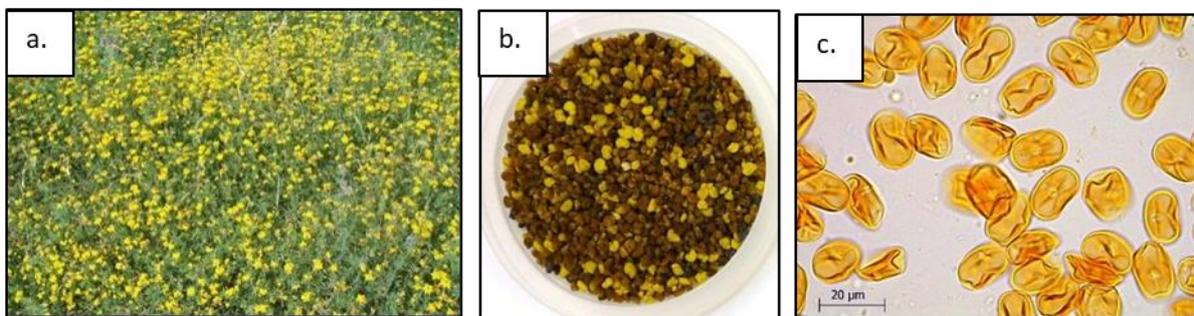


**Figura 3.13.** *Diplotaxis tenuifolia*, a. planta en flor; b. muestra 54 (monofloral de esta especie) y c. fotografía de granos de polen obtenida con la cámara del microscopio Leica ICC50E (100x). Fuente: Propia.



Por otra parte, el género *Lotus* incluye más de 180 especies distribuidas en todo el mundo. Originario de Eurasia, específicamente de la cuenca del Mediterráneo, se cree que su ingreso a la Argentina fue accidental a causa de la mezcla con otras semillas o en las heces de animales traídos de Europa [52]. Las especies de importancia agronómica (uso como forraje) poseen reproducción sexual que depende mayormente de la polinización cruzada, generalmente por insectos (entomófila). Se adaptan muy bien a ambientes templados y húmedos, como así también a suelos ácidos o salinos. Su crecimiento es primavera estivo-otoñal con latencia invernal. En esta zona se destacan tanto *L. corniculatus* como *L. tenuis* [22,52,53], siendo el primero el que predomina en los alrededores del apiario en cuestión (Figura 3.14.a). La prevalencia de este género en la segunda temporada podría atribuirse a la mayor precipitación ocurrida en el transcurso de todo el año 2015 con respecto al 2014.

Entre los más representados de la segunda temporada, se encuentra nuevamente al género *Eucalyptus*, aunque en menor porcentaje (36,4%) respecto a la temporada anterior. Por otra parte, entre los tipos polínicos de menor importancia (PM) aparecen los géneros *Baccharis* y *Lycium*.



**Figura 3.14.** a. Planta en flor de *Lotus corniculatus* tomada en la EEA INTA H. Ascasubi. b. Muestra 45 (monofloral de *Lotus* sp.). c. Fotografía de granos de polen de *Lotus* sp. obtenida con la cámara del microscopio Leica ICC50E (100x). Fuente: Propia.

### 3.4.2 Médanos

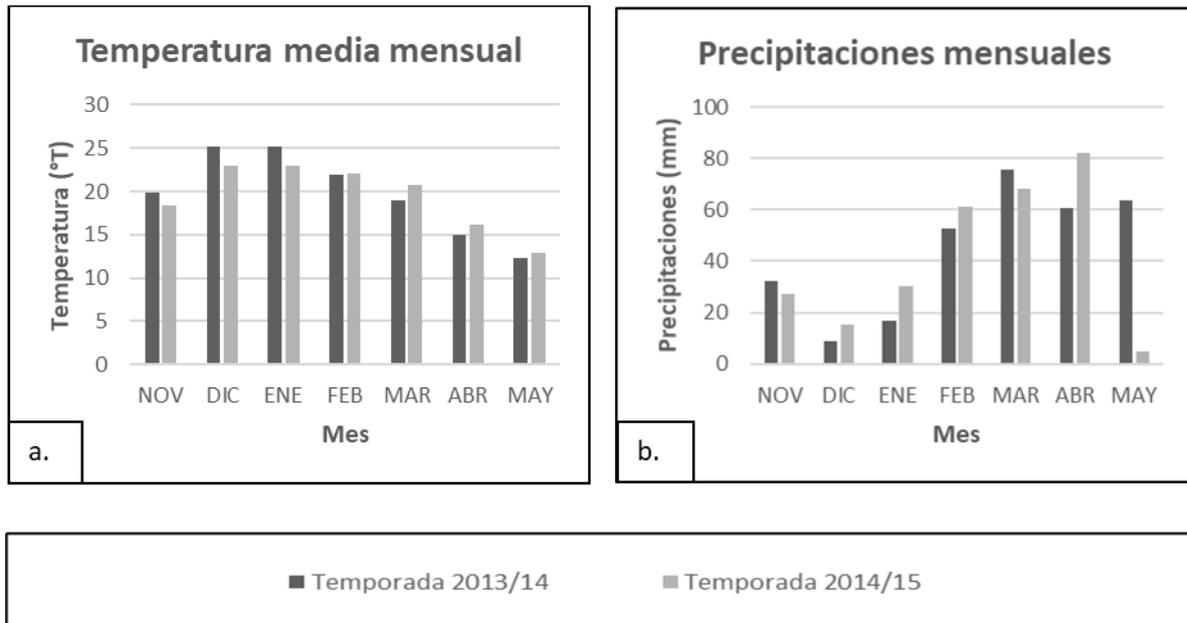
Los taxones más representados en estas muestras son **Brassicaceae** (84,6%), **Schinus sp.** (69,2%) y **Eucalyptus sp.** (30,7%) con una marcada diferencia en la frecuencia de aparición en cada temporada. Respecto a la cantidad de tipos polínicos es bastante similar (entre cinco y siete en promedio) en los dos períodos de tiempo considerado, excepto por las muestras 43 y



63 que contienen la mayor (11) y la menor (dos) cantidad respectivamente. Aun así, se obtuvo un número mayor de muestras monoflorales en la segunda temporada apícola respecto de la primera (Tabla 3.6).

Es relevante aclarar que los dos períodos considerados, si bien se presentaron como dos temporadas apícolas diferentes, no contemplan exactamente los mismos meses de muestreo. Es decir, las muestras obtenidas en la **primera temporada** se obtuvieron entre los meses de febrero a abril (de 2014) y las de la temporada siguiente se recolectaron desde noviembre (2014) a mayo (2015). Por esta razón la variabilidad de los tipos polínicos entre temporadas encontrados en este sitio está afectada principalmente por la ampliación en los meses de muestreo del segundo período más allá de las posibles diferencias en los factores climáticos. Igualmente se presentan los respectivos gráficos con los datos de temperatura media mensual (Figura 3.15.a) y precipitaciones mensuales (Figura 3.15.b). Lamentablemente no se pudo contar con los datos de viento medio mensual debido a que el anemómetro estuvo averiado los primeros meses del año 2014. En este caso los datos mencionados corresponden a la estación meteorológica automática de INTA ubicada en una localidad vecina de Médanos (40 km de distancia) denominada Algarrobo.

En las muestras de la **segunda temporada** se destacan los tipos Brassicaceae (75%), *Schinus* sp. (62,5%) y *Eucalyptus* sp. (50%). Si bien este último solo se encontró en cuatro de las muestras, el alto porcentaje de representación alcanzado en dos de ellas permite calificarlas como monoflorales como se detalla más adelante. Asimismo, dos de las últimas muestras obtenidas en esta temporada (44 y 63) también se clasifican como monoflorales, aunque de Brassicaceae. En cuanto a *Schinus* sp. (Fig. 3.17.c), al igual que en la temporada anterior, se observó en varias de las muestras y en los diferentes grupos de clasificación. Dentro del grupo PS se observó a elementos de la familia de las Liliáceas que, en este sitio de muestreo, no se puede vincular a cultivos de cebolla como en el sitio anterior. Finalmente, otros tipos polínicos encontrados en este período de muestreo, aunque dentro del grupo PM, se encuentran *S. japonicum*, *Vicia* sp., *Centaurea* sp. y Asteraceae.



**Figura 3.15.** Representación gráfica de los parámetros meteorológicos relacionados al sitio de Médanos: **a.** temperatura media mensual (°C) y **b.** precipitaciones mensuales (mm). Fuente: Elaboración propia en base a los datos obtenidos de la estación meteorológica automática (EMA) Davis Pro II ubicada en la localidad de Algarrobo (vecina a Médanos).

En relación al total de las muestras analizadas en este sitio, se observa tres muestras con porcentajes mayores al 90% de Brasicáceas pudiendo considerar a las mismas como monoflorales (incluso excediendo en un 10% el valor de corte considerado para este caso). En base a la fecha en la que éstas fueron obtenidas, se puede atribuir el polen en cuestión a *D. tenuifolia* (“flor amarilla”) ya que es la principal especie de esta familia que se encuentra florecida a fines de febrero (muestra 44) y hasta abril (muestra 33) o, inclusive, hasta principios de mayo (muestras 63), según las condiciones climáticas [49]. Como se comentó anteriormente las mayores precipitaciones en la segunda temporada favorecieron la disponibilidad de las flores de esta especie para las abejas. Por lo antedicho consideramos que se obtuvo polen de “flor amarilla” sobre el final de la temporada apícola en ambos períodos de muestreo.

Por otra parte, en base al criterio desarrollado al inicio de esta sección, se obtuvieron dos muestras monoflorales de *Eucalyptus* sp. (39 y 40) (Figura 3.16.b y c). En este caso la presencia de este taxón se debe a la fecha de recolección de las mismas (mes de diciembre) más allá de la diferencia en las precipitaciones. Es relevante resaltar que esta fecha no fue incluida en el muestreo de la primera temporada (Tabla 3.6). En el caso particular de la muestra 40 se considera que el resultado obtenido (89,8%) es prácticamente el valor de corte asumido en el



mencionado criterio (90% para este género). La posibilidad de obtener “polen de *Eucalyptus*” específicamente en esta zona geográfica se condice con la existencia de mieles monoflorales del mismo taxón como consecuencia de la amplia distribución de este género vegetal en la región [51,54].



**Figura 3.16.** *Eucalyptus* sp. a. planta en flor; b. muestra 39 (monoforal de *Eucalyptus* sp) y c. fotografía de granos de polen característicos obtenida con la cámara del microscopio Leica ICC50E (100x). Fuente: Propia.

El género *Schinus* pertenece a la familia Anacardiaceae y varias de las especies pertenecientes a él han sido descritas en esta zona fitogeográfica. *S. fasciculatus* y *S. johnstonii* son de origen nativo y suelen florecer desde mediados de agosto hasta mediados de octubre. Cabe destacar la presencia de *S. areira* (“aguaribay”), especie nativa del Norte de Argentina (provincias fitogeográficas de la Prepuna y Chaqueña), que es muy cultivado en la región como ornamental en veredas, plazas e incluso en establecimientos rurales, y presenta una floración escalonada desde noviembre a junio (Figura 3.17.a y b). En general son muy visitados por las abejas debido a la provisión tanto de néctar como de polen [5,40].



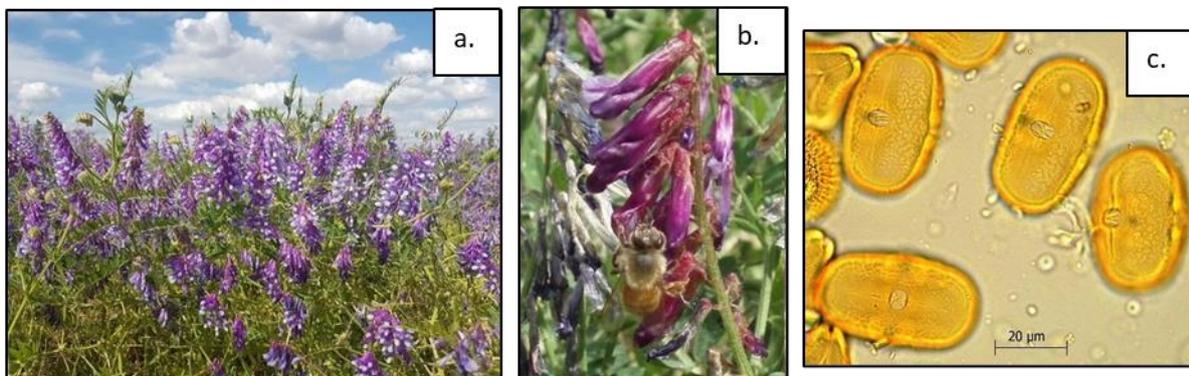
**Figura 3.17.** *Schinus areira* a. porte arbóreo de la planta; b. detalle de la inflorescencia y c. fotografía del grano de polen correspondiente a *Schinus* sp. obtenida con la cámara del microscopio Leica ICC50E (100x). Fuente: Propia.



*Styphnolobium japonicum* pertenece a la familia Fabaceae; es una especie leñosa, de origen exótico, que generalmente se encuentra rodeando las instalaciones de las chacras, o bien se la utiliza como protección del ganado (sombra) y como ornamental [50]. Suele encontrarse en flor entre los meses de diciembre a febrero [49] y ya ha sido reportada por Valle y col. [51] y Gallez y col. [54] como recurso melífero en el suroeste bonaerense.

*Condalia microphylla* (“piquillín”) es un arbusto endémico de Argentina presente en el monte xerófilo del sur de la provincia de Buenos Aires. Como representante de la familia de las Ramnáceas es un arbusto espinoso y suele florecer desde mediados de noviembre hasta fines de enero, sin embargo, en algunas ocasiones se ha observado a campo que la floración se ha extendido hasta febrero. Asimismo, es una importante planta melífera, una de las principales fuentes de polen y néctar de la región meridional del Espinal. Se ha encontrado en la totalidad de las mieles de esta región y origina un alto porcentaje de mieles monoflorales [5].

En la muestra número 38 se encontró polen de *Vicia sp.* como único representante del grupo PM (Figura 3.18.c). Perteneciente a la familia Fabaceae, muchas de sus especies fueron introducidas al país en el siglo pasado como forrajeras. Actualmente las “vicias” constituyen una opción para la diversificación agrícola en los ambientes semiáridos. Particularmente, en el sudoeste bonaerense, *V. sativa* y *V. villosa* han tomado protagonismo a partir del 2010 debido a sus múltiples usos: producción de forraje y/o semilla (Figura 3.18.a y b), abono verde y como cultivo de cobertura [55]. Es muy común encontrar *V. villosa* en las banquinas, escapada de los cultivos. El valor apícola de este taxón se atribuye principalmente a la producción de néctar quedando evidenciado por la presencia de mieles monoflorales (extremadamente claras) de este cultivo en esta región [5,51].



**Figura 3.18.** a. Cultivo de *Vicia villosa* (producción de semilla). b. Abeja libando inflorescencia de *V. villosa*. c. Fotografía de granos de polen correspondientes a *Vicia sp.* obtenida con la cámara del microscopio Leica ICC50E (100x). Fuente: a y b. gentileza de Juan Pablo Renzi Pagni (Producción vegetal EEA INTA H. Ascasubi); c. propia.



### 3.4.3 Viedma

En este sitio se destaca el tipo **Brassicaceae** en todas las muestras (100%). En menor escala se aprecia la presencia de los géneros *Tamarix* (40%) y *Eucalyptus* (30%). También se observa una amplia variabilidad en lo que respecta a la cantidad de tipos polínicos en ambas temporadas: de cuatro a catorce en la primera y de cuatro a doce en la segunda. Coincidentemente con los otros sitios, se encontró mayor cantidad de muestras monoflorales en el último muestreo; en este caso todas correspondientes a la familia Brassicaceae.

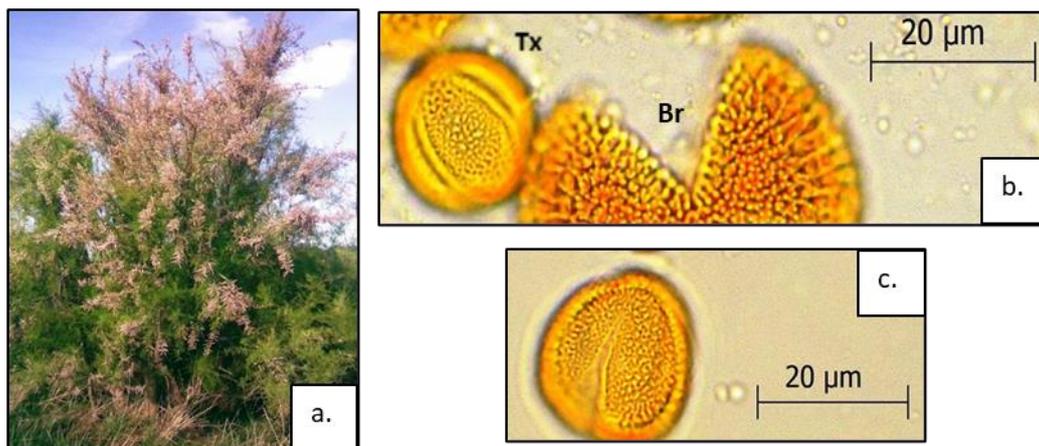
Al igual que en el sitio anterior, las dos temporadas apícolas consideradas no contemplan los mismos meses de muestreo (Tabla 3.1). En este caso la primera temporada incluye muestras de diciembre de 2013 a marzo de 2014 (período prevalentemente estival) y el segundo período solo presenta muestras de polen recolectadas entre los meses de octubre a diciembre de 2014 (época predominantemente primaveral). Esta situación puede ser la principal causa de variabilidad de los tipos polínicos hallados entre temporadas en este sitio, razón por la cual se realizará una descripción en general de los taxones encontrados con mayor representatividad. Por otra parte, y con la misma justificación, se supone que no es de utilidad la comparación de los datos meteorológicos correspondientes a ambos muestreos.

En contraste con las otras localizaciones, en este sitio, el tipo polínico identificado como Brassicaceae estuvo representado por granos de polen de dos tamaños diferentes (excepto la muestra 56), lo que indica la presencia de distintas especies. Esto puede explicarse debido a que, salvo por la mencionada muestra obtenida en el mes de marzo, las restantes fueron recolectadas en los meses de octubre a diciembre, período en el cual florecen diferentes taxones pertenecientes a la misma familia. Como referencia de algunos de ellos se puede mencionar los vulgarmente conocidos como “nabos” (*B. rapa* y *B. napus*) y como “mostacillas” (*Rapistrum rugosum* e *Hirschfeldia incana*) entre otros. Dado que la familia Brassicaceae es una familia “estenopalínica” (los granos de polen son muy similares entre las especies), y teniendo en cuenta el objetivo de este trabajo, se decidió unificar todos los elementos con similares características bajo el tipo polínico Brassicaceae debido a que es muy difícil diferenciar entre géneros o especies. En base a lo antedicho, respecto a la clasificación, se puede concluir que es posible obtener polen monofloral de Brassicaceae durante el mes de octubre (muestras 57,58 y 59) porque se encuentran elementos con características morfológicas compatibles con este



taxón en un valor que supera el 90%. Solo en el caso de la muestra 56 puede atribuirse la clasificación de monoflora a *D. tenuifolia* (Tabla 3.6).

En este grupo de muestras también se destacan dentro de los PD los géneros *Tamarix* (Figura 3.19.b y c) y *Trifolium* (Figura 3.20.a). El primero perteneciente a la familia Tamaricaceae originaria de África y Eurasia que, al ser introducida en regiones áridas de América, ha logrado establecerse como población espontánea. Muchas de las especies comprendidas en esta familia se han naturalizado en gran parte de la Argentina. En la región habitan particularmente en la zona costera, aunque también es común verlos en las áreas hortícolas, a orillas de los cursos de agua dulce y en los taludes de las vías férreas. Asimismo, se cultiva con fines ornamentales (cerco vivo), cortina rompevientos o para sombra. Se caracterizan por un largo período de floración (Figura 3.19.a) que inicia normalmente en el mes de septiembre y suele mantenerse hasta marzo. Se observa abundantes implantaciones en las provincias de Río Negro y Chubut. Posee gran importancia apícola (especies polen-nectaríferas) pudiendo obtenerse mieles monoflorales en los valles de los ríos Negro y Colorado [5,56,57].



**Figura 3.19.** *Tamarix* sp. a. Ejemplar en floración; b. y c. fotografías de granos de polen obtenida con la cámara del microscopio Leica ICC50E (100x). Br: Brassicaceae; Tx: *Tamarix* sp. Fuente: Propia.

El género *Trifolium* (Figura 3.20.a) pertenece a la familia Fabaceae y comprende alrededor de 300 especies de las cuales solo el 10 % tiene importancia agronómica por su uso como forraje. En la zona es frecuente observar *T. repens* (“trébol blanco”), *T. pratense* (“trébol rojo”) y *T. fragiferum* (“trébol frutilla”), especies de origen europeo las dos primeras y australiano la tercera. *T. repens* es una especie naturalizada en las regiones templadas del mundo, se desarrolla en suelos fértiles e invade cultivos y caminos. Particularmente en el caso de *T. pratense*



Corbella y col. [58] observaron que las abejas visitan esta especie principalmente para coleccionar polen. En general florecen desde octubre hasta abril con un máximo en el final de la primavera [5,22].

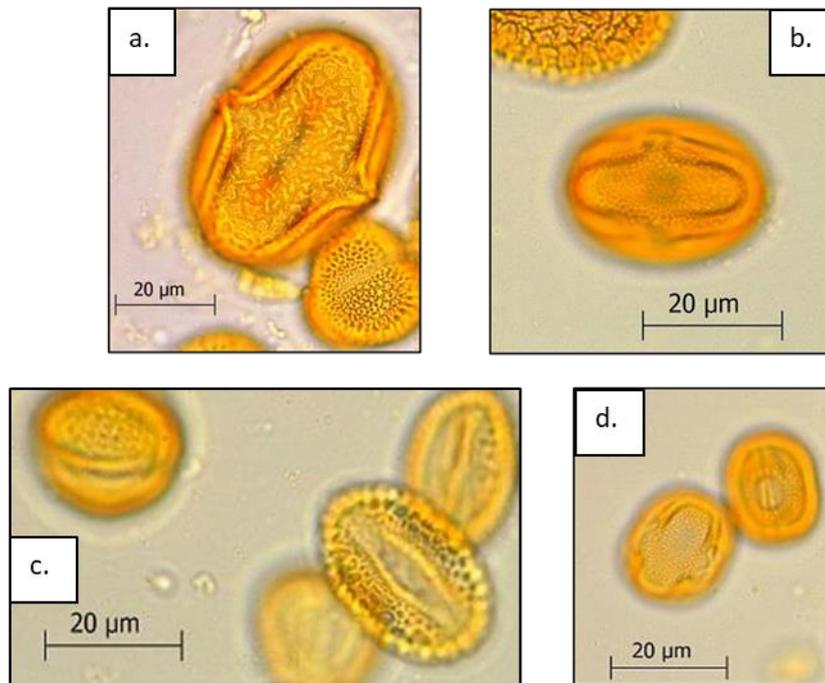
Dentro de los tipos polínicos incluidos en el grupo de PS se han encontrado elementos pertenecientes a la familia Brassicaceae y a los géneros *Tamarix*, *Galega* (Figura 3.20.d), *Melilotus* (Figura 3.20.b), *Eucalyptus*, *Adesmia* y *Salix* (Figura 3.20.c). Respecto a las especies del género *Melilotus* (popularmente conocidas como “tréboles de olor”) son originarias de Eurasia, aunque hoy están distribuidas por todo el mundo debido a su gran adaptación a una amplia gama de condiciones climáticas y edáficas. Por esta razón son consideradas una de las especies forrajeras más plásticas conocidas. Suelen florecer desde principios de noviembre hasta abril con un máximo entre diciembre y enero. Se destacan tres especies por su importancia agronómica: *M. albus*, *M. officinalis* y *M. indicus*. Todas las especies son de un importante valor apícola debido a que son fuente de néctar y de polen [5,41]. Este tipo polínico también se encontró como PS en una muestra de H. Ascasubi (número 6) y como PM en la muestra de Villalonga (número 34) zonas en las que es común observar particularmente plantas de *M. albus* en flor en el mencionado período primavero-estival.

Por el contrario, los géneros *Galega*, *Adesmia* (pertenecientes a la familia Fabaceae) y *Salix* (familia Salicaceae) solo fueron observados en este sitio de muestreo quizás en relación directa a las fechas de toma de muestras. Las especies de *Adesmia* presentan características palinológicas similares (género estenopalínico) por lo que no es posible diferenciar entre ellas. Es un taxón de origen sudamericano con una distribución que se da principalmente a lo largo de la Cordillera de los Andes. Por ejemplo, *A. candida* es endémica de Argentina y habita principalmente en las provincias fitogeográficas del Monte y Patagónica. Las especies de *Adesmia* son muy frecuentadas por las abejas para obtener mayormente el néctar, aunque también recolectan su polen [5].

En el caso de las Salicáceas se destacan cultivos de varias especies exóticas en esta área de muestreo, principalmente utilizada como cortina rompevientos en las zonas de chacras de producción frutícola. Muchas de ellas se han naturalizado en la región distribuyéndose mayormente sobre las márgenes de los ríos y solapan sus floraciones desde fines de agosto hasta fines de noviembre. Las especies de *Salix* (popularmente conocidos como mimbres y sauces) son de gran importancia apícola debido al aporte de néctar y polen conformando una de las escasas fuentes de alimento para las abejas al inicio de la temporada apícola [5]. Un



representante de este género es el “sauce criollo” (*S. humboldtiana*), especie nativa que se encuentra a lo largo de la mayor parte de los cursos de agua dulce de nuestro país.



**Figura 3.20.** Fotografías obtenidas con la cámara del microscopio Leica ICC50E (100x) que muestran los detalles morfológicos de los granos de polen correspondientes a los tipos polínicos **a.** *Trifolium* sp.; **b.** *Melilotus* sp.; **c.** *Salix* sp. y **d.** *Galega* sp. Fuente: Propia.

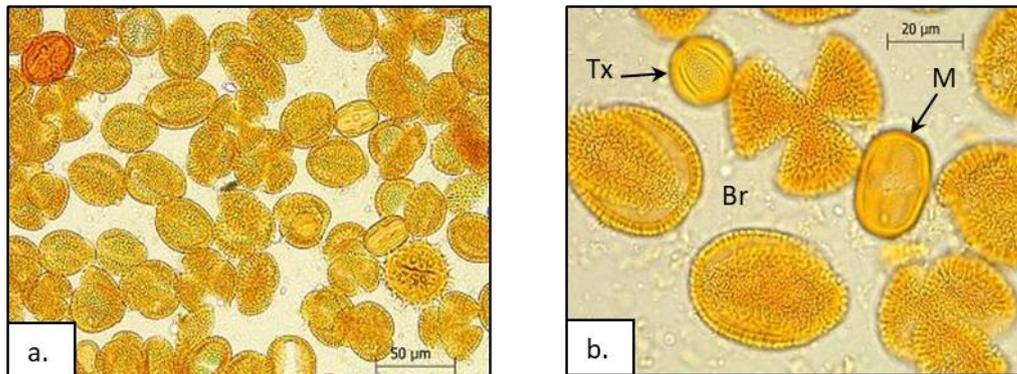
En la muestra 57 se encontró un tipo polínico denominado NN<sub>57</sub> (según se explicara en la sección 3.3.2.2) dentro de los pólenes de menor importancia. Como esta muestra se puede clasificar como monofloral de Brassicaceae se consideró innecesario identificarlo debido a su escasa representación. Asimismo, para cumplir con los objetivos generales del trabajo de esta tesis es suficiente la determinación de monofloralidad.

### 3.4.4 Villalonga

Este sitio de muestreo está representado por una única muestra (34) (Figura 3.21) obtenida de un apiario ubicado en la zona de riego del Valle Bonaerense del Rio Colorado (VBRC) donde se desarrollan mayormente producciones agrícolas y ganaderas. La misma se clasificó como monoflora de la familia Brassicaceae, y según la fecha en que fue recolectada, se puede atribuir



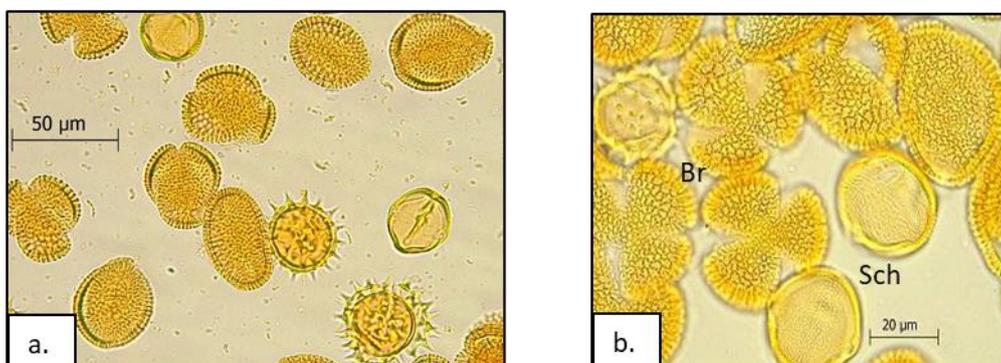
a la floración de *D. tenuifolia*, como ya se ha reportado en otras muestras de esta región obtenidas en fechas similares.



**Figura 3.21.** Fotografías de la muestra 34 obtenidas con la cámara del microscopio Leica ICC50E: **a.** principales tipos polínicos encontrados (40x); **b.** detalle morfológico (100x) de los taxones Brassicaceae (Br), *Tamarix* sp. (Tx) y *Melilotus* sp. (M). Fuente: Propia.

### 3.4.5 Jacinto Arauz

Las dos muestras que representan este sitio (35 y 36) corresponden a un único apiario del que se recolectó polen en dos fechas diferentes (Tabla 3.1). En ambos casos se destaca la presencia de la familia Brassicaceae (único taxón observado como PD) respecto de los demás taxones (Figura 3.22). Al igual que otras muestras pertenecientes a esta familia obtenidas en fechas similares en los otros sitios de muestreo, se puede afirmar que la especie responsable de la generación del polen obtenido es *D. tenuifolia*. En el caso particular de la muestra 36 (Figura 3.22.b) se puede determinar que corresponde a una muestra monofloral de “flor amarilla” en base a la fecha de obtención de la misma.



**Figura 3.22.** Fotografías de la muestra 36 obtenidas con la cámara del microscopio Leica ICC50E: **a.** Tipos polínicos encontrados (40x); **b.** detalle morfológico de la exina de los dos taxones mayoritarios (100x): Brassicaceae (Br) y *Schinus* sp. (Sch). Fuente: Propia.



### 3.4.6 Clasificación de muestras:

En la tabla 3.6 se presenta la clasificación de las muestras basada estrictamente en el análisis entomopalinológico según el criterio explicado en la sección 3.3.2.2. Asimismo, se detalla la fecha de obtención y el lugar de procedencia de cada una de ellas. También se hace referencia al origen botánico predominante (con el respectivo porcentaje) basado en los taxones que tuvieron mayor contribución (grupos PD y PS).

**Tabla 3.6** Clasificación de las muestras en base al análisis entomopalinológico según el criterio explicado en la sección 3.3.2.2. Las celdas con color de fondo corresponden a la segunda temporada de recolección. Las muestras monoflorales (Mn) se resaltan en negrita. Multifloral: Mt. Bifloral: B.

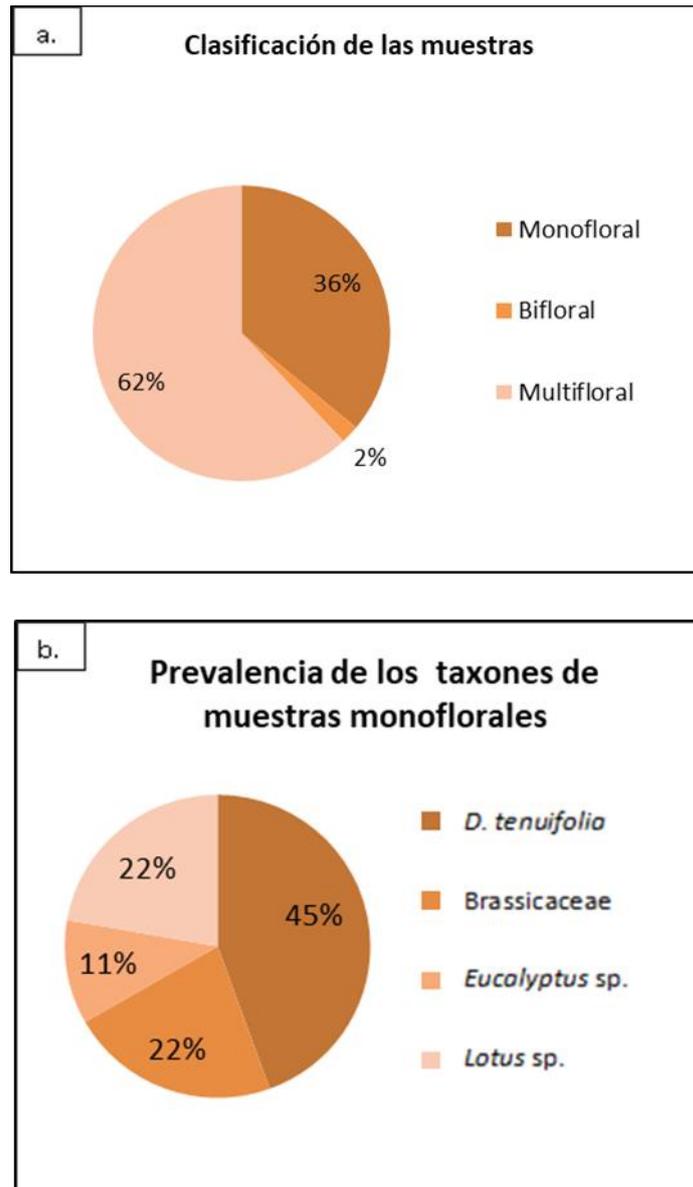
Número de muestra	Sitio de muestreo	Fecha de recolección	Clasificación	Origen botánico predominante (contribución principal: PD - PS)
37	H. Ascasubi	16/12/2013	<b>Mn</b>	<b>Brassicaceae (86%)</b>
1		13/12/13	Mt	<i>Lotus</i> (41%) - <i>Eucalyptus</i> (36%) - Brassicaceae (18%)
2		20/12/13	Mt	<i>Eucalyptus</i> (58%) - <i>Lotus</i> (23%) - Brassicaceae (18%)
3		27/12/13	Mt	<i>Lotus</i> (49%) - <i>Eucalyptus</i> (25%) - Brassicaceae (19%)
4		3/1/14	Mt	<i>Lotus</i> (41%) - Brassicaceae (27%) - <i>Eucalyptus</i> (18%)
5		10/1/14	Mt	<i>Lotus</i> (44%) - Brassicaceae (24%)
6		17/1/14	Mt	<i>Lotus</i> (63%) - Brassicaceae (18%)
7		24/1/14	Mt	Brassicaceae (70%) - <i>Lotus</i> (19%)
8		14/2/2014	Mt	Brassicaceae (38%) - <i>Lotus</i> (25%)
9		18/2/2014	Mt	<i>Lotus</i> (59%) - Brassicaceae (23%)
10		27/2/14	Mt	Brassicaceae (52%) - Liliaceae (18%)
11		7/3/14	Mt	Brassicaceae (75%)
12		13/3/2014	Mt	Brassicaceae (78%)
45		5/12/2014	<b>Mn</b>	<b><i>Lotus</i> (99%)</b>
46		12/12/2014	Mt	<i>Eucalyptus</i> (67%) - <i>Lotus</i> (30%)
47		16/12/2014	<b>Mn</b>	<b><i>Lotus</i> (99%)</b>
48		19/12/2014	Mt	<i>Eucalyptus</i> (86%)
49		27/12/2014	Mt	<i>Lotus</i> (87%)
50		8 /1/15	<b>Mn</b>	<b><i>Lotus</i> (92%)</b>
51		19/1/2015	<b>Mn</b>	<b><i>Lotus</i> (98%)</b>
52		27/2/15	Mt	<i>Lotus</i> (74%) - Brassicaceae (26%)
53		6 /3/15	Mt	Brassicaceae (62%) - <i>Lotus</i> (31%)
54		13 /3/15	<b>Mn</b>	<b>Brassicaceae (<i>D. tenuifolia</i>) (92%)</b>



55		19/3/2015	Mn	<b>Brassicaceae (<i>D. tenuifolia</i>) (88%)</b>	
29	Médanos	10/2/2014	Mt	<i>Condalia microphylla</i> (57%) - <i>Styphnolobium japonicum</i> (31%)	
30		20/3/2014	Mt	Brassicaceae (62%) - <i>Schinus</i> (21%)	
31		29/3/2014	B	<i>Schinus</i> (50%) - Brassicaceae (48%)	
32		4/4/2014	Mt	Brassicaceae (60%) - <i>Schinus</i> (38%)	
33		13/4/2014	Mn	<b>Brassicaceae (<i>D. tenuifolia</i>) (92%)</b>	
38		17/11/2014	Mt	<i>Eucalyptus</i> (49%) - Brassicaceae (38%)	
39		18/12/2014	Mn	<b><i>Eucalyptus</i> (97%)</b>	
40		27/12/2014	Mn	<b><i>Eucalyptus</i> (90%)</b>	
41		12/1/2015	Mt	<i>Eucalyptus</i> (87%)	
42		30/1/2015	Mt	<i>Schinus</i> (57%) - Brassicaceae (31%)	
43		9/2/2015	Mt	Brassicaceae (34%) - Liliaceae (32%) - <i>Schinus</i> (23%)	
44		19/2/2015	Mn	<b>Brassicaceae (<i>D. tenuifolia</i>) (90%)</b>	
63		10/5/2015	Mn	<b>Brassicaceae (<i>D. tenuifolia</i>) (96%)</b>	
25		Viedma	10/12/2013	Mt	<i>Tamarix</i> (38%) - Brassicaceae (28%)
26			7/3/14	Mt	<i>Galega</i> (39%) - <i>Melilotus</i> (22%) - <i>Eucalyptus</i> (20%)
27	25/3/14		Mt	Brassicaceae (73%) - <i>Melilotus</i> (19%)	
56	21/3/2014		Mn	<b>Brassicaceae (<i>D. tenuifolia</i>) (99%)</b>	
57	1/10/2014		Mn	<b>Brassicaceae (91%)</b>	
58	13/10/2014		Mn	<b>Brassicaceae (98%)</b>	
59	13/10/2014		Mn	<b>Brassicaceae (95%)</b>	
60	18/10/2014		Mt	Brassicaceae (75%)	
61	20/11/2014		Mt	<i>Trifolium</i> (47%)	
62	19/12/2014		Mt	<i>Tamarix</i> (49%) - <i>Eucalyptus</i> (33%)	
34	Villalonga	1/3/2014	Mn	<b>Brassicaceae (<i>D. tenuifolia</i>) (90%)</b>	
35	J. Arauz	21/3/14	Mt	Brassicaceae (65%) - Liliaceae (21%)	
36		23/4/2014	Mn	<b>Brassicaceae (<i>D. tenuifolia</i>) (91%)</b>	

Fuente: elaboración propia.

En general se puede observar que la mayoría de las muestras analizadas se clasifican como multiflorales, 18 como monoflorales y sólo una cumplió con los requisitos necesarios (según el criterio asumido) para considerarla bifloral. Esta distribución se puede apreciar gráficamente en la figura 3.23.a en base a los respectivos porcentajes. En cuanto a las muestras monoflorales la mayoría corresponden a la familia Brassicaceae (67%) siendo el 45% de las mismas asignada a *D. tenuifolia*. En orden de prevalencia el 22% corresponde al género *Lotus* sp. y solo un 11% al taxón *Eucalyptus* sp. (Figura 3.23.b).



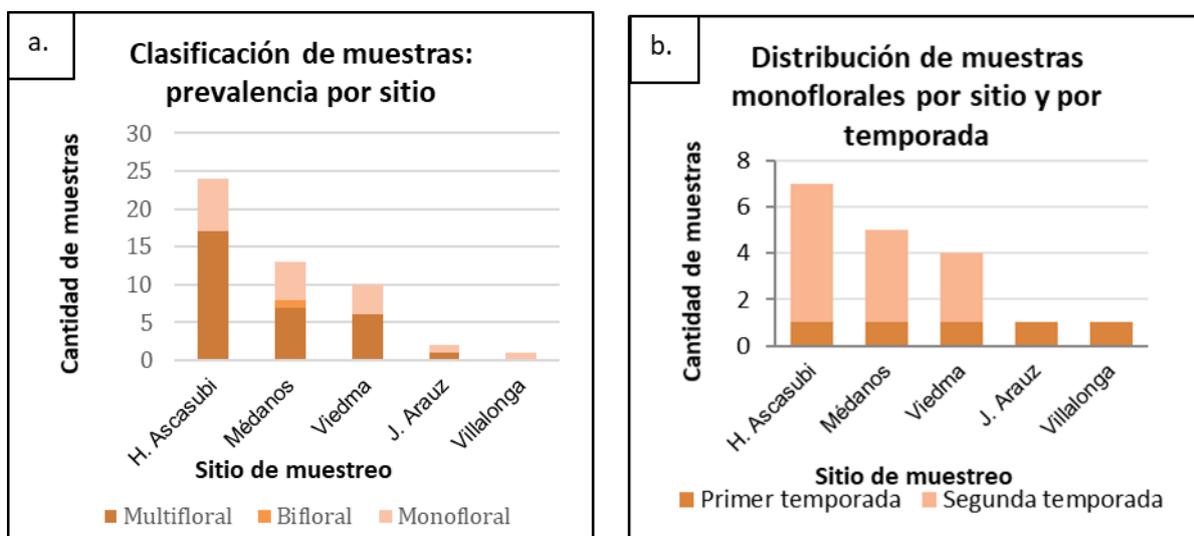
**Figura 3.23. a.** Representaciones gráficas de los porcentajes de muestras multi, bi y monoflorales. **b.** Distribución porcentual de los taxones correspondientes a las muestras monoflorales. Fuente: Propia.

En base a los resultados obtenidos se puede observar algunos casos particulares relacionados a las muestras 11, 12, 27, 60, 41, 48 y 49. Según el criterio asumido en este trabajo de tesis las mismas se clasificaron como multiflorales, pero varias de ellas poseen un tipo polínico predominante con un porcentaje cercano al valor de corte de monofloral (es decir, cercano al



80 y 90% según el taxón). Con el fin de cumplir con los objetivos planteados en este capítulo se asume la clasificación en estricta relación al análisis entomopalinológico.

Por otra parte, en la figura 3.24.a se presenta gráficamente la clasificación de las muestras analizadas y su prevalencia por sitio de muestreo y en la figura 3.24.b puede observarse la distribución de muestras monoflorales obtenidas en cada zona en las respectivas temporadas apícolas consideradas. Asimismo, en esta última, se destaca la presencia de más muestras monoflorales en la segunda temporada lo cual, como se explicó anteriormente, podría atribuirse en parte a la presencia de mayores precipitaciones en este período.



**Figura 3.24.** Representación gráfica de la clasificación de muestras por sitio: **a.** prevalencia de muestras multi, bi y monoflorales. **b.** Distribución de muestras monoflorales por sitio y por temporada. Fuente: Propia.

### 3.5 Conclusiones parciales

- En general se puede concluir que el origen botánico de las muestras concuerda con los taxones descritos en los respectivos sitios de muestreo validando así el origen de las mismas. Se destaca predominantemente el polen de la familia Brassicaceae y de los géneros *Lotus* y *Eucalyptus*.
- Se puede considerar que la zona central de Argentina (específicamente los sitios de muestreo) es apta para la producción de polen. De esta manera se genera una alternativa



de diversificación productiva para los apicultores y un potencial aumento en la rentabilidad.

- Se puede obtener polen monofloral (a partir del análisis entomopalinológico) de los tipos polínicos destacados en el punto anterior; esto permitiría generar valor agregado a la producción de polen.
- Se destaca la posibilidad de producir polen monofloral de *Diplotaxis tenuifolia* en todos los sitios de muestreo entre los meses de febrero a marzo, dependiendo de las condiciones climáticas de cada temporada. Asimismo, es posible la obtención de polen de *Lotus* sp. en el apiario de H. Ascasubi.
- Sería conveniente actualizar el artículo 785 del CAA en lo que respecta a la metodología propuesta para la determinación del origen botánico incluyendo el criterio para definir el valor de corte para la clasificación del polen monofloral para consumo humano. De esta manera se puede definir mejor el rotulado del polen comercial permitiendo agregar valor a la producción.

### 3.6 Bibliografía

- [1] G. D. Jones y S. D. Jones, “The Uses of Pollen and its Implication for Entomology”, *Neotrop. Entomol.*, vol. 30, núm. 3, pp. 341–350, 2001.
- [2] K. Komosinska-vassev, P. Olczyk, J. Ka, L. Mencner, y K. Olczyk, “Bee Pollen : Chemical Composition and Therapeutic Application”, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2015, pp. 1–6, 2015.
- [3] R. A. Morse y T. Hooper, *Enciclopedia ilustrada de apicultura*, El Ateneo. Buenos Aires, 1992.
- [4] Cornejo Luis G., *Polen. Tecnología de su producción, procesado y comercialización*, Editorial. La Plata, 1994.
- [5] A. Forcone y A. C. Andrada, *Flora melífera de las regiones Pampeana Austral y Patagonia Extra-Andina*, Editorial. Bahía Blanca, 2007.
- [6] S. Bogdanov, “Pollen : Nutrition , Functional Properties , Health”, *Bee Prod. Sci.*, núm. August, pp. 1–31, 2016.
- [7] M. G. R. Campos *et al.*, “Pollen composition and standardisation of analytical methods .”, *J. Apic. Res.*, vol. 47, núm. 2, pp. 156–163, 2008.
- [8] L. M. Estevinho, S. Rodrigues, y A. P. Pereira, “Portuguese bee pollen : Palynological



- study , nutritional and microbiological evaluation”, *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 47, pp. 429–435, 2012.
- [9] X. Feas, M. P. Vazquez-Tato, L. Estevinho, J. A. Seijas, y A. Iglesias, “Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality”, *Molecules*, vol. 17, núm. 7, pp. 8359–8377, jul. 2012.
- [10] A. S. Freitas, V. A. S. Arruda, L. B. Almeida-Muradian, y O. M. Barth, “The botanical profiles of dried bee pollen loads collected by *Apis mellifera* (Linnaeus) in Brazil”, *Sociobiology*, vol. 60, núm. 1, pp. 56–64, 2013.
- [11] A. T. Kostić *et al.*, “Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia”, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 62, núm. 1, pp. 301–309, 2015.
- [12] G. Di Pasquale *et al.*, “Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter?”, *PLoS One*, vol. 8, núm. 8, pp. 1–13, 2013.
- [13] I. Keller, P. Fluri, y A. Imdorf, “Pollen nutrition and colony development in honey bees: Part I”, *Bee World*, vol. 86, núm. 1, pp. 3–10, 2005.
- [14] I. Keller, P. Fluri, y A. Imdorf, “Pollen nutrition and colony development in honey bees - Part II”, *Bee World*, vol. 86, núm. 2, pp. 27–34, 2005.
- [15] S. W. Nicolson, S. Da Silva Das Neves, H. Human, y C. W. W. Pirk, “Digestibility and nutritional value of fresh and stored pollen for honey bees (*Apis mellifera scutellata*)”, *J. Insect Physiol.*, vol. 107, núm. October 2017, pp. 302–308, 2018.
- [16] A. L. Cabrera, “Fitogeografía de la república Argentina”, *Boletín la Soc. Argentina Botánica*, vol. 14, pp. 1–50, 1971.
- [17] M. J. Apodaca, J. V Crisci, y L. Katinas, “Las provincias fitogeográficas de la República Argentina: definición y sus principales áreas protegidas”, en *El deterioro del suelo y el ambiente en la Argentina. Tomo I*, Primera., R. R. Casas y G. F. Albarracín, Eds. Buenos Aires: Fundación Ciencia, Educación y Cultura, 2015, pp. 79–101.
- [18] U. O. Karlin, M. S. Karlin, R. M. Zapata, R. O. Coirini, A. M. Contreras, y M. Carnero, “La Provincia Fitogeográfica del Monte: límites territoriales y su representación”, *Multequina*, núm. 26, pp. 63–75, 2017.
- [19] J. Morello, S. D. Matteucci, A. F. Rodriguez, y M. E. Silva, *Ecorregiones y Complejos ecosistemicos argentinos*. Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora, 2012.
- [20] S. Rivas-Martínez, “Glosario de términos”, *Worldwide Bioclimatic Classification System. Phytosociological Research Center*, 2004. [En línea]. Disponible en: [http://www.globalbioclimatics.org/book/bioc/global\\_bioclimatics\\_8.htm](http://www.globalbioclimatics.org/book/bioc/global_bioclimatics_8.htm).
- [21] A. Pezzola y C. Winschel, “Informe técnico. Proyecto RIAP. Descripción de la zona I, partidos bonaerenses de Villarino y Patagones, área de influencia de la EEA INTA Hilario Ascasubi.”, 2011.
- [22] D. P. Miñon, J. J. Gallego, y R. A. Barbarossa, “Producción de forraje de especies y cultivares de leguminosas en valles regados norpatagónicos”, 2013.
- [23] G. Peri, “La agricultura irrigada en Río Negro y su contribución al desarrollo regional”, Buenos Aires, 2004.



- [24] O. M. Barth, M. C. Munhoz, y C. F. P. Luz, “Botanical origin of Apis pollen loads using colour, weight and pollen morphology data”, *Acta Aliment.*, vol. 38, núm. 1, pp. 133–139, 2009.
- [25] O. M. Barth *et al.*, “Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization”, *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 82, núm. 4, pp. 893–902, 2010.
- [26] V. Kaškonienė y P. R. Venskutonis, “Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review”, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 9, núm. 6, pp. 620–634, 2010.
- [27] E. Haba, “Molecular detection of the botanical origin of pollen in honey bee-collected pellets: a comparison of methods”, Instituto politécnico de Braganca, 2019.
- [28] K. Holt, G. Allen, R. Hodgson, S. Marsland, y J. Flenley, “Progress towards an automated trainable pollen location and classifier system for use in the palynology laboratory”, *Rev. Palaeobot. Palynol.*, vol. 167, núm. 3–4, pp. 175–183, 2011.
- [29] Y. Zhang, D. W. Fountain, R. M. Hodgson, J. R. Flenley, y S. Gunetileke, “Towards automation of palynology 3: Pollen pattern recognition using Gabor transforms and digital moments”, *J. Quat. Sci.*, vol. 19, núm. 8, pp. 763–768, 2004.
- [30] K. R. L. Freire, A. C. S. Lins, M. C. Dórea, F. A. R. Santos, C. A. Camara, y T. M. S. Silva, “Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil”, *Molecules*, vol. 17, núm. 2, pp. 1652–1664, 2012.
- [31] A. C. Armaza, “Polen corbicular colectado por *Apis mellifera* L.: importancia del tamaño de muestra.”, Universidad Nacional del Sur, 2013.
- [32] R. Wodehouse, *Pollen grains; their structure, identification and significance in science and medicine*, 1st ed. New York and London: McGraw-Hill Book Company Inc., 1935.
- [33] J. M. Pla Dalmau, *Polen. Estructura y características de los granos de polen. Precisiones morfológicas sobre el polen de especies recolectadas en el N.E. de España*. Gerona: Talleres Gráficos D.C.P., 1961.
- [34] J. . Louveaux, A. Maurizio, y G. Vorwohl, “Methods of melissopalynology”, *Bee World*, vol. 59, pp. 139–153, 1978.
- [35] G. Erdtman, *An introduction to pollen analysis*. Waltham, Mass., U.S.A.: Chronica Botanica Company, 1943.
- [36] L. B. Almeida-Muradian, L. C. Pamplona, S. Coimbra, y O. M. Barth, “Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets”, *J. Food Compos. Anal.*, vol. 18, núm. 1, pp. 105–111, 2005.
- [37] O. Naab y M. A. Tamame, “Flora apícola primaveral en la región del Monte de la provincia de La Pampa (Argentina)”, *Boletín la Soc. Argentina Botánica*, vol. 42, pp. 251–259, 2007.
- [38] M. Sá Otero, S. Marcial Bugarín, S. Armesto Baztán, y E. Díaz Losada, “Método de determinación del origen geográfico del polen apícola comercial”, *Lazaroa*, núm. 23, pp. 25–34, 2002.
- [39] A. C. Andrada, “Estudio de la flora melífera y polínifera en la zona sur del Distrito del



- Caldén, Provincia del Espinal.”, Universidad Nacional del Sur, 2001.
- [40] A. C. Andrada y M. C. Tellería, “Pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from south of Caldén district (Argentina): botanical origin and protein content”, *Grana*, vol. 44, núm. 2, pp. 115–122, 2005.
- [41] J. E. Traverso, F. Babinec, y H. Troiani, “Publicación técnica n° 64. INTA Anguil. Caracterización y agrupación de entradas por compatibilidad de caracteres fenotípicos en el género *Melilotus*”, 2005.
- [42] M. Villegas y S. Rivera, “Revisión xilológica de las principales especies del género *Eucalyptus* L’Herit. cultivadas en Argentina”, *Rev. la Fac. Agron.*, vol. 105, núm. 1, pp. 9–28, 2002.
- [43] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, *Manual para productores de Eucaliptus de la mesopotamia argentina*. 1995.
- [44] Ministerio de Agroindustria. Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas., *Código Alimentario Argentino - CAPÍTULO X*. Argentina.
- [45] “RESOLUCIÓN SAGPYA N° 274/95. 1995. Tipificación por origen botánico. Modificatoria de Resolución 1051/94. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación”. [En línea]. Disponible en: [apicultura.fandom.com/wiki/Resolución\\_SAGPYA\\_N°\\_1051/94](http://apicultura.fandom.com/wiki/Resolución_SAGPYA_N°_1051/94). [Consultado: 28-nov-2020].
- [46] G. Montenegro, M. Gómez, J. Díaz-Forestier, y R. Pizarro, “Aplicación de la Norma Chilena Oficial de denominación de origen botánico de la miel para la caracterización de la producción apícola”, *Cienc. e Investig. Agrar.*, vol. 35, núm. 2, pp. 181–190, 2008.
- [47] A. Acosta, J. C. Gaviola, y C. Galmarini, *Manual de producción de semillas hortícolas. Cebolla.*, Ed. La Con. 1994.
- [48] E. Tourn, “Recompensas florales de *Diploaxis tenuifolia* DC”, Universidad Nacional del Sur, 2012.
- [49] E. M. Aramayo, A. F. Valle, A. C. Andrada, y S. A. Lamberto, “‘‘Calendario de floración de árboles y especies espontáneas frecuentes en Bahía Blanca’.”, *Parodiana*, vol. 8, núm. 2, pp. 265–270, 1993.
- [50] A. Valle, A. Andrada, E. Aramayo, L. Gallez, y S. Lamberto, “Mieles de la región periserrana del Sistema de Ventania, Argentina”, *Investig. Agrar. Prod. y protección Veg.*, vol. 16, núm. 3, 2001.
- [51] A. Valle, A. Andrada, E. Aramayo, M. Gil, y S. Lamberto, “A melissopalynological map of the south and southwest of the Buenos Aires Province, Argentina”, *Spanish J. Agric. Res.*, vol. 5, núm. 2, pp. 172–180, 2007.
- [52] C. A. Criado, “Lotus ‘ PAMPA ’ INTA. Una herramienta de trabajo para los suelos bajos inundables”, *EEA INTA Cuenca del Salado*, pp. 1–15, 2014.
- [53] P. Díaz, O. Borsani, y J. Monza, “Lotus-related species and their agronomic importance”, en *Lotus japonicus handbook*, Springer, 2005, pp. 25–37.
- [54] L. Gallez, A. Andrada, E. Galassi, C. Pellegrini, y M. E. Gil, “Mieles de las Sierras de Ventania: hacia su tipificación.”, en *Ambientes y recursos naturales del Sudoeste Bonaerense: producción, contaminación y conservación.*, 2009, p. 514.



- [55] A. Duguetti *et al.*, *Vicias: Bases agronómicas para el manejo en la Región Pampeana*. 2013.
- [56] E. S. Natale, J. Gaskin, S. M. Zalba, M. Ceballos, y H. E. Reinoso, “Especies del género *Tamarix* (Tamaricaceae) invadiendo ambientes naturales y seminaturales en Argentina”, pp. 137–146, 2008.
- [57] M. C. Tellería y A. Forcone, “El polen de las mieles del valle de Río Negro, provincia fitogeográfica del monte (Argentina)”, *Darwiniana*, vol. 38, núm. 3–4, pp. 273–277, 2000.
- [58] E. Corbella, S. Pieroni, Ju. Visca, y R. Alemán, “Manejo de colonias de abejas melíferas en la polinización de trébol rojo (*Trifolium pratense*).”, *INIA - Boletín de divulgación N° 52*. Montevideo, pp. 925–948, 2014.

## Capítulo 4



Determinación de humedad y proteínas totales  
empleando NIR y quimiometría



## 4.1 Objetivos

Los objetivos de este apartado fueron utilizar la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR) y herramientas quimiométricas para:

- A. Determinar la humedad y las proteínas totales en muestras de polen apícola recolectado en la zona centro de Argentina.
- B. Clasificar las muestras analizadas en base al contenido de proteínas totales con el fin de establecer productos con calidad diferenciada para su empleo en la industria alimenticia.

## 4.2 Introducción

El polen de abejas se reconoce como un producto natural de gran valor nutricional, razón por la cual está aumentando la demanda en todo el mundo. Asimismo, es uno de los productos de la colmena que presenta mayor variabilidad composicional debido principalmente al origen botánico, aunque también influye la metodología empleada en los procesos poscosecha y condiciones de almacenamiento una vez procesado [1-5]. Por esta razón, y a los fines comerciales, es imprescindible caracterizarlo fisicoquímicamente para poder asegurar su calidad endógena y brindar información más completa al potencial consumidor.

Como se especificó en el capítulo 1 los principales componentes del polen son los hidratos de carbono, las proteínas y los lípidos, acompañados en menor proporción por vitaminas, minerales, enzimas y pigmentos [2,4,6,7]. Argentina pertenece al grupo reducido de países que establece en su código alimentario ciertos parámetros de composición nutricional para que este producto de la colmena pueda ser legalmente comercializado dentro del territorio nacional. Específicamente en el artículo 785 (Capítulo X) del CAA se especifican los valores permitidos para el contenido de humedad y proteínas totales [8].

### Humedad en polen corbicular

La determinación de **humedad** es fundamental para establecer la calidad del polen apícola debido a que de este valor dependerá la vida útil en góndola. El contenido de agua afecta la estabilidad enzimática y microbiológica; razón por la cual debe controlarse previamente a las etapas de almacenamiento y comercialización [5,9,10]. En general la determinación de humedad se realiza por métodos gravimétricos basados en la pérdida de peso de la muestra



debido a la desecación hasta alcanzar peso constante. Para ello se contempla tanto el uso de estufas a diferentes temperaturas, como equipos con radiación infrarroja e, incluso, liofilizadores. También suele utilizarse la valoración coulombimétrica (Karl Fischer's), aunque con menos frecuencia debido a que presenta una metodología compleja y el costo de análisis es elevado. En el caso de la normativa argentina se establece la metodología de “secado al vacío 45 mmHg y 65°C” y se acepta un valor máximo de humedad de 8% [2,5,8,11–16].

### **Proteínas totales en polen corbicular**

Otro parámetro relevante para establecer la calidad del polen corbicular es la determinación de **proteínas** ya que se puede considerar como una medida directa y confiable de su valor nutricional tanto en lo referente a nutrición apícola como humana [2,11,13,19].

Comúnmente en la mayoría de los métodos de análisis para la determinación de proteínas en alimentos se busca un elemento específico (nitrógeno orgánico) o un grupo funcional (aminoácidos o uniones peptídicas) y el contenido proteico se calcula empleando un factor establecido experimentalmente.

Las técnicas cromatográficas como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) son empleadas para determinar con mayor precisión el contenido de proteínas (composición aminoacídica), aunque generalmente no se utilizan en el análisis de rutina en alimentos debido a su alto costo [18,19].

El método Kjeldahl es el más aceptado internacionalmente para la determinación de nitrógeno/proteína. Está incluido entre los métodos oficiales y aprobado por organismos internacionales, además se usa para calibrar métodos físicos y automáticos. Data del año 1883 y desde entonces muchos trabajos se han publicado modificando el procedimiento original [20]. Aunque esta metodología es la más utilizada para determinar el contenido de proteínas totales en varias matrices, presenta varias desventajas como la utilización y generación de sustancias tóxicas para el operador y el ambiente, además del agravante que insume mucho tiempo.

### **Espectroscopia en el infrarrojo cercano – NIR**

La espectroscopia NIR es una alternativa analítica sencilla, rápida y de bajo costo; no insume ni genera sustancias tóxicas y además es una técnica no destructiva que no requiere preparación de muestras, razón por la que suele aplicarse en procesos en línea. Esta técnica analítica tuvo un crecimiento revolucionario sobre el final del siglo pasado, particularmente en las dos últimas



décadas. Presenta un amplio campo de aplicación en la industria química, alimenticia, farmacéutica y agronómica como también en muestras de origen ambiental y biomédica, entre otras[21,22].

Considerando específicamente la aplicación en polen apícola, se ha utilizado en el año 2007 en España para determinar algunos parámetros físico-químicos [23] y, una década más tarde, en Brasil con el objetivo de cuantificar los macronutrientes de polen de diferentes regiones productivas [24]. Particularmente en Argentina la tecnología NIR se emplea desde hace unos años en varias matrices “no apícolas” (cereales, medicamentos, biocombustibles, etc.) y recientemente se ha comenzado a implementar para encontrar adulteraciones en miel [25] aunque, hasta el momento, no se han encontrado trabajos que describan el uso de esta técnica analítica en polen. De esta manera, surge el objetivo de este capítulo que propone determinar los parámetros humedad y proteínas totales en polen apícola de la zona central de Argentina utilizando espectroscopía NIR y quimiometría; además de lograr una clasificación según su contenido proteico.

Para poder determinar el contenido de humedad y proteínas totales y realizar la predicción y clasificación de muestras a partir de los espectros NIR es necesario emplear herramientas de análisis multivariante. Para ello se elabora un modelo previo, el cual permite ajustar las propiedades de un sistema para predecir su comportamiento en diversas situaciones [21,22,26,27]. Los modelos quimiométricos utilizados para alcanzar los objetivos planteados son:

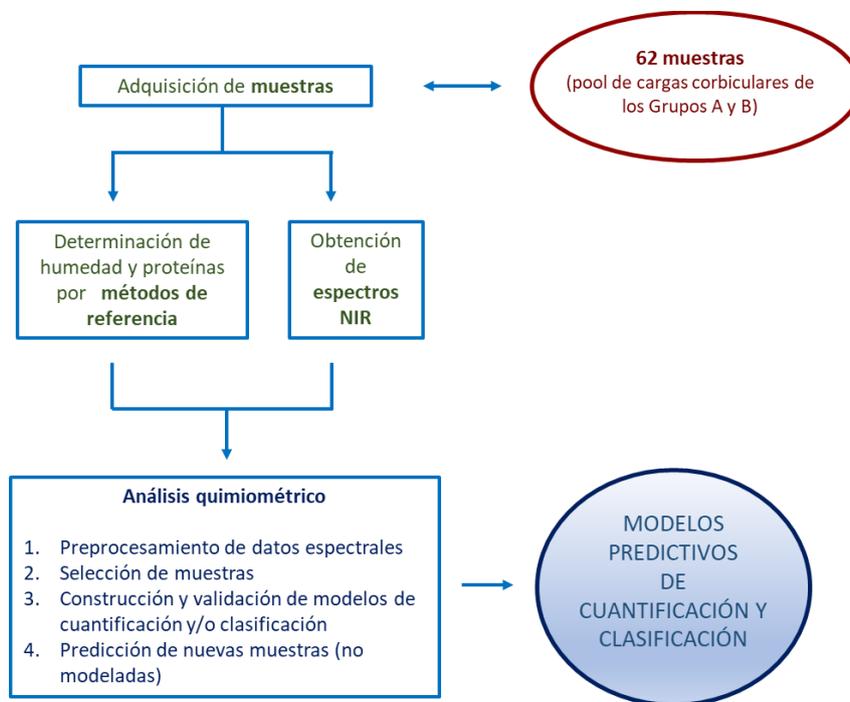
- Para la determinación de humedad y proteínas totales: regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas con Regresión Lineal Múltiple (SPA-MLR) y Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas para la selección de intervalos empleando regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (*i*SPA-PLS).
- Clasificación del polen según el contenido proteico: Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) y la combinación de *i*SPA-PLS-DA.

### 4.3 Materiales y métodos

En la figura 4.1 se grafica el proceso analítico desarrollado en este capítulo. Se obtuvieron los espectros NIR de las muestras de polen y se determinaron los parámetros humedad y proteínas



totales empleando los correspondientes métodos de referencia. La información obtenida fue procesada utilizando métodos quimiométricos que permitieron alcanzar los modelos predictivos y de clasificación esperados y sus validaciones.



**Figura 4.1.** Gráfico de la obtención y procesamiento de muestras para las determinaciones analíticas realizadas con espectroscopía NIR y quimiometría. Fuente: propia.

### 4.3.1 Muestras

Las muestras analizadas en este capítulo corresponden a los cincuenta lotes descritos en la sección 2.3.2 (Grupo A). Además, se incorporaron doce muestras pertenecientes a la primera temporada del apiario localizado en H. Ascasubi que fueron secadas previamente en estufa (Grupo B) con el fin de mejorar la predicción de los parámetros físico-químicos. De esta manera se procesaron 62 muestras conformadas por un **pool de cargas corbiculares**.

### 4.3.2 Determinación de humedad

La determinación de humedad en las 62 muestras, se realizó por un método gravimétrico, empleando el liofilizador Rificor L-A-B4 (Figura 4.2). Para el análisis se procesaron 2,000 g



de muestra a una temperatura de  $-48\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 31 horas y una presión final de  $0,08\text{ mmHg}$  [5].



**Figura 4.2.** a. Liofilizador Rificor L-A-B4 (LIUC-UNS). b. Detalle del procesamiento de muestras. Fuente: propia.

### 4.3.3 Determinación de proteínas totales

El contenido proteico fue estimado en base a la cantidad de nitrógeno a través del método de Kjeldahl utilizando un sistema de digestión y destilación semiautomática (Digestor Bloc-digest y destilador Pro-Nitro S J.P. SELECTA) y un titulador automático (Titro Line Easy con electrodo de pH SCHOTT (Figura 4.3.b, c y d).

Se utilizaron reactivos de grado analítico: sales catalíticas (94% p/p sulfato de potasio anhidro y 6% p/p sulfato cúprico pentahidratado, Cicarelli); ácido sulfúrico (Cicarelli); hidróxido de sodio (Anedra) y ácido bórico (Cicarelli).

Se pesaron  $0,2000\text{ g}$  de polen (Figura 4.3.a) y se le adicionaron  $3,0\text{ mL}$  de ácido sulfúrico concentrado y  $1,0\text{ g}$  de catalizador. Posteriormente se realizó la digestión de la muestra en tres etapas:  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  (15 minutos),  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  (15 minutos) y  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$  (60 minutos). Para la destilación



del digesto se agregaron 30,0 mL de hidróxido de sodio al 30% (p/v) y el hidróxido de amonio generado fue recolectado en un erlenmeyer conteniendo 10,0 mL de una solución de ácido bórico al 1% (p/v). Por último, se realizó la cuantificación del nitrógeno amoniacal mediante una titulación por retorno ácido-base con una solución de ácido sulfúrico 0,02 N. El contenido de proteína se calculó utilizando el factor de conversión de 6,25 (según lo establecido en el CAA) y se expresó como porcentaje en base seca [2,8,11,12,15,16,23,28,29].

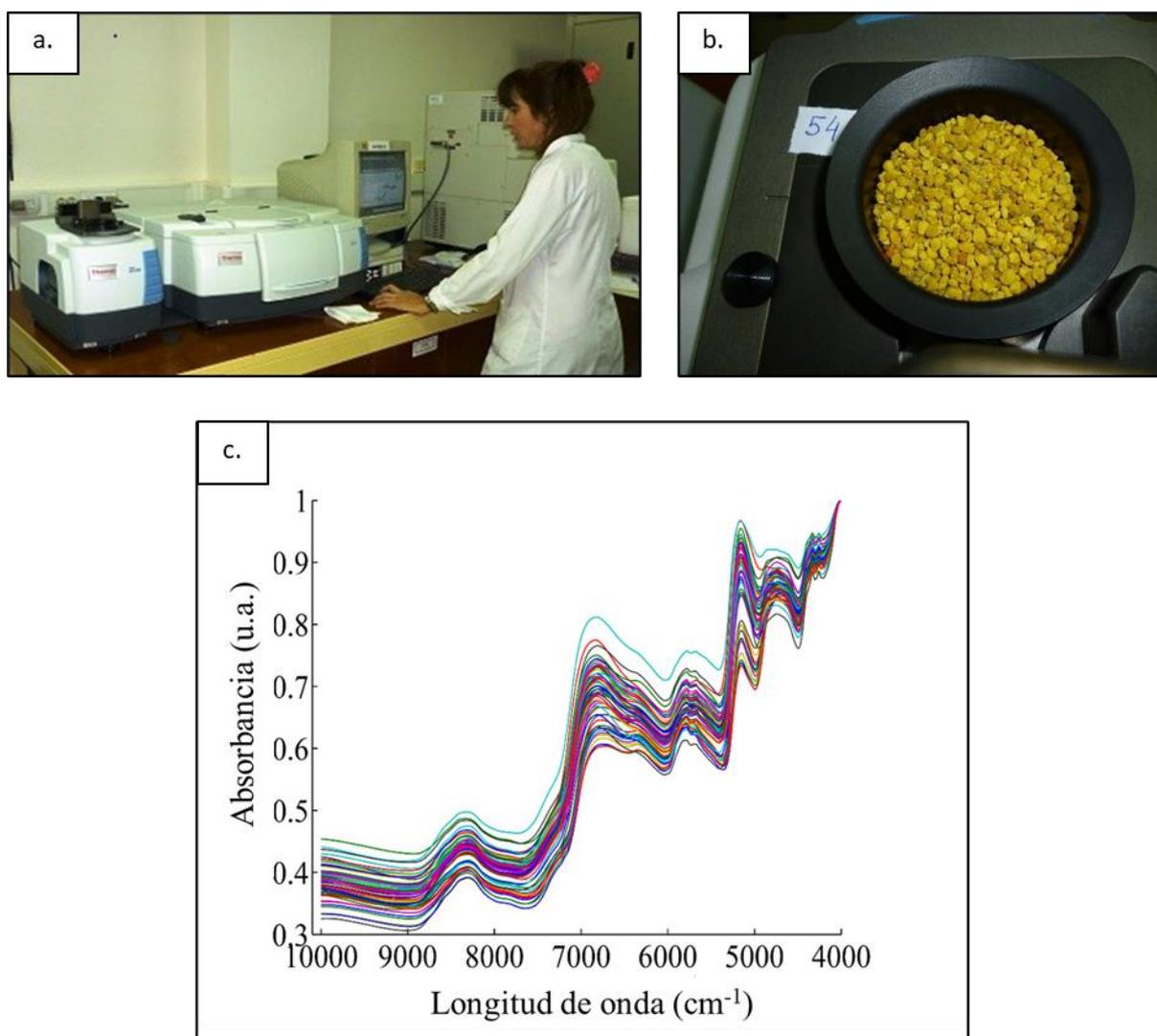


**Figura 4.3.** Determinación de proteínas totales (Laboratorio de suelos EEA INTA H. Ascasubi). **a** Muestra de polen. **b.** Bloque digestor Selecta. **c.** Destilador Pro-Nitro S. **d.** Titulador automático Titro Line Easy. Fuente: propia.



### 4.3.4 Obtención de espectros NIR

La obtención de los espectros NIR se realizó posteriormente al proceso de liofilización y previo a la determinación del contenido de proteínas totales. Se utilizó un espectrofotómetro FTIR-NIR Thermo Scientific Nicolet iS50 (divisor de haz de  $\text{CaF}_2$  y detector de InGaAs) (Figura 4.4.a). Cada espectro NIR (Fig 4.4.c) fue generado directamente a partir de un pool de cargas corbiculares (Figura 4.4.b), realizando 30 repeticiones en un rango de  $10000$  a  $4000$   $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de  $8$   $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 4.4.** Determinaciones espectrofotométricas en el infrarrojo cercano; **a.** FTIR-NIR Thermo Scientific Nicolet iS50 (LIUC-UNS). **b.** Detalle de una muestra en la esfera integradora y **c.** su respectivo espectro NIR. Fuente: propia.

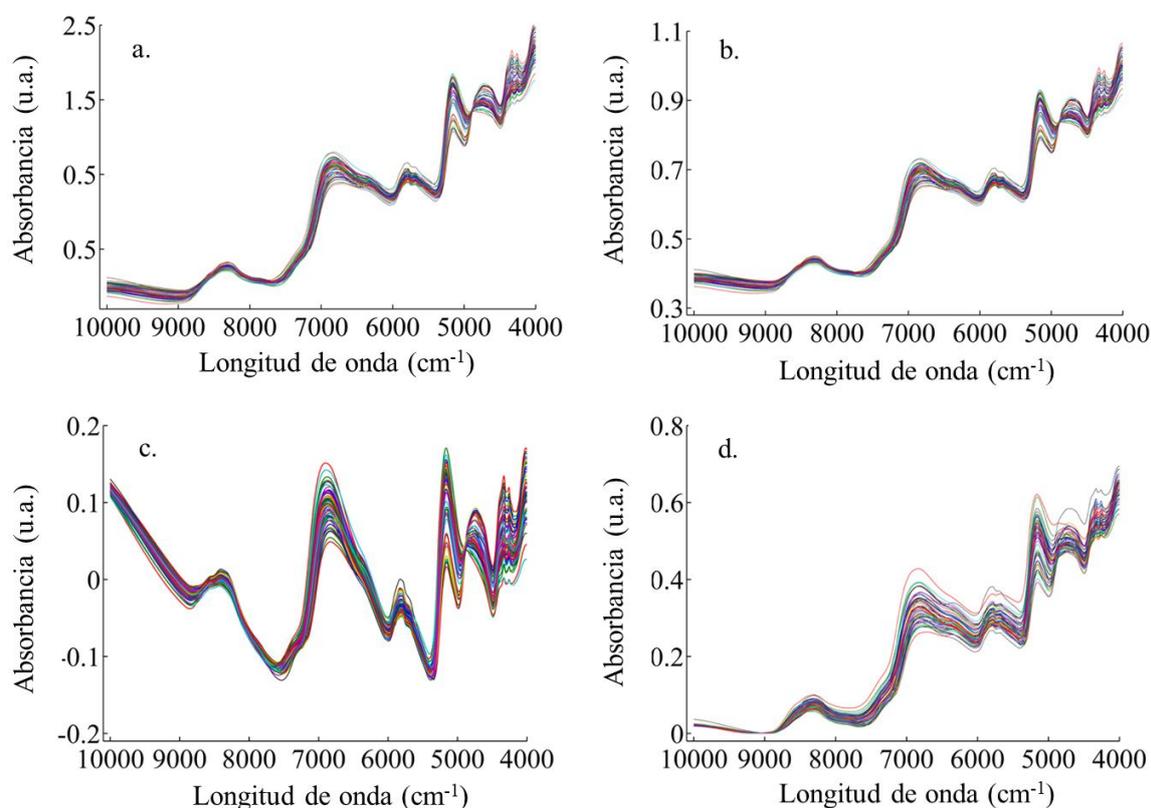


### 4.3.5 Preprocesamiento de los espectros y construcción de modelos quimiométricos

El aprendizaje y aplicación de los modelos quimiométricos empleados en este capítulo de tesis fueron realizados a partir de una pasantía profesional, en el Laboratorio de Química Analítica de la Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande (Brasil).

#### Preprocesamiento de datos espectrales

Como los espectros NIR presentaron variaciones sistemáticas en la línea de base (Figura 4.4.c), antes de la construcción de los modelos quimiométricos de calibración y clasificación se aplicaron diferentes métodos de preprocesamiento: transformación variable normal estándar (SNV); corrección de la dispersión multiplicativa (MSC); compensación de la línea de base (BO) y corrección lineal de la línea de base (LBC) (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Espectros correspondientes a los preprocesamientos de la línea de base con **a.** variable normal estándar (SNV); **b.** corrección de la dispersión multiplicativa (MSC); **c.** corrección lineal (LBC) y **d.** compensación de la línea de base (BO). Fuente: propia.



### **Modelos quimiométricos para la cuantificación de humedad y proteínas**

Para la construcción de modelos de calibración multivariados se seleccionaron 40 y 21 muestras para los conjuntos de calibración y predicción respectivamente, empleando el algoritmo de selección Kennard-Stone (KS) [30]. Luego, se evaluaron los modelos quimiométricos PLS (espectro completo), SPA-MLR e iSPA-PLS (espectro dividido en intervalos de 5, 10, 15 y 20). Para optimizar el número de factores de la regresión PLS o variables latentes (LV) en los modelos, se utilizó la metodología de validación cruzada y se evaluó la eficiencia en base al menor error cuadrático medio (RMSECV) y al coeficiente de correlación más alto ( $r_{CV}$ ).

La capacidad predictiva de los modelos finales se evaluó en términos del error cuadrático medio de predicción (RMSEP), coeficiente de correlación ( $r_{Pred}$ ), error relativo de predicción (REP) y de la desviación residual predictiva (RPD). Para evaluar la precisión de los modelos construidos, se realizó el ajuste empleando el método de mínimos cuadrados ordinarios (OLS) y la comparación de la intersección “a” estimada y la pendiente “b” (con sus valores ideales de 0 y 1 respectivamente) utilizando la región elíptica de confianza conjunta (EJCR) [31,32].

### **Modelos quimiométricos de clasificación según el contenido de proteínas**

En la construcción de los modelos de clasificación, se utilizó el algoritmo KS para dividir el conjunto de datos en entrenamiento y de prueba en base a la cantidad de proteína presente en las muestras. Para el análisis discriminante se realizó un relevamiento del contenido proteico en polen comercial en los que se observó un valor de proteínas nominal de 20 g/100 g (base seca) [33–35]. Para ello se establecieron dos clases: la **clase 1 (proteína  $\geq 20\%$  p/p)** compuesta por 23 y 10 muestras de entrenamiento - prueba y la **clase 2 (proteína  $< 20\%$  p/p)** compuesta por 20 y 8 muestras de entrenamiento - prueba. A continuación, se emplearon los modelos quimiométricos PLS-DA e iSPA-PLS-DA, y luego se comparó su desempeño en términos de precisión, sensibilidad y especificidad [36,37].

Todos los procedimientos quimiométricos utilizados a lo largo del trabajo se implementaron utilizando Matlab® 2019a (Mathworks, EE. UU.).



## 4.4 Resultados y discusión

### 4.4.1 Humedad y proteínas totales

En la tabla 4.1 se observan los resultados de los valores extremos de humedad y proteínas totales obtenidos por los respectivos métodos de referencia para las muestras analizadas. Los resultados de cada muestra pueden observarse en el Anexo II.

**Tabla 4.1.** Resultados de los contenidos de humedad y proteínas totales obtenidos para las muestras del Grupo A y B respectivamente. DE: Desviación Estándar.

	% Proteínas totales (factor 6.25)		% Humedad	
	Grupo A (N=50)	Grupo B (N=12)	Grupo A (N=50)	Grupo B (N=12)
Valor mínimo	14,4	20,4	5,8	2,2
Valor máximo	26,7	24,6	27,2	4,1
<b>Promedio</b>	20,2	22,9	14,7	3,2
<b>DE</b>	2,6	1,3	4,75	0,6

Fuente: elaboración propia.

El máximo valor de humedad permitido para el polen comercial varía según la normativa de cada país. En Argentina se acepta hasta un 8% al igual que en Uruguay, mientras que Brasil admite un valor máximo del 4%. Entre los países europeos tampoco existe una estandarización; mientras que Polonia y Suiza permiten un valor máximo del 6%, Bulgaria especifica en su normativa hasta 10% de humedad [2,5]. Está claro que sería conveniente consensuar un valor a nivel internacional para favorecer la comercialización de este producto entre los diferentes países. En este sentido Campos y col. [2] proponen considerar un valor intermedio de 6 a 8%, aunque también observan la importancia de definir una metodología estándar de análisis para evitar diferencias en los valores obtenidos.



El valor medio de humedad del Grupo B (N=12) es de  $3,2 \pm 0,6\%$ . Aunque la metodología utilizada no fue la establecida en el CAA, todas las muestras analizadas se encuentran muy por debajo del valor del 8%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Pereira de Melo y Almeida-Muradian [5] quienes obtuvieron un valor de 3,96% utilizando la metodología de liofilización. Estos autores compararon seis métodos para la determinación de humedad en polen seco de abeja y concluyeron que una de las mejores metodologías evaluadas es la utilizada en este trabajo; asimismo resaltan que el uso del liofilizador establece los valores más bajos de todas las metodologías evaluadas. En territorio nacional, aunque con el empleo de la estufa de secado, Baldi Coronel y col. [11] expusieron un rango de 3,23 a 9,23% en 37 muestras de polen de abejas de procedencia comercial. Asimismo, Serdá [14] manifiesta un rango de 9 a 17% para muestras secas en un estudio realizado en el Delta del Paraná. Esta situación denota la necesidad de definir una metodología analítica para este importante parámetro tal como lo plantean Campos y col. [2].

Las muestras sin el proceso de secado o Grupo A (N=50) presentaron un valor de humedad medio del  $14,7 \pm 4,75\%$ . Este valor está incluido en el rango de 14 a 30 g de agua/100 g mencionados por varios autores para el polen fresco [1,19]. Particularmente Serdá [14] obtuvo valores más altos de humedad en polen fresco monofloral (19 a 36%) en muestras recolectadas por apicultores en el Delta del Paraná, posiblemente debido a la alta humedad relativa ambiental (aproximadamente 76 %) característica de esta región [38]. Por otro lado, Human y Nicholson [18] en Sudáfrica, encontraron diferencias significativas entre los valores de humedad de polen fresco vegetal de una variedad de *Aloe greatheadii*, polen de abeja y pan de polen (13,1%, 18,8% y 21% respectivamente). El aumento del contenido de humedad en los dos últimos refleja la adición de néctar y secreciones glandulares de las abejas para el armado de la carga corbicular.

Con respecto al contenido proteico, los valores del Grupo B oscilaron entre 20,4% y 24,6% con un promedio de  $22,9 \pm 1,3\%$  los cuales son bastante similares a los obtenidos por Anjos y col. [39] quienes procesaron 126 muestras de Portugal en análogas condiciones experimentales. Asimismo, Baldi Coronel y col. [11] reportaron un valor promedio (N=37) de 24,03% en muestras comerciales (secas) de Argentina. Las muestras frescas presentaron un valor mínimo de 14,4% y máximo de 26,7% con una media de  $20,2 \pm 2,6\%$ . En la misma región fitogeográfica, de la cual se obtuvieron la mayoría de las muestras de este trabajo, Andrada y Tellería [28] obtuvieron valores de proteína entre 13,6% y el 31,9% (N=16) para grupos de



cargas corbiculares pertenecientes a determinados taxones vegetales, es decir para muestras de origen botánico monofloral definido. Los resultados de ambos grupos concuerdan con los establecidos en el CAA en el que se define un rango de 15 a 28% [8].

#### 4.4.2 Análisis espectral NIR

Como se puede observar en la Figura 4.4.c las bandas típicas C-H y C-C de la estructura de los componentes del polen aparecen alrededor de 4050 a 4400  $\text{cm}^{-1}$ . El primer y segundo sobretono de la unión C-H de estos constituyentes también aparecen en la región de 5700 a 5900  $\text{cm}^{-1}$  y 8300 a 8900  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente. Asimismo, puede observarse una banda ancha y prominente alrededor de 6800 a 6900  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al primer sobretono de la vibración de estiramiento O-H del agua; como también otra de similar origen en la región de 5100 y 5200  $\text{cm}^{-1}$ . La primera combinación libre de estiramiento armónico N-H/amida II y las bandas de combinación N-H (aminas)/O-H representan la información de proteínas alrededor de 4850 y 4650  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. El primer sobretono de N-H y O-H de amidas/aminas y R-OH se exhibe alrededor de 7000  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas que aparecen después de 9000  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen al tercer sobretono de N-H y C-H de proteínas [24].

##### 4.4.2.1 Determinación de humedad

En tabla 4.2 se muestran los resultados del contenido de humedad a partir de los espectros NIR del polen corbicular y modelos quimiométricos.

Como puede apreciarse, el mejor resultado se obtuvo con un preprocesamiento de los espectros con SNV; utilizando SPA para la selección de 20 intervalos y posterior tratamiento con PLS. El modelo SNV/20-iSPA-PLS se construyó con 4 variables latentes, obteniendo valores de RMSECV y  $r_{CV}$  de 1,0699 g/100 g y 0,9844, respectivamente. Para la predicción se obtuvieron valores de RMSEP y  $r_{pred}$  de 0,6581 g/100 g y 0,9956 respectivamente, con una RPD de 14,807 y un REP de solo 5,7659%. El alto valor de RPD aquí obtenido está de acuerdo con la literatura, en la que se han observado valores superiores a 20 para la predicción del contenido de humedad en otras matrices alimentarias; aunque se recomiendan y se aceptan de manera consensual valores tan altos como 3,0 para espectroscopia NIR [40,41].



**Tabla 4.2.** Resultados de la determinación de **humedad** en polen de abeja argentino utilizando diferentes espectros NIR preprocesados y calibración multivariante.

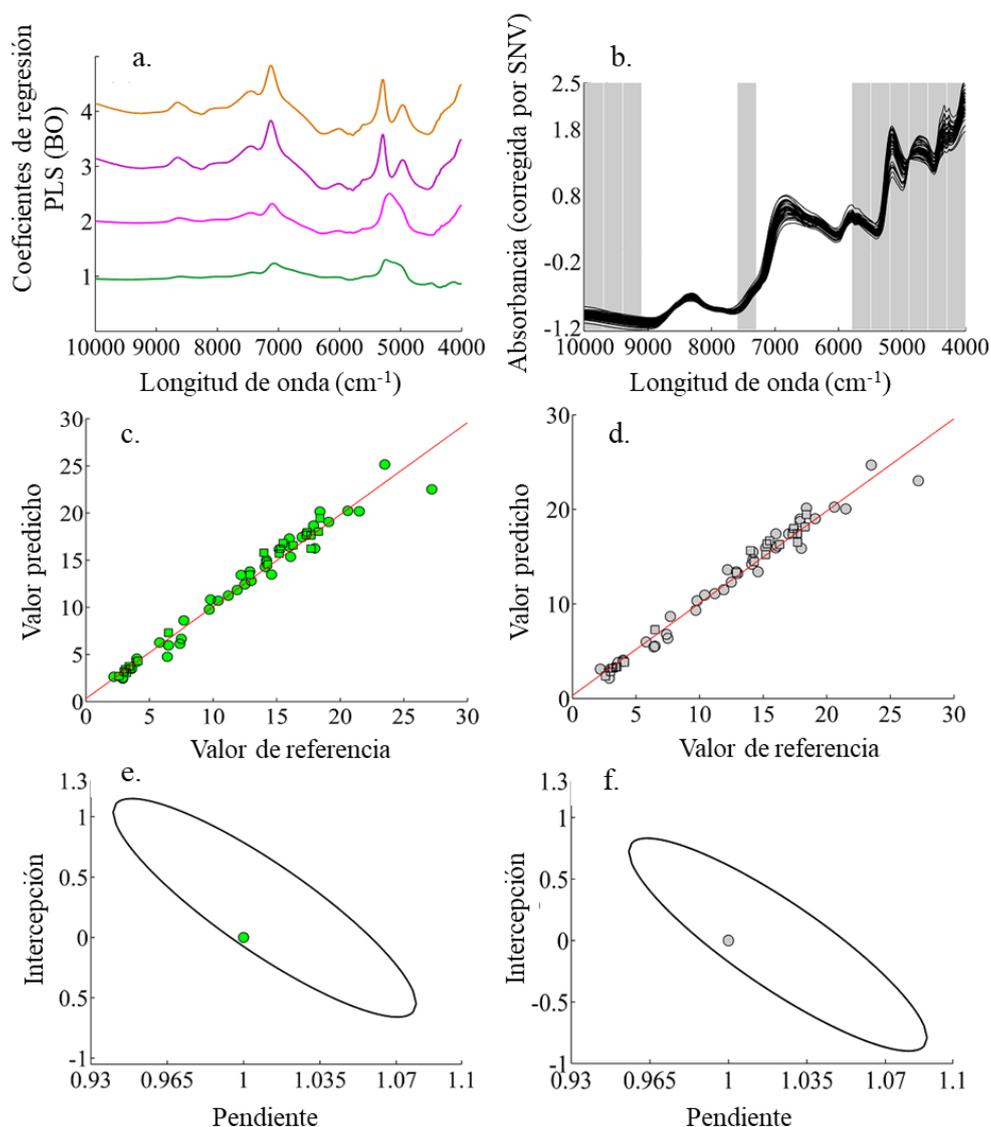
	Parámetro							
	RMSECV (g/100 g)	$r_{cv}$	RMSEP (g/100 g)	$r_{Pred}$	RPD <sub>Pred</sub>	REP (%)	Bias ( $t_{calc}$ ) <sup>b</sup>	LV
<b>SNV</b>								
PLS	1.1239	0.9829	0.7285	0.9950	12.084	6.3825	0.3559	4
5- <i>i</i> SPA-PLS (2) <sup>a</sup>	1.0766	0.9842	0.7068	0.9952	12.837	6.1918	0.0172	4
10- <i>i</i> SPA-PLS (4) <sup>a</sup>	1.0767	0.9842	0.7068	0.9952	12.837	6.1924	0.0172	4
15- <i>i</i> SPA-PLS (2) <sup>a</sup>	0.9945	0.9866	0.7830	0.9935	10.460	6.8602	0.0044	4
20- <i>i</i> SPA-PLS (10) <sup>a</sup>	1.0699	0.9844	0.6581	0.9956	14.807	5.7659	0.0064	4
SPA-MLR (11) <sup>a</sup>	0.8285	0.9907	0.8788	0.9905	8.304	7.6989	-0.0666	-
<b>MSC</b>								
PLS	1.1418	0.9823	0.7636	0.9946	10.998	6.6903	2.8777e <sup>-4</sup>	4
5- <i>i</i> SPA-PLS (2) <sup>a</sup>	1.1001	0.9835	0.7662	0.9949	10.924	6.7129	0.0132	4
10- <i>i</i> SPA-PLS (3) <sup>a</sup>	1.0799	0.9841	0.7562	0.9954	11.215	6.6248	0.0033	4
15- <i>i</i> SPA-PLS (2) <sup>a</sup>	0.9956	0.9865	0.8050	0.9929	9.896	7.0525	0.0086	4
20- <i>i</i> SPA-PLS (4) <sup>a</sup>	1.0877	0.9839	0.7685	0.9953	10.859	6.7327	0.0022	4
SPA-MLR (9) <sup>a</sup>	0.8479	0.9903	0.9763	0.9885	6.728	8.5537	-0.0901	-
<b>LBC</b>								
PLS	1.1371	0.9824	0.8006	0.9936	10.056	6.9907	0.0199	3
5- <i>i</i> SPA-PLS (3) <sup>a</sup>	1.0934	0.9837	0.7363	0.9944	11.889	6.4290	0.0111	3
10- <i>i</i> SPA-PLS (6) <sup>a</sup>	1.0934	0.9837	0.7363	0.9944	11.889	6.4290	0.0111	3
15- <i>i</i> SPA-PLS (10) <sup>a</sup>	1.1067	0.9833	0.7529	0.9942	11.371	6.5738	0.0149	3
20- <i>i</i> SPA-PLS (5) <sup>a</sup>	1.0838	0.9839	0.7644	0.9934	11.032	6.6749	0.0066	3
SPA-MLR (12) <sup>a</sup>	0.8585	0.9899	0.8484	0.9909	8.955	7.4082	-0.0259	-
<b>BO</b>								
PLS	1.1254	0.9826	1.0243	0.9906	5.969	9.5599	0.0093	4
5- <i>i</i> SPA-PLS (4) <sup>a</sup>	1.0804	0.9840	0.9198	0.9919	7.402	8.5852	0.0048	4
10- <i>i</i> SPA-PLS (6) <sup>a</sup>	1.0951	0.9836	0.9296	0.9911	7.247	8.6764	0.0115	4
15- <i>i</i> SPA-PLS (2) <sup>a</sup>	1.0209	0.9857	0.8638	0.9927	8.393	8.0624	0.0069	4
20- <i>i</i> SPA-PLS (2) <sup>a</sup>	1.0538	0.9848	0.9747	0.9926	6.592	9.0972	0.0027	4
SPA-MLR (10) <sup>a</sup>	0.6820	0.9937	0.9784	0.9873	6.542	9.1323	0.0635	-

Fuente: propia. SNV: variable normal estándar; MSC: corrección de la dispersión multiplicativa; LBC: corrección lineal de la línea de base; BO: compensación de la línea de base. RMSECV: error cuadrático medio de validación cruzada;  $r_{cv}$ : coeficiente de correlación para validación cruzada; RMSEP: error cuadrático medio de predicción;  $r_{Pred}$ : coeficiente de correlación para predicción; RPD<sub>Pred</sub>: desviación residual predictiva para predicción;  $t_{calc}$ : valor  $t$  calculado;  $t_{crit}$ : valor  $t$  crítico; LV: variables latentes usadas en el modelo. REP: error relativo de predicción. <sup>a</sup> Número de intervalos o variables seleccionados por SPA (por ej. 10-*i*SPA-PLS (5): 5 intervalos/variables fueron seleccionados de 10 por el algoritmo SPA); <sup>b</sup>  $t_{crit} = 1.7247$ .

El modelo SNV/20-*i*SPA-PLS seleccionó 10 intervalos de 20 mediante el algoritmo SPA. Esto ocurre porque la información analítica seleccionada por SPA se correlaciona directamente con la banda de combinación O–H de agua en la región de 5100 y 5200  $cm^{-1}$ , además de otras regiones espectrales que presentan información relevante, como se indica en los coeficientes de regresión de PLS mostrados en figura 4.6.a. Cabe señalar que la banda de agua O–H alrededor de 6800 a 6900  $cm^{-1}$  tiene poca contribución significativa a la construcción del modelo de



calibración y, por ello, no fue seleccionada por SPA como se verificó en los intervalos seleccionados por SPA en la figura 4.6.b. Comparando el modelo construido por PLS utilizando toda la información espectral (Figura 4.6.c) con el modelo obtenido por *i*SPA-PLS (Figura 4.6.d), se puede visualizar claramente que los valores de predicción se encuentran muy cercanos a los valores de referencia cuando se realiza la selección del intervalo, lo que representa una mejora de todas las cifras de mérito, reduciendo principalmente el REP en aproximadamente un 0,62%. El punto teórico ideal dentro de las elipses confirma la ausencia de error sistemático para los modelos SNV/PLS y SNV/20-*i*SPA-PLS (Figura 4.6.e y f).



**Figura 4.6.** Determinación de humedad en polen de abejas argentino usando PLS y 20-*i*SPA-PLS: **a.** coeficientes de regresión de PLS y **b.** intervalos seleccionados por 20-*i*SPA-PLS obtenidos utilizando los espectros NIR preprocesados con SNV; **c.** y **d.** gráficos de Predicción versus Referencia con **e.** / **f.** las elipses de confianza de los modelos de predicción incluyendo el punto ideal teórico. Fuente: propia.



### 4.4.2.2 Determinación de proteína

En la tabla 4.3 se muestran los resultados de las determinaciones de proteína total en polen corbicular mediante espectroscopia NIR y técnicas de calibración multivariante.

**Tabla 4.3.** Resultados de la determinación de **proteínas** en polen de abeja argentino utilizando diferentes espectros NIR preprocesados y calibración multivariante.

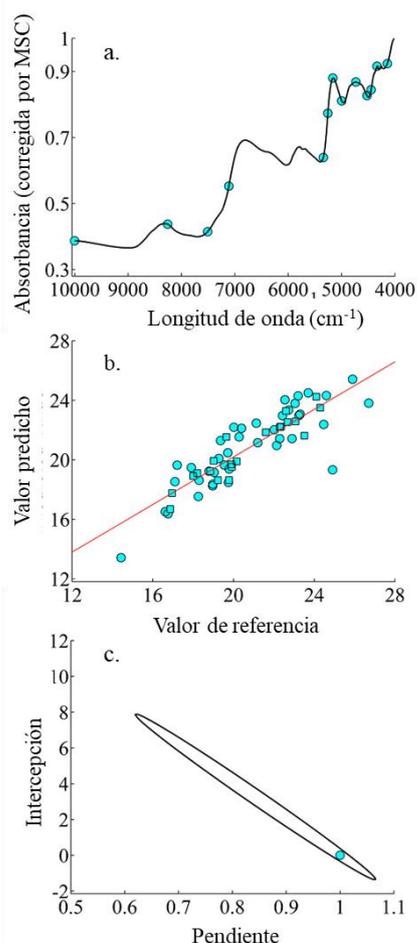
	Parámetro							
	RMSECV (g/100 g)	$r_{CV}$	RMSEP (g/100 g)	$r_{Pred}$	RPD <sub>Pred</sub>	REP (%)	Bias ( $t_{cal}$ ) <sup>b</sup>	LV
<b>SNV</b>								
PLS	1.8723	0.7579	1.2172	0.8922	1.5508	5.9025	0.1016	8
5- <i>i</i> SPA-PLS (4) <sup>a</sup>	1.8369	0.7614	1.2912	0.8783	1.3781	6.2613	0.0889	8
10- <i>i</i> SPA-PLS (5) <sup>a</sup>	1.7724	0.7836	1.0018	0.9059	2.2894	4.8581	0.0631	8
15- <i>i</i> SPA-PLS (5) <sup>a</sup>	1.7024	0.7986	1.1146	0.8872	1.8495	5.4051	0.0495	8
20- <i>i</i> SPA-PLS (10) <sup>a</sup>	1.7321	0.7937	1.0488	0.8949	2.0888	5.0858	0.0354	8
SPA-MLR (10) <sup>a</sup>	1.4743	0.8493	0.9053	0.9158	2.8035	4.3899	-0.0200	-
<b>MSC</b>								
PLS	1.8237	0.7678	1.2292	0.8890	1.5207	5.9610	0.1159	8
5- <i>i</i> SPA-PLS (4) <sup>a</sup>	1.8409	0.7637	1.2400	0.8785	1.4943	6.0133	0.1463	8
10- <i>i</i> SPA-PLS (6) <sup>a</sup>	1.6584	0.8082	1.4196	0.8402	1.1401	6.8840	0.0828	8
15- <i>i</i> SPA-PLS (14) <sup>a</sup>	1.7295	0.7903	1.2671	0.8750	1.4311	6.1448	0.1123	8
20- <i>i</i> SPA-PLS (8) <sup>a</sup>	1.6570	0.8089	1.4080	0.8436	1.1590	6.8277	0.0960	8
SPA-MLR (13) <sup>a</sup>	1.4584	0.8523	0.8109	0.9328	3.4942	3.9324	-0.0246	-
<b>LBC</b>								
PLS	1.9590	0.7375	1.3634	0.8670	1.2219	6.6579	0.0961	9
5- <i>i</i> SPA-PLS (3) <sup>a</sup>	1.7535	0.7904	1.3688	0.8527	1.2123	6.6841	0.0084	9
10- <i>i</i> SPA-PLS (1) <sup>a</sup>	1.7270	0.7875	1.2406	0.8700	1.5455	6.0580	0.0603	7
15- <i>i</i> SPA-PLS (1) <sup>a</sup>	1.7948	0.7631	1.2788	0.8292	1.3889	6.2446	0.0065	6
20- <i>i</i> SPA-PLS (7) <sup>a</sup>	1.6687	0.8137	1.0746	0.9206	1.9669	5.2474	0.0167	9
SPA-MLR (10) <sup>a</sup>	1.7863	0.7791	0.7580	0.9467	3.9531	3.7014	-0.2197	-
<b>BO</b>								
PLS	2.3553	0.5575	1.6175	0.6298	0.7971	8.0237	0.0072	4
5- <i>i</i> SPA-PLS (1) <sup>a</sup>	1.9026	0.7356	1.3992	0.7316	1.0653	6.9412	0.0150	4
10- <i>i</i> SPA-PLS (1) <sup>a</sup>	1.8481	0.7510	1.2580	0.7903	1.3178	6.2405	9.7041e <sup>-4</sup>	4
15- <i>i</i> SPA-PLS (1) <sup>a</sup>	1.8535	0.7530	1.1732	0.8315	1.5152	5.8198	0.0195	4
20- <i>i</i> SPA-PLS (2) <sup>a</sup>	1.6823	0.7985	1.5532	0.6766	0.8645	7.7049	0.0281	4
SPA-MLR (16) <sup>a</sup>	1.5776	0.8376	1.5953	0.8035	0.8195	7.9137	0.4121	-

Fuente: propia. SNV: variable normal estándar; MSC: corrección de la dispersión multiplicativa; LBC: corrección lineal de la línea de base; BO: compensación de la línea de base. RMSECV: error cuadrático medio de validación cruzada;  $r_{CV}$ : coeficiente de correlación para validación cruzada; RMSEP: error cuadrático medio de predicción;  $r_{Pred}$ : coeficiente de correlación para predicción; RPD<sub>Pred</sub>: desviación residual predictiva para predicción;  $t_{calc}$ : valor  $t$  calculado;  $t_{crit}$ : valor  $t$  crítico; LV: variables latentes usadas en el modelo. REP: error relativo de predicción. <sup>a</sup> Número de intervalos o variables seleccionados por SPA (por ej. 10-*i*SPA-PLS (5): 5 intervalos/variables fueron seleccionados de 10 por el algoritmo SPA); <sup>b</sup>  $t_{crit} = 1.7247$ .

Entre todos los modelos construidos, SPA-MLR logró el mejor resultado utilizando los espectros NIR preprocesados con MSC. Para ello, SPA seleccionó 13 variables individuales: 4143, 4335, 4447, 4524, 4733, 5033, 5164, 5257, 5342, 7112, 7509, 8257 y 10000 cm<sup>-1</sup> (Figura 4.7.a); la mayoría de ellas principalmente en las absorciones de las bandas -OH y -NH



directamente correlacionadas con la información analítica de humedad y proteína, respectivamente. Sin embargo, también se incluyeron algunas variables en las absorciones de las bandas  $-CH$  y  $C-C$  de otros componentes del polen de abeja porque se generan modelos más estables cuando se seleccionan la mayoría de las regiones con información analítica, lo que conduce al error de predicción más bajo. Para el conjunto de calibración, el modelo MSC/SPA-MLR obtuvo valores RMSECV y  $r_{cv}$  de 1.4584 g/100 g y 0.8523, respectivamente; mientras que para la predicción RMSEP y  $r_{pred}$  fueron 0.8109 g/100 g y 0.9328, respectivamente. Asimismo, el RPD fue de 3.4942 y el REP fue solo de 3.9324%. La mejor predicción de este modelo se confirma con el valor de RPD superior a 3 [41]. Nuevamente, las muestras de predicción se distribuyen aleatoriamente en ambos lados de la recta (Figura 4.7.b), indicando la ausencia de error sistemático, lo cual es corroborado por la prueba del EJCR (Figura 4.7.c). La estrecha elipse que contiene el punto teórico ideal también confirma la buena precisión de la capacidad predictiva del modelo descripto.



**Figura 4.7.** Resultado de la determinación del contenido de proteína en polen de abejas argentino mediante SPA-MLR y los espectros NIR preprocesados con MSC: **a.** variables seleccionadas por SPA, **b.** gráfica de los valores predichos versus los de referencia y **c.** elipse de confianza del modelo de predicción incluido el punto ideal teórico. Fuente: propia.



### 4.4.2.3 Clasificación del polen de abeja según el contenido de proteínas

Inicialmente, se realizó un análisis exploratorio de los espectros NIR en base al contenido proteico inferior y superior a 20 g/100 g polen (Figura 4.8.a: en azul y rojo, respectivamente) empleando análisis de componentes principales (PCA). Como puede verse, aunque las dos componentes principales representan el 96,0% de la varianza explicada, los valores del análisis (Figura 4.8.b) muestran una alta superposición entre las muestras de las dos clases, lo que requiere la construcción de modelos de reconocimiento de patrones supervisados para poder resolver la mencionada situación. La tabla 4.4 muestra los resultados de la clasificación del polen de abejas estudiado utilizando diferentes espectros NIR preprocesados y algoritmos PLS-DA.

**Tabla 4.4.** Resultados de la **clasificación** de polen de abejas argentino en términos de contenido de proteína (superior a 20 g/100 g) utilizando diferentes espectros NIR preprocesados y algoritmos PLS-DA.

Clasificados	Técnicas de preprocesamiento Conjunto de muestras	SNV		MSC		LBC		BO	
		Entr.	Prueba	Entr.	Prueba	Entr.	Prueba	Entr.	Prueba
PLS-DA	LV	8		10		9		10	
	Sensibilidad	95.0	87.5	95.0	87.5	95.0	87.5	95.0	87.5
	Especificidad	95.8	100.0	95.8	81.8	95.8	100.0	95.8	100.0
	Exactitud	95.3	94.4	95.3	83.3	95.3	94.4	95.3	94.4
5- <i>i</i> SPA-PLS-DA	(LV)/(inter_sel)	(8) / (1)		(10) / (1)		(8) / (1)		(10) / (1)	
	Sensibilidad	100.0	75.0	100.0	62.5	100.0	75.0	100.0	62.5
	Especificidad	100.0	75.0	100.0	84.6	100.0	75.0	100.0	84.6
	Exactitud	100.0	72.2	100.0	72.2	100.0	72.2	100.0	72.2
10- <i>i</i> SPA-PLS-DA	(LV)/(inter_sel)	(8) / (1)		(10) / (1)		(9) / (1)		(10) / (1)	
	Sensibilidad	100.0	25.0	100.0	75.0	100.0	37.5	100.0	25.0
	Especificidad	100.0	68.7	100.0	58.3	100.0	73.3	100.0	75.0
	Exactitud	100.0	38.9	100.0	61.1	100.0	50.0	100.0	44.4
15- <i>i</i> SPA-PLS-DA	(LV)/(inter_sel)	(8) / (1)		(10) / (1)		(9) / (1)		(10) / (1)	
	Sensibilidad	100.0	75.0	100.0	62.5	100.0	37.5	100.0	50.0
	Especificidad	100.0	58.3	100.0	46.1	100.0	66.7	100.0	57.1
	Exactitud	100.0	61.1	100.0	44.4	100.0	44.4	100.0	44.4
20- <i>i</i> SPA-PLS-DA	(LV)/(inter_sel)	(10) / (2)		(10) / (1)		(9) / (1)		(10) / (1)	
	Sensibilidad	100.0	100.0	100.0	62.5	100.0	37.5	100.0	12.5
	Especificidad	100.0	80.0	100.0	61.5	100.0	53.3	100.0	76.5
	Exactitud	100.0	88.9	100.0	55.6	100.0	33.3	100.0	38.9

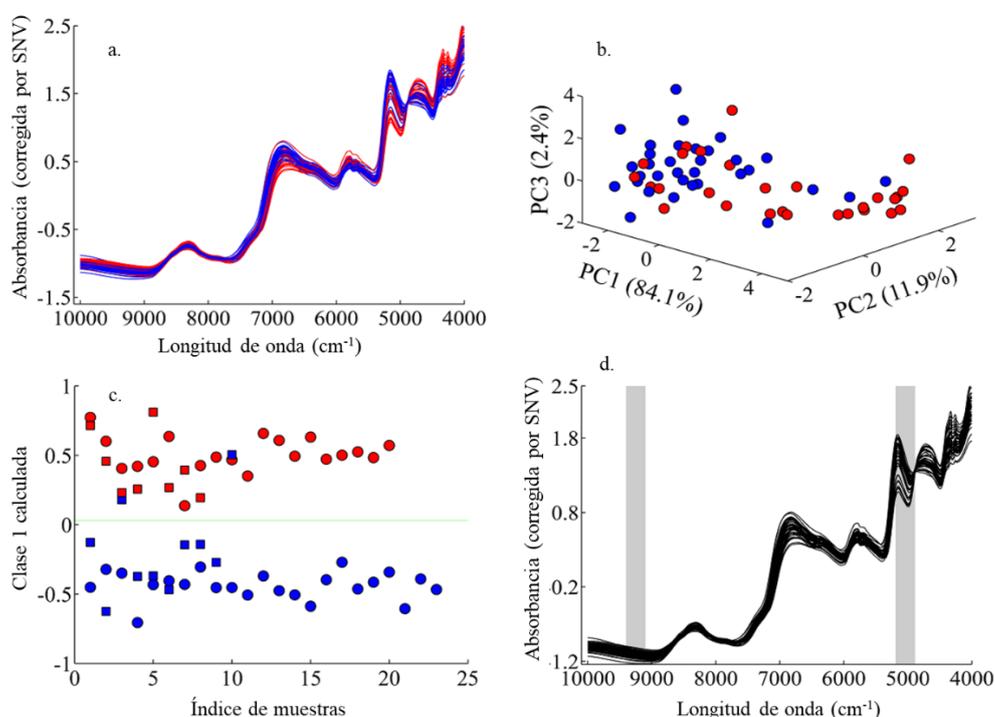
Fuente: propia. PLS-DA: análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales; *i*SPA-PLS-DA: algoritmo de las proyecciones sucesivas para la selección de intervalos en análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales. LV: variables latentes; inter\_sel: número de intervalos seleccionados por el algoritmo de las proyecciones sucesivas; Entr.: Entrenamiento. SNV: variable normal estándar; MSC: corrección de la dispersión multiplicativa; LBC: corrección lineal de la línea de base; BO: compensación de la línea de base.

Entre todos los modelos de clasificación, los modelos PLS contenían errores en la clasificación tanto en los conjuntos de entrenamiento y de prueba, independientemente del tipo de preprocesamiento utilizado. Esto probablemente se deba al uso de todo el espectro en el



modelado, que contiene información analítica altamente correlacionada. Sin embargo, cuando se utiliza SPA con selección de intervalos, los modelos *i*SPA-PLS-DA clasifican correctamente todas las muestras en el conjunto de entrenamiento empleando todas las divisiones de intervalo (5, 10, 15 y 20) y preprocesamiento (SNV, MSC, LBC, y BO). Sin embargo, solo el modelo SNV/20-*i*SPA-PLS-DA clasificó correctamente el 100% de las muestras de la clase 1 en los conjuntos de entrenamiento y prueba. En este caso, solo dos muestras de la clase 2 se clasificaron erróneamente como pertenecientes a la clase 1 en el conjunto de prueba (Figura 4.8.c), seleccionando 2 intervalos (Figura 4.8.d) directamente relacionados con la banda de combinación O-H del agua y el tercer sobretono de N-H y C-H de la proteína.

Estas dos muestras contienen 18,3% y 19,8% (p/p) de proteína lo que está notablemente cerca del límite de clases establecido, pero están dentro del error relativo de predicción de aproximadamente 3,93%, como se demostró en la sección anterior. En otras palabras, el modelo SNV/20-*i*SPA-PLS-DA presentó alta capacidad predictiva con 100% de sensibilidad, especificidad y precisión en la clase 1, lo que representa una buena alternativa para clasificar lotes de polen de calidad proteica diferenciada (Tabla 4.4).



**Figura 4.8.a.** Espectros NIR de muestras de polen de abeja argentino con contenido de proteína menor y mayor a 20 g/100 g (en azul y rojo, respectivamente) utilizados para obtener **b.** la gráfica de puntuaciones (scores) de PCA. **c.** Gráfico de respuesta obtenido para los intervalos seleccionados por el modelo 10-*i*SPA-PLS-DA (**d**) usando los espectros NIR preprocesados con SNV. Fuente: propia.



## 4.5 Conclusiones parciales

Los modelos *i*SPA-PLS y SPA-MLR presentaron mayor capacidad predictiva para la determinación de humedad y proteínas (respectivamente), con errores relativos de predicción de aproximadamente 5,76 y 3,93%.

Para la clasificación del polen de abeja como suplemento dietético (considerando un valor de contenido proteico mayor de 20%), *i*SPA-PLS-DA detectó correctamente todas las muestras en la clase objetivo, clasificando erróneamente solo dos muestras que contenían valores muy cercanos al umbral de clase como pertenecientes a la clase objetivo en el set de prueba. Aun así, los valores de ambas muestras estuvieron acordes con el valor de REP obtenido para la determinación de proteínas.

Por lo tanto, la metodología propuesta resulta ser una herramienta útil, rápida y de bajo costo para la determinación no destructiva y simultánea de humedad y contenido proteico de polen de abeja permitiendo declarar en los rótulos información nutricional complementaria para su comercialización. La clasificación en base al contenido proteico permite establecer productos con calidad diferenciada para su empleo en la industria alimenticia.

## 4.6 Bibliografía

- [1] S. Bogdanov, “Pollen : Production , Nutrition and Health : A Review”, *Bee Product Science*, 2014. [En línea]. Disponible en: [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net).
- [2] M. G. R. Campos *et al.*, “Pollen composition and standardisation of analytical methods”, *Journal of Apicultural Research*, vol. 47, núm. 2. pp. 154–161, 2008.
- [3] L. M. Estevinho, S. Rodrigues, y A. P. Pereira, “Portuguese bee pollen : Palynological study , nutritional and microbiological evaluation”, *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 47, pp. 429–435, 2012.
- [4] M. Kieliszek, K. Piwowarek, A. M. Kot, S. Błażej, A. Chlebowska-Śmigiel, y I. Wolska, “Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review”, *Trends in Food Science and Technology*, vol. 71. Elsevier Ltd, pp. 170–180, 01-ene-2018.
- [5] I. L. Pereira de Melo y B. L. de Almeida-Muradian, “Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples”, *Ciência e Tecnol. Aliment.*, vol. 31, núm. 1, pp. 194–197, 2011.
- [6] Luis G. Cornejo. *Polen. Tecnología de su producción, procesado y comercialización*,



- Editorial. La Plata, 1994.
- [7] X. Feas, M. P. Vazquez-Tato, L. Estevinho, J. A. Seijas, y A. Iglesias, “Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality”, *Molecules*, vol. 17, núm. 7, pp. 8359–8377, jul. 2012.
- [8] Ministerio de Agroindustria. Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas., *Código Alimentario Argentino - CAPÍTULO X*. Argentina. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>. [Consultado: 21-nov-2020].
- [9] A. A. M. De-Melo *et al.*, “Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters”, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 65, pp. 808–815, 2015.
- [10] Y. Puig-Peña, C. A. del-Risco-Ríos, V. Pazos Álvarez-Rivera, V. Leiva-Castillo, y R. García-Neninger, “Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado”, *Rev. CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 43, núm. 1, pp. 23–27, 2012.
- [11] B. Baldi Coronel, D. Grasso, S. Chaves Pereira, y G. Fernández, “Caracterización bromatológica del polen apícola argentino”, *Ciencia, Docencia y Tecnol.*, vol. 15, núm. 29, pp. 145–181, 2004.
- [12] L. B. Almeida-Muradian, L. C. Pamplona, S. Coimbra, y O. M. Barth, “Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets”, *J. Food Compos. Anal.*, vol. 18, núm. 1, pp. 105–111, 2005.
- [13] T. Szczêsna, “PROTEIN CONTENT AND AMINO ACID COMPOSITION OF BEE-COLLECTED POLLEN FROM SELECTED BOTANICAL ORIGINS”, *J. Apic. Sci.*, vol. 50, núm. 2, pp. 81–90, 2006.
- [14] F. Serdá, “Estudio de la calidad nutricional del polen recolectado por *Apis mellifera* (la abeja domestica) en un colmenar en el Bajo Delta Bonaerense.”, CAECE, 2008.
- [15] P. Vit y B. Santiago, “Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de los andes venezolanos”, *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 58, núm. 4, pp. 411–415, 2008.
- [16] C. Nogueira, A. Iglesias, X. Feás, y L. M. Estevinho, “Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins : A Comprehensive Approach”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, núm. 9, pp. 11173–11187, 2012.
- [17] I. Conti *et al.*, “Sugar and protein content in different monofloral pollens - Building a database”, *Bull. Insectology*, vol. 69, núm. 2, pp. 318–320, 2016.
- [18] H. Human y S. W. Nicolson, “Nutritional content of fresh , bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var . *davyana* ( *Asphodelaceae* )”, *Phytochemistry*, vol. 67, pp. 1486–1492, 2006.
- [19] R. Mărgăoan, L. A. Mărghitas, D. Dezmirean, C. M. Mihai, y O. Bobis, “Bee Collected Pollen – General Aspects and Chemical Composition”, *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Anim. Sci. Biotechnol.*, vol. 67, núm. 1–2, pp. 254–259, 2010.
- [20] P. Sáez-Plaza, A. García Asuero, y J. Martín, “An annotation on the Kjeldahl method”, *An. la Real Acad. Nac. Farm.*, vol. 85, núm. 1, pp. 14–19, 2019.

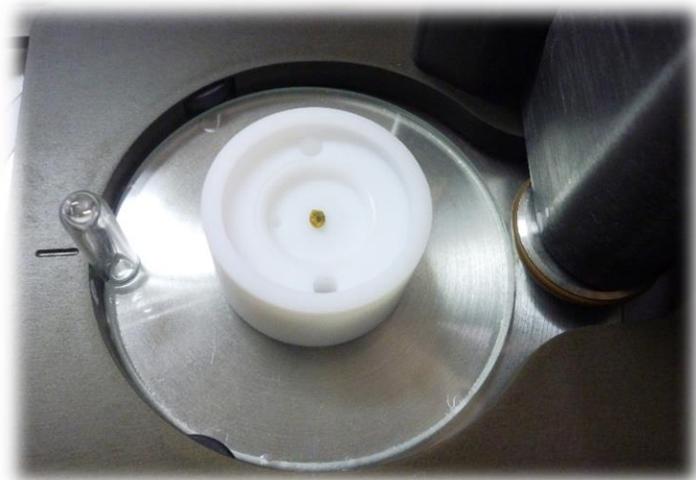


- [21] Y. Ozaki, T. Genkawa, y Y. Futami, *Near-infrared spectroscopy*, 3a ed. Elsevier Ltd., 2016.
- [22] M. Blanco y I. Villarroya, “NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool”, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 21, núm. 4, pp. 240–250, 2002.
- [23] I. González-Martín, J. M. Hernández-Hierro, N. Barros-Ferreiro, C. Cordón Marcos, y R. J. García-Villanova, “Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen”, *Talanta*, vol. 72, núm. 3, pp. 998–1003, 2007.
- [24] M. C. A. Costa, M. A. Morgano, M. M. C. Ferreira, y R. F. Milani, “Analysis of bee pollen constituents from different Brazilian regions: Quantification by NIR spectroscopy and PLS regression”, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 80, pp. 76–83, jul. 2017.
- [25] “Se impulsa un convenio de cooperación con el Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia | Argentina.gob.ar”. [En línea]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/se-impulsa-un-convenio-de-cooperacion-con-el-instituto-nacional-de-investigacion-agronomica>. [Consultado: 21-nov-2020].
- [26] E. Tamburini, G. Ferrari, M. G. Marchetti, P. Pedrini, y S. Ferro, “Development of FT-NIR models for the simultaneous estimation of chlorophyll and nitrogen content in fresh apple (*Malus Domestica*) leaves”, *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, núm. 2, pp. 2662–2679, 2015.
- [27] D. Cozzolino, “Near infrared spectroscopy in natural products analysis”, *Planta Med.*, vol. 75, núm. 7, pp. 746–756, 2009.
- [28] A. C. Andrada y M. C. Tellería, “Pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from south of Caldén district (Argentina): botanical origin and protein content”, *Grana*, vol. 44, núm. 2, pp. 115–122, 2005.
- [29] K. I. Saavedra C., C. Rojas I., y G. E. Delgado P., “Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque – Perú) Pollinic characteristics and chemical composition of bee pollen collected in Cayalti (Lambayeque – Peru)”, *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 40, pp. 71–78, 2013.
- [30] R. W. Kennard y L. A. Stone, “Computer Aided Design of Experiments”, *Technometrics*, vol. 11, núm. 1, pp. 137–148, 1969.
- [31] P. H. G. D. Diniz, M. F. Pistonesi, y M. C. U. Araújo, “Using iSPA-PLS and NIR spectroscopy for the determination of total polyphenols and moisture in commercial tea samples”, *Anal. Methods*, vol. 7, núm. 8, pp. 3379–3384, 2015.
- [32] G. Krepper *et al.*, “Determination of fat content in chicken hamburgers using NIR spectroscopy and the Successive Projections Algorithm for interval selection in PLS regression (iSPA-PLS)”, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 189, pp. 300–306, 2018.
- [33] “Stakich - Bee pollen”. [En línea]. Disponible en: [https://www.amazon.com/-/es/Stakich-Gránulos-natural-procesar-libras/dp/B001M06ZD8/ref=sxin\\_9\\_ac\\_d\\_rm?\\_\\_mk\\_es\\_US=ÅMÅŽÕÑ&ac\\_md=3-2-YmVIIHBvbGxlbjBidWxr-ac\\_d\\_rm&cv\\_ct\\_cx=bee+pollen&dchild=1&keywords=bee+pollen&pd\\_rd\\_i=B001M0](https://www.amazon.com/-/es/Stakich-Gránulos-natural-procesar-libras/dp/B001M06ZD8/ref=sxin_9_ac_d_rm?__mk_es_US=ÅMÅŽÕÑ&ac_md=3-2-YmVIIHBvbGxlbjBidWxr-ac_d_rm&cv_ct_cx=bee+pollen&dchild=1&keywords=bee+pollen&pd_rd_i=B001M0)



- 6ZD8&pd\_rd\_r=bb1627fc-0a09-42cc-8. [Consultado: 21-nov-2020].
- [34] “Sunfood Superfoods - Raw wild- crafted bee pollen.” [En línea]. Disponible en: <https://www.amazon.com/-/es/Sunfood-Superfoods-silvestres-Superalimento-intensidad/dp/B01N1UBRO9>. [Consultado: 21-nov-2020].
- [35] “Wellness Tree - Bee pollen”. [En línea]. Disponible en: [https://www.amazon.com/-/es/dp/B08H5RY9M2/ref=sr\\_1\\_10?\\_\\_mk\\_es\\_US=ÅMÅŽÕÑ&dchild=1&keywords=bee+pollen&qid=1601122534&sr=8-10](https://www.amazon.com/-/es/dp/B08H5RY9M2/ref=sr_1_10?__mk_es_US=ÅMÅŽÕÑ&dchild=1&keywords=bee+pollen&qid=1601122534&sr=8-10). [Consultado: 21-nov-2020].
- [36] B. K. Lavine, “Validation of Classifiers”, *Compr. Chemom.*, vol. 3, pp. 587–599, 2009.
- [37] D. Douglas De Sousa Fernandes *et al.*, “The successive projections algorithm for interval selection in partial least squares discriminant analysis”, *Anal. Methods*, vol. 8, núm. 41, pp. 7522–7530, nov. 2016.
- [38] A. Silva Busso, S. Amato, N. Seoane, y M. Pittau, “Aportes al conocimiento de la geología del subsuelo del delta del río paraná”, *Instituto Nacional de Agua. Informe LHA 03-235-04*. pp. 1–47, 2004.
- [39] O. Anjos, A. J. A. Santos, T. Dias, y L. M. Estevinho, “Application of FTIR-ATR spectroscopy on the bee pollen characterization”, *J. Apic. Res.*, vol. 56, núm. 3, pp. 210–218, may 2017.
- [40] K. H. Esbensen, P. Geladi, y A. Larsen, “ The RPD Myth... ”, *NIR news*, vol. 25, núm. 5, pp. 24–28, 2014.
- [41] P. Williams, “ The RPD Statistic: A Tutorial Note ”, *NIR news*, vol. 25, núm. 1, pp. 22–26, 2014.

## Capítulo 5



Análisis de proteínas totales y compuestos bioactivos  
en cargas individuales de polen corbicular



## 5.1 Objetivos

Los objetivos planteados en este capítulo fueron:

- A. Estudiar la variación del contenido proteico y compuestos bioactivos en **cargas corbiculares individuales** de polen.
- B. Determinar polifenoles totales para establecer el potencial bioactivo de cada carga corbicular empleando espectroscopía NIR y PLS.

## 5.2 Introducción

En nuestro país, el polen apícola se comercializa como suplemento nutricional para consumo humano. Sin embargo, en otros países su potencial es mucho más amplio debido a que se comienza a estudiar como ingrediente de otros alimentos; por ejemplo, para mejorar las propiedades nutricionales en panificados [1–4], yogures [5,6] y barras tipo snack [7] o para optimizar el proceso de producción como es el caso de elaboración de vinos e hidromiel [8-10]. Asimismo, la presencia de componentes bioactivos es la razón de que se esté considerando su uso como conservante natural de otros productos alimenticios [11,12] o que se lo esté incorporando a cosméticos [13–15]. Más aun, en algunas naciones es utilizado con fines terapéuticos [16–19].

En general se asume que el polen monofloral, a diferencia del multifloral, presenta una menor variabilidad composicional; aunque se ha demostrado que pueden aparecer variaciones relacionadas al suelo y al clima, incluso a la obtención en diferentes temporadas apícolas en un mismo sitio de estudio [20,21]. La posibilidad de definir analíticamente una monocarga podría ofrecer mejores oportunidades de comercialización debido principalmente a que se lograría establecer una “identidad química” sin necesidad del análisis entomopalinológico. Asimismo, como esta tecnología analítica puede ser utilizada en determinaciones “en línea” (on- line) como también en la monitorización de procesos industriales [22] posibilitaría la clasificación del polen corbicular para ser comercializado según sus diferentes usos. Esta situación permitiría desarrollar una nueva modalidad de procesamiento poscosecha de este producto apícola para ofrecerlo a los diferentes mercados e incluso, se podría lograr la comercialización de un producto “diferenciado” y, por lo tanto, con agregado de valor.



La observación sobre la variabilidad de esta matriz mencionada en todo el desarrollo de este trabajo de tesis denota una de las principales problemáticas que presenta este producto de la colmena para su comercialización. Paradójicamente también ha sido la fuente de inspiración de trabajos de investigación en todo el mundo con el fin de relacionarlo a una determinada zona geográfica productiva definiendo algunas características composicionales particulares, o para desarrollar nuevas metodologías analíticas que permitan determinar su calidad. En este sentido todos los trabajos referenciados estudiaron al polen apícola como un pool de cargas corbiculares (multi o monoflorales). Así, en este capítulo se propone estudiar la variación existente entre cargas corbiculares individuales respecto a componentes considerados marcadores de calidad nutricional (proteínas totales) o de propiedades bioactivas (polifenoles/flavonoides).

### **5.3 Materiales y métodos**

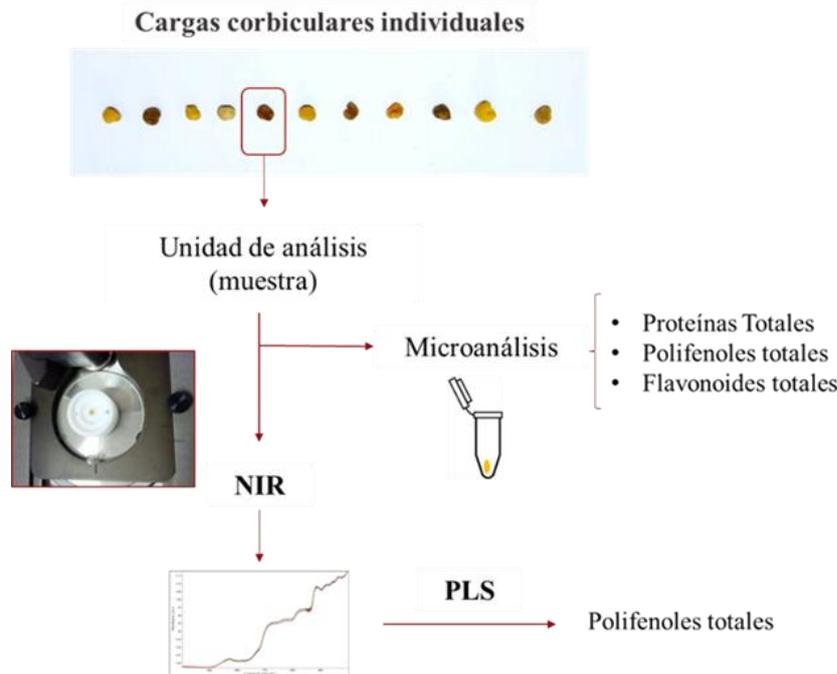
Todas las determinaciones realizadas en este capítulo se basaron en métodos analíticos de referencia que debieron adaptarse a la unidad de análisis. Asimismo, se utilizaron reactivos de calidad analítica. Todos los resultados se expresaron en base seca.

#### **5.3.1 Muestras**

En este capítulo se estableció como unidad de análisis (muestra) cargas corbiculares individuales extraídas de manera aleatoria simple a partir de los 50 lotes descritos en la sección 2.3.2 (Figura 5.1).

#### **5.3.2 Determinación de humedad**

La determinación se realizó por el método indirecto, que consiste en establecer la pérdida de peso que ha experimentado una carga de polen por calentamiento en estufa al vacío a 65°C y 45 mm Hg [23], durante 1 hora.



**Figura 5.1.** Determinación de la muestra y procedimiento analítico utilizados en este capítulo. Fuente: propia.

### 5.3.3 Determinación de proteínas totales

La cantidad de proteínas totales fue estimada a partir del contenido de nitrógeno en cada carga corbicular. Para ello se usó la metodología micro-Kjeldahl con sistemas de digestión y destilación semiautomática (Digestor Bloc-digest y destilador Pro-Nitro S J.P. SELECTA) y un titulador automático (Titro Line Easy con electrodo de pH SCHOTT).

El procedimiento experimental se inició pesando cada carga de polen (valor medio  $0,0091 \pm 0,0018$  g) para luego colocarla en un tubo de digestión al que se le incorporó 0,05 g de catalizador (94% p/p sulfato de potasio anhidro y 6% p/p sulfato cúprico pentahidratado, Cicarelli) y 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (Cicarelli). La digestión se realizó en tres etapas iniciando a 150 °C (15 minutos), luego a 300 °C (15 minutos) y finalmente a 400 °C (60 minutos).

En la unidad de destilación se adicionaron 30,0 mL de NaOH al 30% (v/v) (Anedra) produciéndose la liberación del amoníaco que fue colectado en un erlenmeyer conteniendo 10,0 mL de una solución de ácido bórico al 1% (p/v) (Cicarelli). Por último, se realizó la cuantificación del nitrógeno amoniacal mediante titulación ácido-base con una solución de ácido sulfúrico 0,0100 N. El contenido de proteína se calculó utilizando el factor de conversión de 6,25 y se expresó como porcentaje de proteína según lo establecido en el CAA [23].



### 5.3.4 Determinación de polifenoles y flavonoides totales

#### *Preparación de los extractos etanólicos*

Para las determinaciones de polifenoles y flavonoides totales se obtuvieron previamente los correspondientes extractos etanólicos (EE) en tubos eppendorf. Para ello a cada muestra previamente pesada se le agregó 1 ml de etanol 96% (v/v) (Biopack) y se agitó mecánicamente durante 24 horas a  $23 \pm 1$  °C al resguardo de la luz. El procedimiento de agitación se realizó en vortex durante períodos de quince minutos por hora empleando un temporizador analógico. Finalmente, la solución obtenida se centrifugó a 2000 rpm durante cinco minutos reservando el sobrenadante para el análisis de los compuestos bioactivos.

#### *Polifenoles totales*

El contenido de polifenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu [24] utilizando como patrón al ácido gálico (AG). Este método de referencia, emplea un reactivo compuesto por una mezcla de ácidos (fosfowolfrámico y fosfomolibdico) de coloración amarilla, que se reducen en presencia de los polifenoles, dando origen a óxidos de wolframio y molibdeno de coloración azul, los cuales son medidos por espectrofotometría UV-Vis [24].

Para realizar el procedimiento experimental se tomaron 500  $\mu$ L del EE, se adicionaron 500  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu, 2,0 mL de carbonato de sodio al 10% (p/v) y se llevó a volumen con agua destilada en matraz de 10,0 mL. Para completar la reacción de formación del complejo se dejó en oscuridad durante 2 horas y finalmente se realizaron las lecturas espectrofotométricas empleando un espectrofotómetro UV-Vis (Cary 60, Agilent Technologies). El contenido de polifenoles totales fue expresado como equivalentes de AG por gramo de polen [25–28].

#### *Flavonoides totales*

El contenido de flavonoides totales fue determinado por el método espectrofotométrico descrito por Chang y col. [29] basado en la formación de un complejo de aluminio utilizando rutina (R) como patrón.

El procedimiento experimental se inició mezclando 400  $\mu$ L del EE con 0,30 mL de una solución al 5% (p/v) de nitrato de sodio; luego de cinco minutos, se le incorporó 0,30 mL de una solución al 10% (p/v) de tricloruro de aluminio. Seguidamente se agregó 2,00 mL de una solución de hidróxido de sodio 1,0 M y se llevó a 5,00 mL con agua destilada. Finalmente se mantuvo en oscuridad por el lapso de 15 minutos y se realizó la lectura espectrofotométrica en el equipo



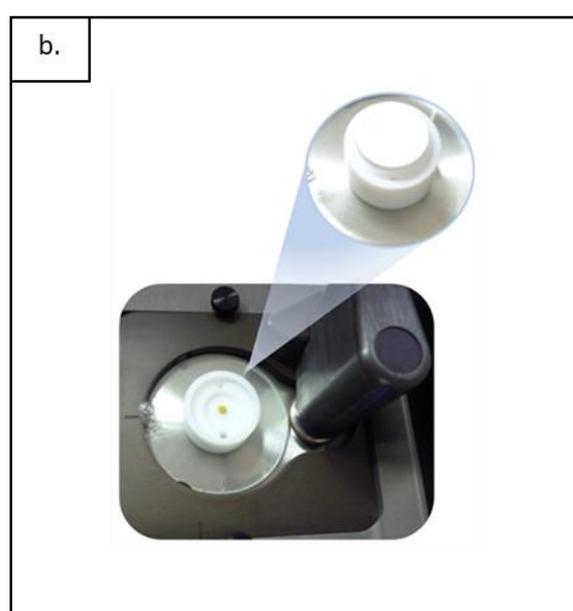
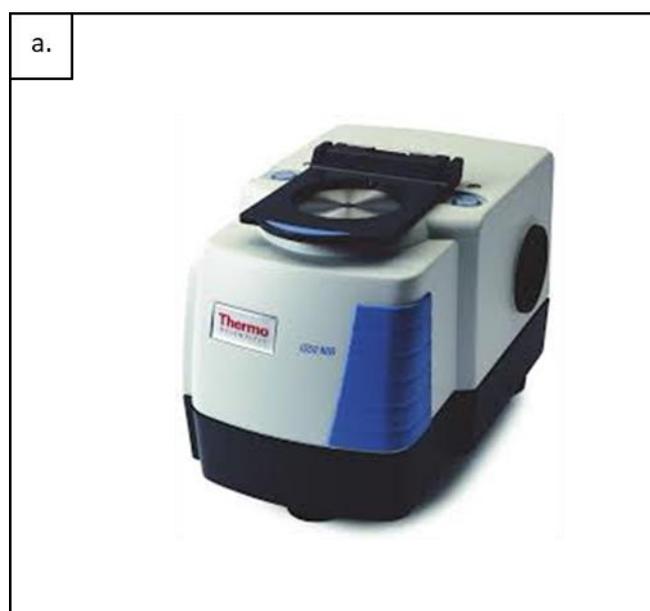
Spectronic Genesys 20 a 510 nm. El contenido de flavonoides totales se expresó como equivalentes de R por gramo de polen [25].

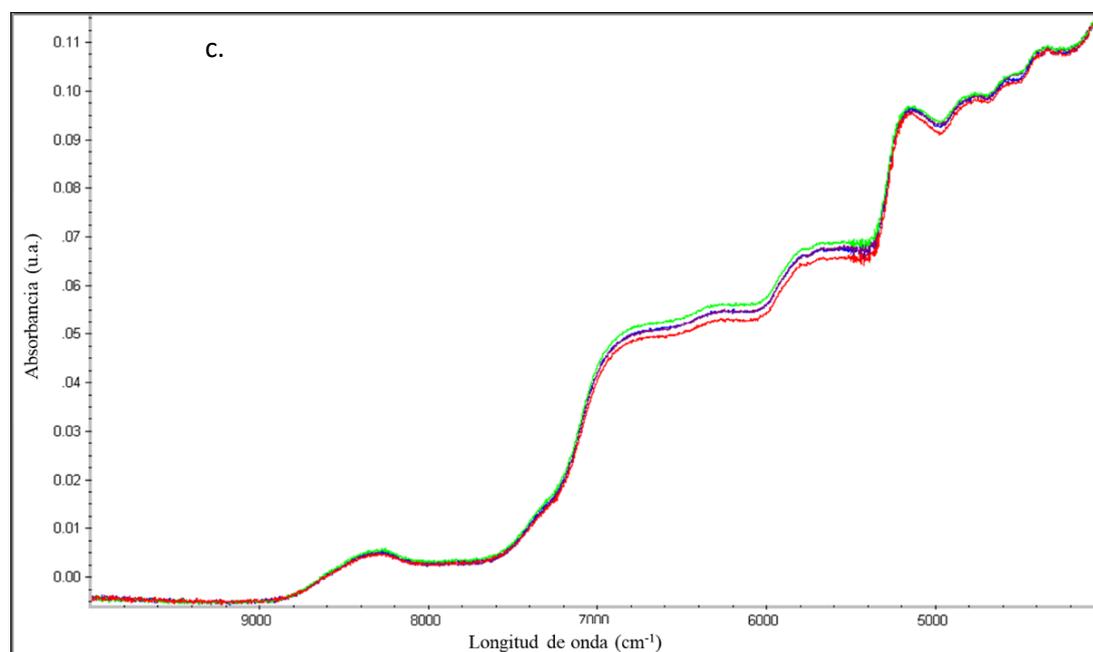
### 5.3.5 Obtención de espectros NIR

Los espectros de reflectancia de las cargas se obtuvieron empleando un espectrofotómetro FTIR-NIR Thermo Scientific Nicolet iS50 (Figura 5.2.a) en el rango de 10.000–4.000  $\text{cm}^{-1}$  a temperatura ambiente ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) efectuando cuatro mediciones por cada muestra (Figura 5.2.c). Se realizaron 64 escaneos con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Las cargas de polen fueron colocadas directamente sobre un soporte confeccionado especialmente para este fin. El mismo consistió en un disco de vidrio sobre el que se adhirió un cilindro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 31 mm de diámetro y 17 mm de altura al que se le realizó un orificio central de 1 mm (Figura 5.2.b). Para cada determinación espectral se colocó una tapa “lab-made” de PTFE (Figura 5.2.b).

El espectrofotómetro fue calibrado con un blanco externo que consistió en el soporte antes descrito sin la muestra y con la mencionada tapa. El posterior tratamiento de datos se realizó a través del uso del software OMNIC<sup>TM</sup>. Todos los procedimientos quimiométricos utilizados a lo largo del trabajo se implementaron utilizando Matlab® 2019a (Mathworks, EE. UU.) y The Unscrambler, versión 9.7.





**Figura 5.2.a.** Módulo NIR del espectrofotómetro FTIR Thermo Scientific Nicolet iS50 (LIUC, UNS). **b.** Soporte para las cargas corbiculares individuales construido en PTFE y la correspondiente tapa. **c.** Espectro de una de las muestras analizadas. Fuente: propia.

### 5.3.6 Procesamiento quimiométrico de los datos espectrales

Para evaluar el contenido de polifenoles totales de las cargas corbiculares se seleccionó un modelo quimiométrico de calibración multivariante de primer orden: PLS. Como los espectros NIR presentaron variaciones sistemáticas en la línea de base, antes de la construcción de los modelos quimiométricos se aplicaron tres métodos de preprocesamiento: SNV, MSC y suavizado Savitzky-Golay (SG) utilizando una ventana de 9 puntos de primer y segundo orden. Para el armado del modelo PLS se seleccionaron 57 y 20 muestras para los conjuntos de calibración y predicción respectivamente. Para ello se empleó el algoritmo de Kennard-Stonne (KS).



## 5.4 Resultados y discusión

### 5.4.1 Microanálisis de proteínas, polifenoles y flavonoides totales

En la tabla 5.1 se presentan los resultados obtenidos por los métodos de referencia para los parámetros de proteínas, polifenoles y flavonoides totales.

**Tabla 5.1.** Resultados de los análisis químicos de las muestras de polen apícola (cargas individuales).

		Valores obtenidos				
Parámetro	N	Mínimo	Máximo	Promedio	DE	CV
<b>Proteínas totales</b> (% p/p)	70	15,9	66,4	26,4	8,1	30,6
<b>Polifenoles totales</b> (mg EAG/ g)	119	0,8	43,4	14,1	7,7	54,3
<b>Flavonoides totales</b> (mg ER /g)	72	16,4	56,8	40,3	8,2	20,3

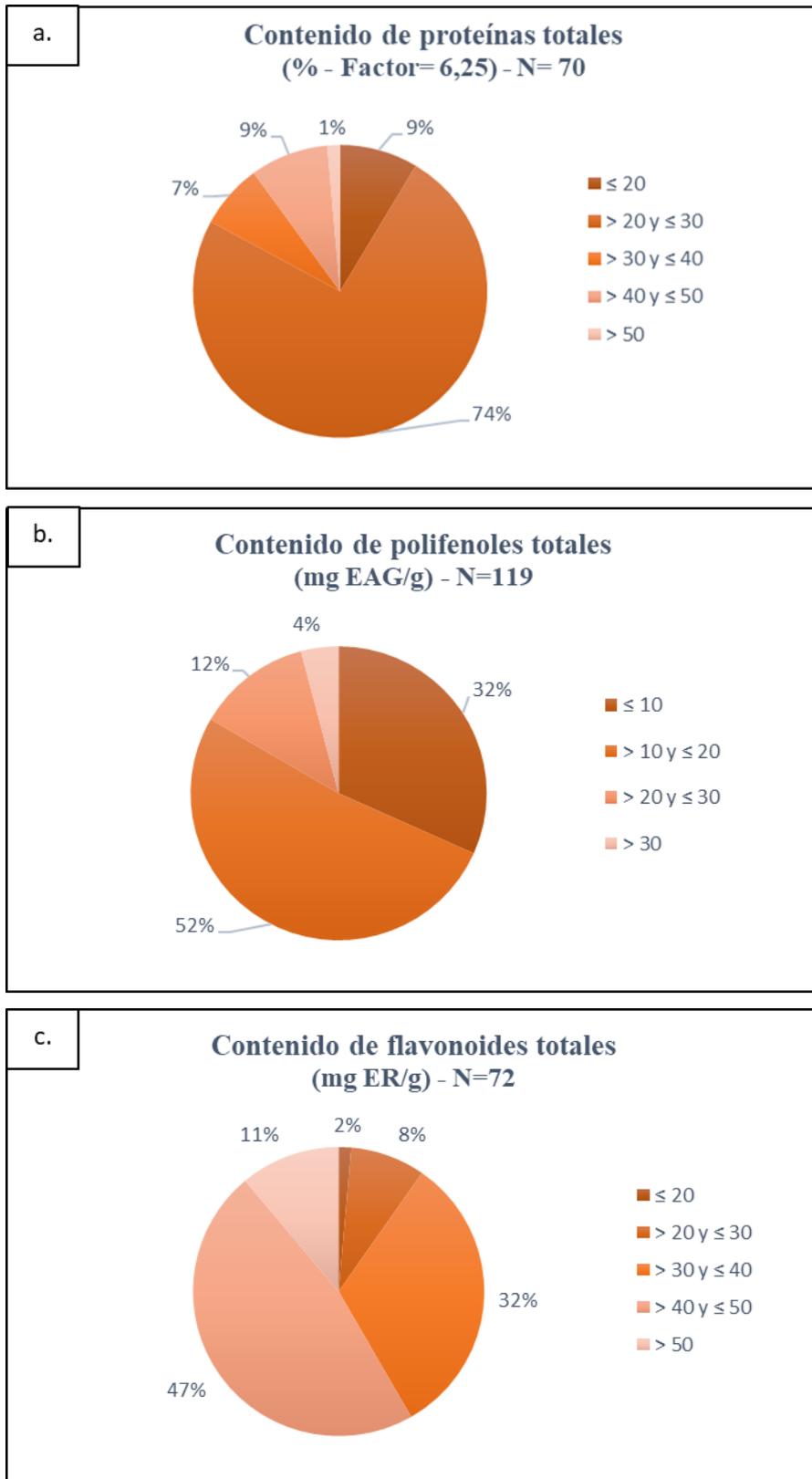
Fuente: propia. N= número de cargas. Coeficiente para cálculo de proteínas (Kjeldahl): 6,25. EAG: equivalente de ácido gálico; ER: equivalente de rutina; DE: desvío estándar; CV: Coeficiente de variación.

Como puede observarse existe una importante variación entre las muestras analizadas para cada parámetro composicional siendo el contenido de polifenoles el de mayor coeficiente de variación (CV). Esta situación puede atribuirse principalmente a las diferencias basadas en el origen botánico de las cargas individuales de polen; aunque también dentro de un mismo origen vegetal, existen variaciones respecto al contenido de componentes nutricionales y sustancias bioactivas según la composición genética del taxón considerado, la diversidad geográfica y el clima [18,30]. En este sentido las muestras procesadas pertenecen a distintos sitios geográficos y a temporadas apícolas diferentes con marcadas diferencias en las precipitaciones (Capítulo 3).

Por otra parte, en la figura 5.3 se muestra la distribución de valores obtenidos en los microanálisis de cargas corbiculares individuales para los diferentes parámetros considerados. Así se percibe que aproximadamente el 74% de las muestras analizadas presentan valores entre 20,0 y 30,0% de proteínas (Figura 5.3.a); el 52% poseen entre 10,0 y 20,0 mg EAG/ g de polen (Figura 5.3.b) y el 47% poseen valores entre 40,0 y 50,0 mg ER / g (Figura 5.3.c). Estos



resultados indicarían que el polen apícola analizado presenta buenas propiedades nutricionales y bioactivas.



**Figura 5.3.** Gráficos de distribución de valores obtenidos en los microanálisis de cargas corbiculares individuales para **a.** proteínas totales, **b.** polifenoles totales y **c.** flavonoides totales. Fuente: propia.



Las **proteínas** son el segundo componente más importante del polen y debido a ello se considera que son una fuente importante de este nutriente para la alimentación humana [31,32]. El contenido proteico de la mayoría de las cargas analizadas está comprendido en el rango de 15 a 28% establecido por el CAA [23] y, las restantes, lo superan (Figura 5.3.a). Los resultados obtenidos son coincidentes con otros estudios realizados en el territorio nacional en los que se informaron valores promedio entre 13,6 y 38,0% [33–35]. Asimismo, se publicaron valores semejantes en el sur de Brasil, Perú y Portugal-España [32,36–38]. Por otra parte, prácticamente la totalidad de las cargas superaron los valores obtenidos por Saavedra y col. [39] en muestras de polen separadas por color en Perú. Finalmente llama la atención el valor máximo obtenido en este trabajo, aunque Vit y Santiago [40] también reportaron valores altos en polen de abeja recolectado en Venezuela y separado por color; aun más, estos autores se refirieron a un amplio rango de contenido proteico con un valor máximo de aproximadamente 53%.

Los **polifenoles** conforman el grupo de los micronutrientes del polen de abeja. La presencia de dobles enlaces conjugados y la ubicación de grupos hidroxilo en el anillo aromático de sus moléculas (mayormente de los flavonoides y derivados del ácido cinámico) son los responsables de la actividad antioxidante. Debido a sus propiedades redox, estos compuestos juegan un papel importante en la estabilización de los radicales libres, la disminución del oxígeno o la descomposición de peróxidos. Se los considera componentes clave debido a que se los relaciona con los efectos terapéuticos y protectores descritos para este producto de la colmena [20,25,41–43].

En este trabajo, aproximadamente la mitad de las muestras analizadas mostró un contenido de polifenoles de 10.0 a 20.0 mg de EAG / g de polen y alrededor del 31% obtuvieron valores menores o iguales a 10,0 mg de EAG / g (Figura 5.3.b). Estos valores resultaron comparables con los obtenidos por Serra Bonvehí y col. [44] en España y por Neves y col. [26] en el SE y NE de Brasil. Valores más altos fueron publicados por investigadores brasileros [27,28] en muestras monoflorales del sur del vecino país. Asimismo, Aloisi y Ruppel [25] informaron valores altos para polen recolectado en dos zonas de la provincia de Chubut (sur de Argentina) aludiendo que las bajas temperaturas que prevalecen en la mencionada zona de muestreo aumentarían la producción de polifenoles de las especies vegetales locales.

Los **flavonoides** son pigmentos que cumplen una importante función en el crecimiento y defensa de las plantas. Son específicos de cada taxón vegetal y, en base a ello se ha propuesto una alternativa para determinar el origen botánico del polen de abeja [28]. Esta situación es la

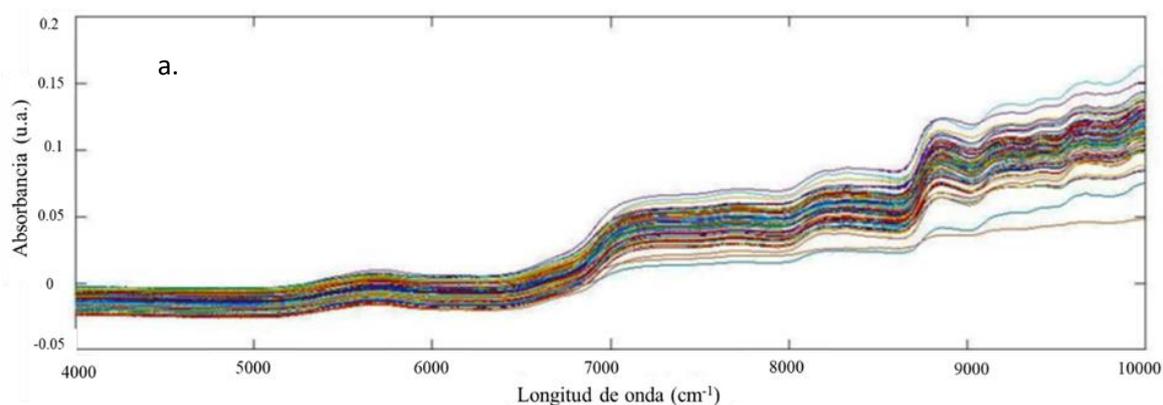


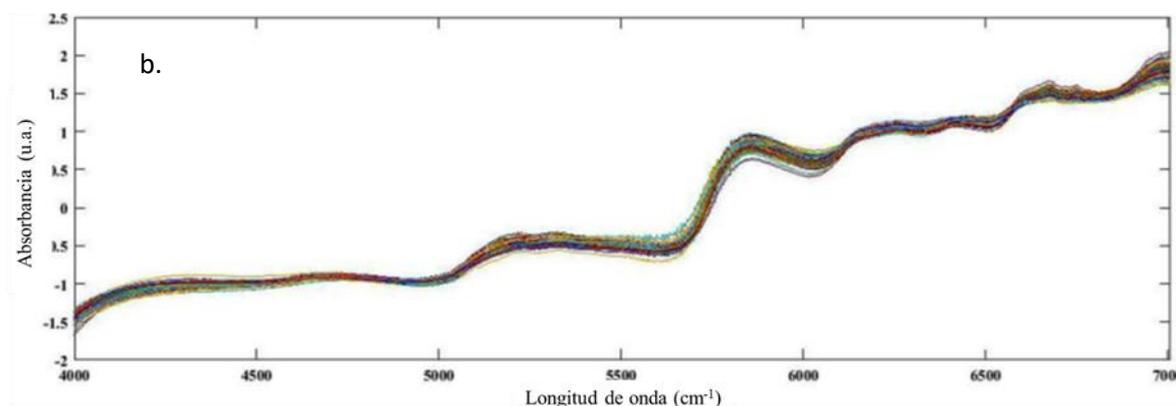
causa de la gran variabilidad del contenido de estas sustancias en el polen cosechado en diferentes zonas geográficas reportada en varios trabajos de investigación [25,27,37,44–46]. Como puede observarse en la figura 5.3.c, aproximadamente el 47% de las muestras presentaron valores entre 40 y 50 mg ER/g PBS los cuales pueden compararse con los obtenidos en polen recolectado en el oeste de España y en el sur de Argentina [25,44].

### 5.4.2 Determinación de polifenoles mediante espectroscopía NIR y PLS

Para determinar la concentración de polifenoles totales presentes en las cargas de polen, los datos espectrales obtenidos se analizaron mediante un modelo quimiométrico de calibración multivariada de primer orden PLS.

En la figura 5.4.a se puede observar los espectros de reflectancia NIR de las muestras estudiadas sin procesar. Para elaborar un modelo más robusto se seleccionó un rango espectral entre 4000 y 7000  $\text{cm}^{-1}$  debido a que esta región tiene una fuerte correlación con sustancias polifenólicas [47]. La figura 5.4.b. muestra los espectros en el rango espectral seleccionado con el preprocesamiento SNV.





**Figura 5.4.** Espectros de las cargas corbiculares de polen analizadas **a.** sin preprocesamiento (rango espectral de 4000 a 10000 cm<sup>-1</sup>) y **b.** preprocesados con SNV (rango espectral 4000 y 7000 cm<sup>-1</sup>). Fuente: propia.

La tabla 5.2 contiene los resultados obtenidos aplicando el modelo de regresión PLS empleando espectros con y sin procesamiento (SP). Para establecer la mejor predicción en el análisis se consideraron los valores de RMSEC, RMSEP, los respectivos coeficientes de correlación de los grupos de correlación y predicción, bias y el número de variables latentes (LV).

**Tabla 5.2** Resultados de la determinación de polifenoles totales en muestras de polen de abeja utilizando espectroscopia NIR y PLS.

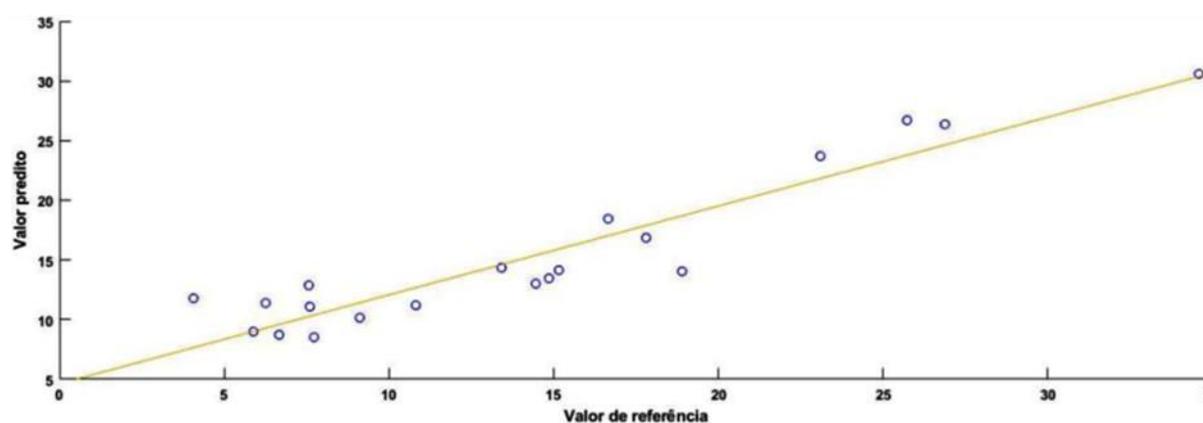
	Parámetro					
	RMSECV (mg GAE/g)	r <sub>CV</sub>	RMSEP (mg GAE/g)	r <sub>Pred</sub>	Bias	LV
SP	1.140	0.975	3.042	0.850	0.957	12
MSC	1.495	0.957	3.139	0.847	1.021	12
SNV	1.478	0.968	2.433	0.976	0.485	10
SG (9p) 1°	1.415	0.961	3.155	0.845	0.358	14
SG (9p) 2°	1.661	0.947	3.088	0.852	0.595	12

Fuente: propia. SP: Sin procesamiento; MSC: corrección de la dispersión multiplicativa; SNV: transformación variable normal estándar; SG (9p) 1° / 2°: suavizado Savitzky-Golay con ventana de 9 puntos de primero o segundo orden; RMSEC: error cuadrático medio de calibración; r<sub>CV</sub>: coeficiente de correlación para la calibración; RMSEP: error cuadrático medio de predicción; r<sub>Pred</sub>: coeficiente de correlación para la predicción; VL: variables latentes.



En la tabla anterior se observa que el empleo del pretratamiento SNV, para un rango de longitud de onda de 4000 a 7000  $\text{cm}^{-1}$ , mejoró los parámetros del modelo PLS principalmente en el conjunto de predicción con un aumento en el  $r_{\text{Pred}}$ . Asimismo, se puede decir que el modelo PLS pretratado con SNV es el más parsimonioso debido al uso de solo diez variables latentes.

La figura 5.5 muestra la representación del valor predicho versus el valor de referencia para las concentraciones de polifenoles totales en las cargas corbiculares individuales para el conjunto de **predicción** del modelo PLS pretratado con SNV.



**Figura 5.5.** Gráfico del valor predicho versus el valor de referencia para el conjunto de predicción. Fuente: propia.

## 5.5 Conclusiones parciales

En este apartado se utilizó microanálisis para analizar la variación del contenido de polifenoles, proteínas y flavonoides de las cargas corbiculares de polen de abeja recolectadas en la zona centro de Argentina. La mayor variabilidad se observó en los dos primeros mientras que el contenido de flavonoides presentó una variabilidad menor. De esta manera queda demostrada la alta variabilidad de este producto de la colmena relacionado principalmente con su origen botánico. Los valores obtenidos indicarían que el polen apícola de la región estudiada es una interesante fuente de proteínas y de sustancias bioactivas para poder ser utilizado como suplemento dietario. Asimismo, podría usarse como ingrediente de otros productos de la



industria alimenticia, farmacéutica o de cosmética. Para ello es imprescindible la determinación de la calidad endógena de cada carga para poder facilitar el rotulado de los diferentes productos comerciales.

En este sentido en este apartado también se presentó el desarrollo de una metodología simple, rápida y no destructiva basada en el uso de espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR) y regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), para la estimación de polifenoles totales en muestras de polen de abejas recolectadas en la zona central de Argentina. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando el preprocesamiento SNV y el modelo de PLS. La posibilidad de estudiar las muestras sin preparación previa conlleva una disminución significativa del tiempo de análisis en comparación con los métodos convencionales. Esta metodología permitiría el monitoreo de bajo costo de la calidad de las cargas corbiculares en relación a los componentes bioactivos prescindiendo del complicado análisis de origen botánico e, incluso, podría utilizarse como una importante herramienta para establecer el destino comercial o definir precios diferenciales.

Sería conveniente encontrar modelos adecuados para los otros parámetros considerados en este capítulo con el fin de poder establecer la calidad integral de este noble y completo producto de la colmena para una correcta utilización según sus características composicionales.

## 5.6 Bibliografía

- [1] D. Fazzina, “Pan con polen apícola”, Universidad Fasta, 2013.
- [2] M. Krystyjan, D. Gumul, R. Ziobro, y A. Korus, “The fortification of biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits”, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 63, núm. 1, pp. 640–646, 2015.
- [3] P. Conte, A. Del Caro, F. Balestra, A. Piga, y C. Fadda, “Bee pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: A physical-chemical, technological and sensory approach”, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 90, pp. 1–7, 2018.
- [4] P. Conte *et al.*, “Nutritional and aroma improvement of gluten-free bread: is bee pollen effective?”, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 118, pp. 1–7, 2020.



- [5] N. Lomova, S. Narizhnyi, y O. Snizhko, “Yoghurt enrichment with natural bee farming products”, *Ukr. Food J.*, vol. 3, núm. 3, pp. 415–421, 2014.
- [6] I. K. Karabagias, V. K. Karabagias, I. Gatzias, y K. A. Riganakos, “Bio-functional properties of bee pollen: The case of ‘bee pollen yoghurt’”, *Coatings*, vol. 8, pp. 1–15, 2018.
- [7] Q. Aini, A. Sulaeman, y T. Sinaga, “Development of bee pollen snack bar for school-aged children”, *J. Teknol. dan Ind. Pangan*, vol. 31, núm. 1, pp. 50–59, 2020.
- [8] A. Roldán, G. C. J. Van Muiswinkel, C. Lasanta, V. Palacios, y I. Caro, “Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics”, *Food Chem.*, vol. 126, núm. 2, pp. 574–582, 2011.
- [9] A. Amores-Arrocha, A. Roldán, A. Jiménez-Cantizano, I. Caro, y V. Palacios, “Effect on white grape must of multiflora bee pollen addition during the alcoholic fermentation process”, *Molecules*, vol. 23, pp. 1–16, 2018.
- [10] P. Sancho-Galán, A. Amores-Arrocha, A. Jiménez-Cantizano, y V. Palacios, “Use of multiflora bee pollen as a flor velum yeast growth activator in biological aging wines”, *Molecules*, vol. 24, pp. 1–14, 2019.
- [11] O. Anjos *et al.*, “Bee pollen as a natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in black pudding”, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 111, pp. 869–875, 2019.
- [12] J. de F. Almeida *et al.*, “Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages”, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 76, pp. 299–305, 2017.
- [13] A. Bouranen, “Determination of the stability of cosmetic formulations with incorporation of natural products”, 2017.
- [14] A. Kurek-Górecka, M. Górecki, A. Rzepecka-Stojko, R. Balwierz, y J. Stojko, “Bee products in dermatology and skin care”, *Molecules*, vol. 25, núm. 3. MDPI AG, p. 556, 28-ene-2020.
- [15] X. Xi *et al.*, “The potential of using bee pollen in cosmetics: A review”, *J. Oleo Sci.*, vol. 67, núm. 9, pp. 1071–1082, 2018.



- [16] K. Komosinska-Vassev, P. Olczyk, J. Kafmierczak, L. Mencner, y K. Olczyk, “Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application”, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, p. 6, 2015.
- [17] A. Rzepecka-Stojko *et al.*, “Polyphenols from Bee Pollen: Structure, absorption, metabolism and biological activity”, *Molecules*, vol. 20, pp. 21732–21749, 2015.
- [18] J. S. Araújo, E. D. Chambó, M. A. P. de C. Costa, S. M. P. C. da Silva, C. A. L. de Carvalho, y L. M. Estevinho, “Chemical composition and biological activities of mono- and heterofloral bee pollen of different geographical origins”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, núm. 5, p. 15, 2017.
- [19] K. Münstedt y S. Bogdanov, “Bee products and their potential use in modern medicine”, *J. ApiProduct ApiMedical Sci.*, vol. 1, núm. 3, pp. 57–63, 2009.
- [20] D. Aličić, D. Šubarić, M. Jašić, H. Pašalić, y Đ. Ačkar, “Antioxidant properties of pollen”, vol. 3, núm. 1, pp. 6–12, 2014.
- [21] M. Thakur y V. Nanda, “Composition and functionality of bee pollen: A review”, *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 98, pp. 82–106, 2020.
- [22] B. M. Nicolai *et al.*, “Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review”, *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 46, núm. 2, pp. 99–118, 2007.
- [23] Ministerio de Agroindustria. Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas., *Código Alimentario Argentino - CAPÍTULO X*. Argentina.
- [24] V. L. Singleton, R. Orthofer, y R. M. Lamuela-Raventós, “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent”, *Methods Enzymol.*, vol. 299, pp. 152–178, 1999.
- [25] P. V. Aloisi y Ruppel S., “Propiedades bioactivas y nutricionales del polen apícola de la provincia”, *Argentina ARTÍCULOS RIA*, vol. 40, núm. 3, pp. 296–302, 2014.
- [26] L. C. NEVES, S. M. de ALENCAR, y S. T. CARPES, “Determination of antioxidant activity, total phenolic compounds and total flavonoids of samples of apicultural pollen from *Apis mellifera*”, *Braz. J. Food Technol.*, núm. VII, 2009.



- [27] S. T. Carpes *et al.*, “CyTA -Journal of Food Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen”, 2013.
- [28] K. R. L. Freire, A. C. S. Lins, M. C. Dórea, F. A. R. Santos, C. A. Camara, y T. M. S. Silva, “Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil”, *Molecules*, vol. 17, núm. 2, pp. 1652–1664, 2012.
- [29] C. C. Chang, M. H. Yang, H. M. Wen, y J. C. Chern, “Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods”, *J. Food Drug Anal.*, vol. 10, núm. 3, pp. 178–182, 2002.
- [30] X. Feas, M. P. Vazquez-Tato, L. Estevinho, J. A. Seijas, y A. Iglesias, “Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality”, *Molecules*, vol. 17, pp. 8359–3377, 2012.
- [31] T. Szczêsna, “Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen from selected botanical origins”, *J. Apic. Sci.*, vol. 50, núm. 2, pp. 81–90, 2006.
- [32] C. Nogueira, A. Iglesias, X. Feás, y L. M. Estevinho, “Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins : A Comprehensive Approach”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, núm. 9, pp. 11173–11187, 2012.
- [33] B. Baldi Coronel, D. Grasso, S. Chaves Pereira, y G. Fernández, “Caracterización bromatológica del polen apícola argentino”, *Ciencia, Docencia y Tecnol.*, vol. 15, núm. 29, pp. 145–181, 2004.
- [34] A. C. Andrada y M. C. Tellería, “Pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L .) from south of Caldén district (Argentina): botanical origin and protein content”, *Grana*, vol. 44, núm. 2, pp. 115–122, 2005.
- [35] F. Serdá, “Estudio de la calidad nutricional del polen recolectado por *Apis mellifera* (la abeja domestica) en un colmenar en el Bajo Delta Bonaerense.”, CAECE, 2008.
- [36] L. B. Almeida-Muradian, L. C. Pamplona, S. Coimbra, y O. M. Barth, “Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets”, *J. Food Compos. Anal.*, vol. 18, núm. 1, pp. 105–111, 2005.



- [37] S. T. Carpes, “Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil”, *Brazilian J. Food Technol.*, vol. 12, núm. 3, pp. 220–229, 2009.
- [38] D. M. Saavedra-Carhuatoco, F. Aguinaga-Castro, C. Rojas-Idrogo, y G. E. Delgado-Paredes, “Analysis of Pollen Loads Collected By Honey Bees (*Apis Mellifera* L.) From Lambayeque Province (Peru): Botanical Origin and Protein Content”, *J. Glob. Biosci.*, vol. 3, núm. 1, pp. 285–298, 2014.
- [39] K. I. Saavedra C., C. Rojas I., y G. E. Delgado P., “Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque – Perú) Pollinic characteristics and chemical composition of bee pollen collected in Cayalti (Lambayeque – Peru)”, *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 40, pp. 71–78, 2013.
- [40] P. Vit y B. Santiago, “Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de los andes venezolanos”, *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 58, núm. 4, pp. 411–415, 2008.
- [41] A. Rzepecka-Stojko *et al.*, “Protective effect of polyphenol-rich extract from bee pollen in a high-fat diet”, *Molecules*, vol. 23, núm. 4, pp. 1–18, 2018.
- [42] M. Mosić *et al.*, “Phenolic composition influences the health-promoting potential of bee-pollen”, *Biomolecules*, vol. 9, núm. 12, pp. 1–14, 2019.
- [43] B. Denisow y M. Denisow-Pietrzyk, “Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review”, *Journal of the science of food and agriculture*, vol. 96, núm. 13, pp. 4303–4309, 01-oct-2016.
- [44] J. Serra Bonvehi, M. Soliva Torrentó, y E. Centelles Lorente, “Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain”, *J. Agric. Food Chem.*, 2001.
- [45] S. Bogdanov, “Pollen : Nutrition , Functional Properties , Health”, *Bee Prod. Sci.*, núm. August, pp. 1–31, 2016.
- [46] N. Mayda, A. Özkök, N. Ecem Bayram, Y. C. Gerçek, y K. Sorkun, “Bee bread and bee pollen of different plant sources: determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles”, *J. Food Meas. Charact.*, vol. 14, núm. 4, pp. 1795–



1809, ago. 2020.

- [47] A. M. Inarejos-García, S. Gómez-Alonso, G. Fregapane, y M. D. Salvador, “Evaluation of minor components, sensory characteristics and quality of virgin olive oil by near infrared (NIR) spectroscopy”, *Food Res. Int.*, vol. 50, núm. 1, pp. 250–258, 2013.

## Capítulo 6



Evaluación de un extracto etanólico de propóleos como  
preservante de polen apícola destinado al  
consumo humano



## 6.1 Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar un método de conservación de polen apícola “fresco” destinado al consumo humano empleando EEP (extracto etanólico de propóleos) a través de un ensayo cuantitativo *in vitro* de actividad antimicrobiana.

## 6.2 Introducción

El **polen apícola** es uno de los alimentos naturales más completos de la actualidad debido a su composición. Por esta razón, en los últimos años, se comenzó a considerarlo como un “alimento funcional”. Este concepto adiciona al valor nutritivo intrínseco de un alimento tradicional, una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y/o la reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad a la persona que lo consuma [1–5].

En Argentina es consumido mayormente como un suplemento nutricional y los parámetros para evaluar su calidad están regulados en el artículo 785 (Capítulo X: Alimentos Azucarados) del CAA [6]. En general, se considera que los controles microbiológicos en alimentos funcionan como un indicador de las prácticas higiénicas realizadas en un determinado proceso productivo [7]. Los análisis microbiológicos del polen apícola también están contemplados en la mencionada reglamentación argentina con la intención de alcanzar la inocuidad para su comercialización. En el caso particular de este producto de la colmena, la baja calidad microbiológica revela malas prácticas de manipulación desde la cosecha en el apiario hasta el fraccionado para su comercialización e, incluso, durante el almacenamiento [7–9].

El polen apícola recién recolectado (“fresco”) posee una cantidad indeterminada de microorganismos relacionados al propio origen vegetal (filosfera), a las condiciones ambientales de la fuente floral y a la interacción directa de las abejas durante el armado de las cargas corbiculares [7]. El desarrollo y la multiplicación de los mismos se produce en el período que transcurre entre la formación de la carga y el proceso de recolección y/o procesamiento por el apicultor. Esto es debido a que la composición química de esta matriz lo convierte en un excelente medio de cultivo a causa de la presencia de numerosos nutrientes [5,7,8,10,11]. Asimismo, el contenido de agua (aproximadamente entre 20 y 30 %) y las condiciones climáticas predominantes en las zonas productoras (generalmente climas templados y



tropicales) favorecen la proliferación de la microbiota que se encuentra en las cargas corbiculares desde que son “descargadas” en los contenedores de las trampas. Por otra parte, una elevada cantidad de agua favorece el desarrollo de reacciones químicas y enzimáticas que conllevan a su deterioro [3,7–9,11]. En relación a esto último es valioso el concepto de la actividad acuosa ( $a_w$ , por su sigla en inglés: water activity). En una determinada matriz alimenticia este parámetro hace referencia a la cantidad de agua disponible que permite el desarrollo microbiano [10-12]. De esta manera la  $a_w$  se relaciona directamente con la vida de anaquel o vida útil, aunque también es determinante en las características sensoriales [10,12].

Uno de los procesamientos más utilizados en todo el mundo para poder comercializar el polen apícola es el secado. Como se describió en capítulos anteriores, esta es una etapa crítica debido principalmente a que la temperatura debe ser controlada para preservar las características químicas y los componentes bioactivos [5,9,13]. Numerosos trabajos se han dedicado al estudio de la temperatura adecuada para alcanzar este objetivo, pero actualmente no se ha logrado un consenso internacional al respecto, al igual que el tiempo necesario o, incluso, el valor de humedad que debería alcanzar el polen. Por otra parte, también se han descrito otras tecnologías de conservación para el polen “fresco” como, por ejemplo, la utilización de freezer (con eventual uso de nitrógeno) o de un liofilizador [3,5,10,14,15] aunque los parámetros de ambos procesamientos tampoco cuentan con una estandarización ni están incluidos en normativa alguna. Además, ambas son opciones de alto costo [11] debido al equipamiento necesario o a la logística de almacenamiento y distribución (particularmente en el segundo caso).

Una alternativa interesante sería la combinación de **polen de abejas con propóleos**. Este último es otro producto apícola de características totalmente diferentes al primero. Es una sustancia resinosa que las abejas recolectan de algunas plantas y que mezclan con cera y secreciones mandibulares para utilizarlo con fines mecánicos y sanitarios dentro de la colmena [16,17]. El mismo puede ser cosechado por los apicultores a través de diferentes métodos obteniendo así el denominado “propóleos bruto”. Composicionalmente presenta un 50% de resinas (fracción donde se encuentran las sustancias bioactivas) y el 50% restante se compone mayormente de ceras e impurezas [18].

La actividad biológica del propóleos se debe principalmente al contenido de polifenoles, entre los cuales, particularmente los flavonoides, son los responsables de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Debido a ello ha sido utilizado por la medicina tradicional en



varios países desde hace varios años [1,17,19]. Actualmente está siendo estudiado como un conservante natural de alimentos para reemplazar algunos aditivos sintéticos [17,20]. En la industria alimenticia los conservantes son imprescindibles para prolongar la vida útil de un alimento. Entre ellos los principales son los agentes antimicrobianos y los antioxidantes; los primeros para evitar una posible contaminación por microorganismos, incluidos los patógenos. Los segundos para evitar la descomposición debido a procesos como la peroxidación lipídica y el enranciamiento durante el almacenamiento [17].

En los últimos años se ha comenzado a estudiar la utilización de diferentes agentes antimicrobianos naturales para reemplazar sus equivalentes sintéticos en diversas matrices alimenticias [21]. Aunque esta alternativa de conservación tiene algunas limitaciones vinculadas a aspectos físico-químicos y sensoriales, se han reportado buenos resultados incorporando estas sustancias como recubrimientos comestibles [17,22]. En este sentido, numerosos investigadores han estudiado cómo extender la vida de anaquel de los alimentos mediante el uso de propóleos debido a su doble función de antioxidante y antimicrobiano; además de atribuírsele baja toxicidad [17,23–25].

En este contexto, el objetivo de este capítulo fue estudiar una nueva metodología de conservación para el polen fresco destinado al consumo humano utilizando como agente preservante un EEP. Para ello, se llevó adelante un ensayo cuantitativo *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana del EEP sobre cargas corbiculares de polen que no fueron expuestas al proceso de secado.

## **6.3 Materiales y métodos**

### **6.3.1 Muestras de polen y propóleos**

La recolección del polen utilizado se realizó según la descripción presentada en el capítulo 2 con algunas modificaciones. Básicamente se conformó una mezcla de polen obtenido a través de las trampas colocadas en las colmenas del apiario de Hilario Ascasubi en una sola fecha (24 horas) durante el mes de marzo de 2017. Las cargas corbiculares (CC) utilizadas para el ensayo fueron elegidas al azar de una fracción de la mencionada mezcla. Ésta se reservó sin el proceso de secado en un recipiente estéril con tapa a rosca en heladera (4 °C) por un período de tiempo no mayor a una semana hasta su procesamiento.



El propóleo bruto empleado para elaborar el EEP se obtuvo a partir de la colocación de mallas plásticas en un apiario ubicado en la localidad de Villa Manzano, perteneciente al Alto Valle del Río Negro (provincia de Río Negro, Argentina).

### **6.3.2 Caracterización química del EEP**

El EEP fue preparado disolviendo propóleo bruto en etanol de acuerdo a Gallez y colaboradores [26]. Básicamente se colocaron 10,0 g de propóleo molido en 100 mL de alcohol etílico al 96% (v/v). La solución fue almacenada a  $23 \pm 2$  °C en la oscuridad por una semana. La extracción de compuestos bioactivos se favoreció a través de la agitación mecánica por períodos de treinta minutos dos veces al día. Finalmente, la solución fue filtrada con papel de filtro Whatman N° 40 y luego almacenada en la heladera (4 °C) hasta su utilización.

La solución obtenida se caracterizó químicamente según la Norma Argentina IRAM-INTA 15935-2 [27]. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **6.3.2.1 Determinación de extracto seco:**

El porcentaje del valor de extracto seco (ES) se determinó secando 20,0 mL de EEP en estufa a  $100 \pm 2$  °C hasta peso constante y se expresó como gramos de extracto seco en 100 mililitros de extracto.

#### **6.3.2.2 Cuantificación de polifenoles totales:**

El contenido de polifenoles totales se determinó por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60) [28] y utilizando ácido gálico (AG; 98,0% Sigma-Aldrich) como sustancia patrón. Los resultados fueron expresados como gramos equivalentes de AG por 100 gramos de extracto seco.

#### **6.3.2.3 Determinación de flavonoides totales:**

El contenido de flavonoides totales se determinó por el método espectrofotométrico basado en la formación de un complejo de aluminio utilizando como sustancia patrón quercetina (Q;



95,0% Sigma-Aldrich). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 454 nm (espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60). La concentración se expresó como gramos equivalentes de Q por 100 gramos de extracto seco.

#### **6.3.2.4 Espectro Uv-Vis:**

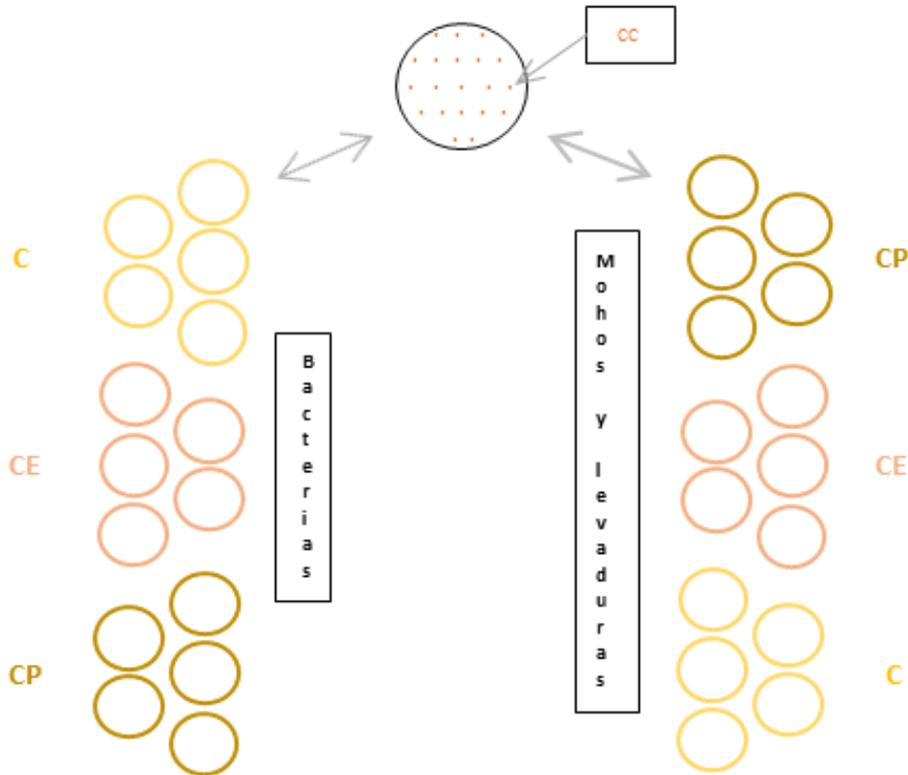
El espectro de absorción molecular UV-Vis se obtuvo a partir de una dilución del EEP en etanol (1:10000). Las mediciones se realizaron entre 240 a 420 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60.

#### **6.3.3 Análisis microbiológicos:**

La actividad antimicrobiana del EEP sobre CC de polen fresco se probó en un ensayo *in vitro* [9] utilizando un medio de cultivo específico para bacterias mesófilas heterotróficas cultivables (BMHC) y otro para mohos/levaduras (ML) durante 26 días. Brevemente, se llevaron a cabo tres tratamientos: un control con las CC sin agregado de aditivo (C); un control de solvente que consistió en CC embebidas con 5,00  $\mu\text{L}$  de etanol al 96% (CE) y CC humedecidas con 5,00  $\mu\text{L}$  de EEP (CP). Se realizaron tres réplicas por tratamiento para cada tipo de microorganismo. Cada réplica consistió en cinco placas con 20 CC por placa (un total de 100 CC por réplica) que se procesaron según el tratamiento correspondiente (Figura 6.1).

Las BMHC se estudiaron en agar para recuento en placa (PCA, Britania®) con nistatina (Sigma) a 35 °C, mientras que los ML se contaron en agar con dextrosa (Sabouraud, Bioclar) a 25 °C. Se observaron y registraron las colonias de ambos tipos de microorganismos cada 48 h durante 26 días. Finalmente, la actividad antimicrobiana del extracto utilizado se expresó como un porcentaje de las CC con desarrollo microbiológico visible.

Cabe destacar que se realizaron ensayos preliminares para estudiar el volumen de extracto de propóleos más conveniente. Se trabajó con 5,00 y 7,50  $\mu\text{L}$  de EEP y no se observaron diferencias significativas en la actividad antimicrobiana del extracto.



**Figura 6.1.** Esquema de los tres tratamientos utilizados en el ensayo *in vitro* para evaluar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de propóleos contra bacterias aerobias mesófilas y mohos/levaduras en cargas corbiculares (CC) de polen. Cada círculo representa una placa de Petri (con las 20 CC). Se grafica solo una de las réplicas realizadas y todos los tratamientos ensayados (identificados con colores diferentes). C: control de CC; CE: control de CC con etanol; CP: CC con el EEP. Fuente: Propia.

### 6.3.4 Análisis estadísticos:

El ensayo se realizó siguiendo un modelo completamente al azar. Los datos de los recuentos para BMHC y ML se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza de un factor. Cuando se detectó un valor F significativo, las medias se compararon con dos pruebas: la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD, por su sigla en inglés: Least Significant Difference) ( $p < 0.05$ ) y Bonferroni ( $p \leq 0.01$ ). Para el análisis estadístico se utilizó el software Excel (Microsoft Office versión 2013).

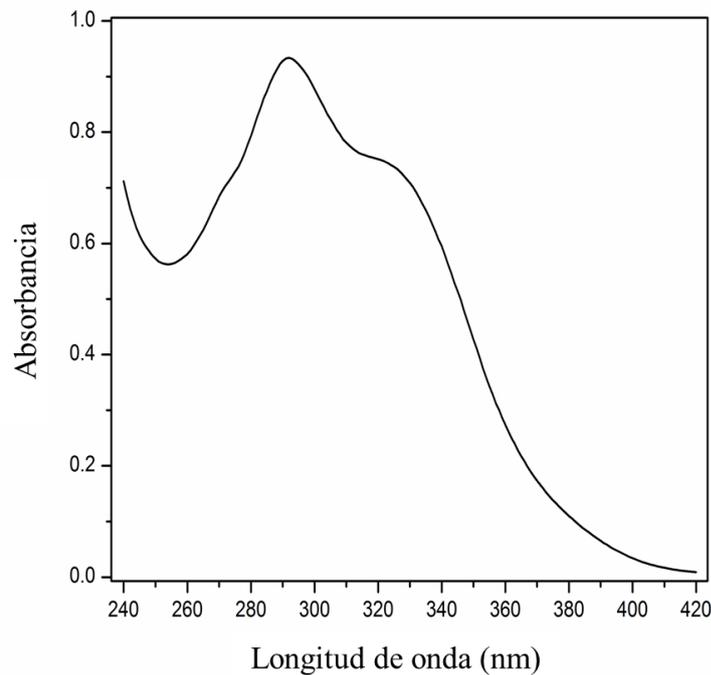


## 6.4 Resultados y discusión

El propóleo bruto, al igual que el polen, presenta una gran variabilidad composicional relacionada con la fuente vegetal utilizada por la abeja para producirlo. Por lo tanto, sus características físico-químicas y funcionales dependen básicamente de las condiciones climáticas y fitogeográficas del sitio de obtención como así también de la estación del año. También influye la especie de la abeja recolectora, las preferencias que éstas tengan por determinadas fuentes botánicas y del método de “cosecha” utilizado por el apicultor [17,29]. Por esta razón se considera que su composición química es realmente compleja. Comprende cerca de 160 compuestos activos entre los que se destacan los compuestos polifenólicos, principales responsables de su acción antimicrobiana y antioxidante [29,30]. Estos compuestos protegen a los tejidos vegetales sensibles debido a que absorben radiación en la región UV del espectro electromagnético, propiedad que es utilizada para su caracterización. En este sentido, se presume la presencia de sustancias polifenólicas si se registra un máximo de absorbancia entre 270 y 315 nm. Además, varios tipos de propóleos presentan una banda característica a 290 nm [18]. Por todo lo antedicho, cualquier estudio que implique la utilización de propóleos debe contemplar su caracterización química ya que la misma garantiza el uso de un producto de buena calidad en cuanto a su actividad biológica [17,19].

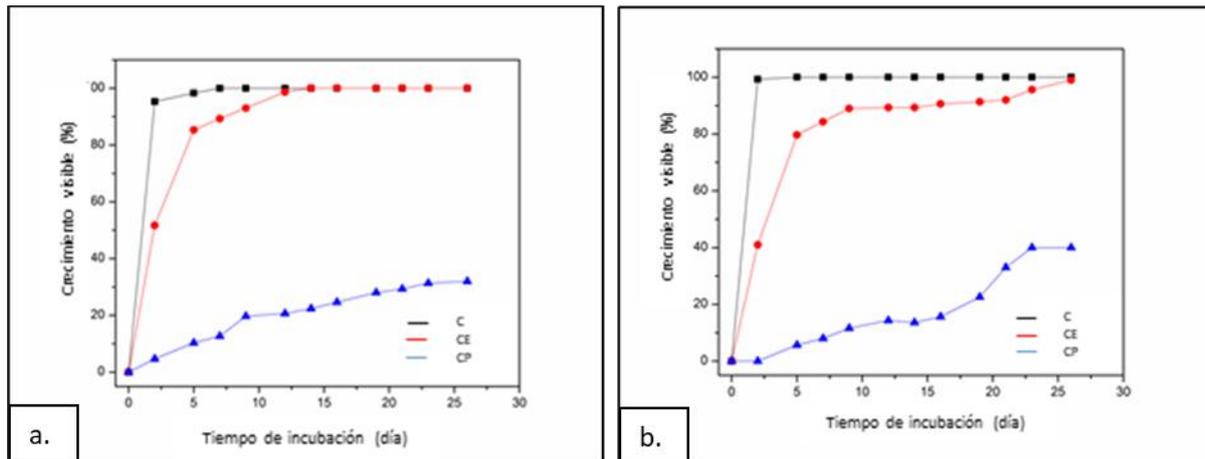
En el caso particular del EEP utilizado en esta tesis para probar la actividad antimicrobiana sobre CC de polen se obtuvo un espectro que se condice con lo descripto anteriormente (Figura 6.2). Se destaca la presencia de una banda de absorción a 290 nm y un hombro entre 320 y 330 nm confirmando la presencia de sustancias bioactivas. Este resultado está en concordancia con el obtenido por Bedascarrasbure y colaboradores [30] para los espectros de propóleos provenientes de la zona “Patagonia Norte”, región de procedencia del propóleos bruto utilizado para la obtención del EEP.

El porcentaje de ES fue de  $12,52 \pm 0,08$  g /100 mL. El contenido total de polifenoles y flavonoides fue de  $27,10 \pm 0,32$  g de EAG / 100 g ES y  $8,86 \pm 0,23$  g de EQ / 100 g ES respectivamente. Estos resultados estuvieron dentro del rango de valores permitidos por la normativa argentina [27] y, asimismo, confirman la presencia de sustancias bioactivas. De esta manera se determinó que el EEP era adecuado para la realización del ensayo microbiológico.



**Figura 6.2.** Espectrograma UV-Vis del EEP utilizado. Fuente: Propia

Los resultados del ensayo cuantitativo *in vitro* se muestran en la figura 6.3. Se advirtió un excelente rendimiento del EEP como conservante natural de las CC en relación a ambos controles. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre tratamientos a partir del segundo día de incubación. En relación al desarrollo bacteriano (Figura 6.4.A) se observó que alrededor de la mitad de las CC pertenecientes al tratamiento CE y casi la totalidad de las CC pertenecientes al tratamiento C mostraron crecimiento de BMHC después de 48 horas de incubación. Por otra parte, se registró un comportamiento similar en el desarrollo fúngico en los tratamientos control (C y CE) (Figura 6.4.B). Sin embargo; las CC de los tratamientos CP nunca mostraron colonias ni de BMHC como así tampoco de ML después de las 48 horas de incubación, ni siquiera durante los 26 días de duración del ensayo.



**Figura 6.3.** Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleos (EEP) en cargas corbiculares frescas de polen apícola. Se expresó la inhibición como porcentaje de crecimiento visible de **a.** bacterias (BHMC) y **b.** de hongos y levaduras (ML) en los tres tratamientos ensayados control de CC (C); control de solvente (CE) y CC con EEP (CP). Fuente: Propia.

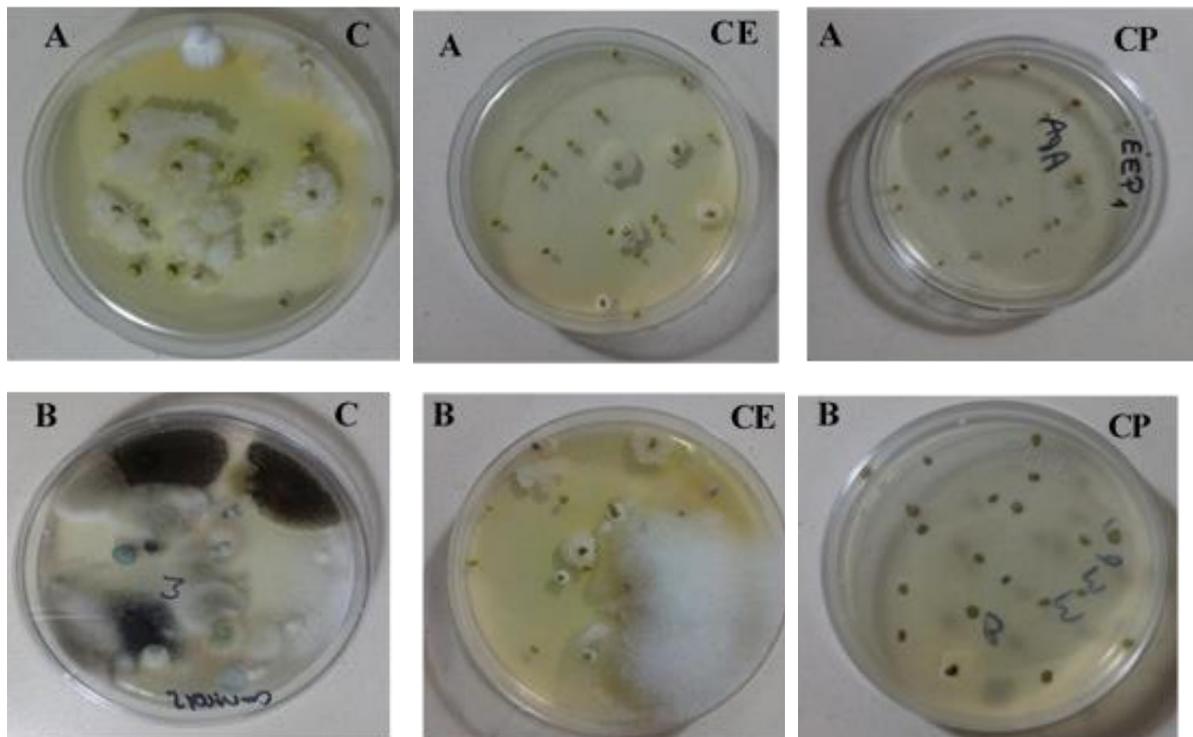
Estos resultados sustentan la necesidad de implementar algún tipo de procesamiento para evitar el rápido desarrollo microbiano que ocurre en el polen fresco. En este sentido también es relevante el “manejo a campo” del apicultor que lo cosecha, siendo aconsejable la recolección diaria para evitar la multiplicación de la microbiota natural en el recipiente recolector de la trampa de polen. Asimismo, se debe prestar especial atención a una correcta manipulación (cuidando las prácticas higiénicas) durante la recolección y el traslado hasta el lugar de procesamiento [3,5]. También es recomendable que este último, cualquiera sea (secado, liofilizado o conservación en freezer), se realice en el menor tiempo posible para preservar la calidad y la estabilidad del producto [5,8,9].

En el tratamiento CP, solo el 30% de las CC presentaron desarrollo de BMHC (Figura 6.3.a) y el 40% de las CC mostraron desarrollo fúngico (Figura 6.3.b) luego de los 26 días durante los cuales se prolongó el ensayo. Por otra parte, ambos controles (C y CE) nunca alcanzaron estos valores después de cinco días de incubación; más aún, ninguno de ellos mostró un efecto inhibitor similar al de los tratamientos con EEP (Figura 6.3). De esta manera se pudo confirmar que la actividad antimicrobiana se debía a la existencia de sustancias bioactivas en el EEP y no al alcohol utilizado como disolvente para la obtención del mismo.

En este sentido los resultados obtenidos en este capítulo podrían presumir la utilización de un EEP como conservante (antimicrobiano) natural del polen fresco, extendiendo su vida útil al menos por 26 días sin hacer uso de sistemas de refrigeración. Este concepto se condice con las



experiencias de algunos autores que publicaron mejoras en la poscosecha de papaya, la maduración de queso Gouda y en la conservación de puré de papas utilizando extractos de propóleos como recubrimientos comestibles o como ingrediente en el proceso de elaboración [23–25].



**Figura 6.4.** Ensayo cuantitativo *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana del EEP contra BMHC (A) y ML (B) sobre CC de polen fresco durante 26 días. Registro fotográfico de una placa de Petri (de una réplica) correspondiente a cada uno de los tres tratamientos: Control de CC sin aditivos (C); control del etanol (CE) y CC con 5.00 µL de EEP (CP). Fuente: Propia.

Es relevante mencionar que la inhibición microbiana que ejerció el EEP se dio en un rango de temperatura comprendida entre las óptimas de incubación para las BHMC y los MY, es decir entre los 25 y 35 °C. De esta manera, se logró extender la vida útil de este alimento prescindiendo de la refrigeración con el costo que ello implica. Aplicando un razonamiento inverso al anterior, se podría considerar otra metodología de preservación superadora, combinando el uso del EEP y algún sistema de enfriamiento como cámaras o heladeras. En este sentido, además de evaluar una mejora en la cantidad de días (más de 26) sería interesante considerar un estudio costo-beneficio para evaluar la viabilidad de esta alternativa de conservación de polen apícola fresco.



Desde otro punto de vista, es muy importante señalar que la adición de propóleos aumentaría el valor nutricional del producto obtenido (CC de polen con EPP) además de mejorar su vida útil, como observaron algunos investigadores en otras formulaciones combinadas de productos de abejas como miel con polen o con propóleos [10,31]. Así, la combinación de productos apícolas, potenciaría la posibilidad de utilizarlos como alimentos funcionales. En este sentido, es fundamental tener conocimiento previo de cada una de las matrices utilizadas en la combinación, debido a que las características nutricionales y la presencia de principios bioactivos en varios de ellos dependen principalmente del origen botánico [5,25,32]. Asimismo, comercialmente se podría pensar en la generación de agregado de valor para los productos de la colmena utilizados en la preparación del nuevo alimento funcional.

## 6.5 Conclusiones parciales

En este trabajo se evaluó el empleo de un EEP como agente preservante natural de polen fresco embebiendo las CC con 5  $\mu$ L del extracto. Se puede concluir que el EEP utilizado presenta actividad antimicrobiana contra bacterias y mohos/levaduras en CC de polen, con más del 50% de inhibición de crecimiento durante 26 días a las temperaturas óptimas de crecimiento de los grupos microbianos estudiados. De esta manera, el uso de un extracto de propóleos podría convertirse en una alternativa de agente conservante para el polen apícola comercial destinado al consumo humano. Así se podría reemplazar el “discutido” proceso de secado evitando la pérdida de sustancias bioactivas (por malas prácticas de procesamiento) o incluso, se reducirían los costos en comparación con las otras dos alternativas tecnológicas mencionadas (utilización de freezer o liofilizador).

Finalmente, cabe destacar que, en base a una extensa revisión bibliográfica, los estudios microbiológicos que se describieron en este capítulo de tesis son los primeros en presentar al polen combinado con propóleos para prolongar su vida útil. Si bien esta metodología de conservación para el polen apícola resulta sumamente promisoría, serán necesarios nuevos estudios y evaluaciones para considerarla como una alternativa de preservación viable desde el punto de vista tecnológico. Asimismo, puede resultar interesante la evaluación sensorial de diversas combinaciones de polen y propóleos de diferentes orígenes (incluyendo matrices monoflorales), como también el estudio físico-químico de las mismas.



## 6.6 Bibliografía

- [1] S. T. Carpes, R. Begnini, S. M. De Alencar, y M. L. Masson, “Study of preparations of pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity”, *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 31, núm. 6, pp. 1818–1825, 2007.
- [2] L. M. Estevinho, S. Rodrigues, y A. P. Pereira, “Portuguese bee pollen : Palynological study , nutritional and microbiological evaluation”, *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 47, pp. 429–435, 2012.
- [3] R. Mărgăoan, L. A. Mărghitas, D. Dezmirean, C. M. Mihai, y O. Bobis, “Bee Collected Pollen – General Aspects and Chemical Composition”, *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Anim. Sci. Biotechnol.*, vol. 67, núm. 1–2, pp. 254–259, 2010.
- [4] A. Rzepecka-Stojko *et al.*, “Polyphenols from Bee Pollen: Structure, absorption, metabolism and biological activity”, *Molecules*, vol. 20, pp. 21732–21749, 2015.
- [5] S. Bogdanov, “Pollen : Nutrition , Functional Properties , Health”, *Bee Prod. Sci.*, núm. August, pp. 1–31, 2016.
- [6] Ministerio de Agroindustria. Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas., *Código Alimentario Argentino - CAPÍTULO X*. Argentina.
- [7] Y. Puig-Peña, C. A. del-Risco-Ríos, V. Pazos Álvarez-Rivera, V. Leiva-Castillo, y R. García-Neninger, “Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado”, *Rev. CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 43, núm. 1, pp. 23–27, 2012.
- [8] M. G. R. Campos *et al.*, “Pollen composition and standardisation of analytical methods”, *J. Apic. Res.*, vol. 47, núm. 2, pp. 156–163, 2008.
- [9] B. Baldi Coronel, D. Grasso, S. Chaves Pereira, y G. Fernández, “Caracterización bromatológica del polen apícola argentino”, *Ciencia, Docencia y Tecnol.*, vol. 15, núm. 29, pp. 145–181, 2004.
- [10] S. Sagona, R. Bozzicolonna, R. Nuvoloni, G. Cilia, B. Torracca, y A. Felicioli, “Water activity of fresh bee pollen and mixtures of bee pollen-honey of different botanical origin”, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 84, pp. 595–600, 2017.
- [11] A. A. M. De-Melo *et al.*, “Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters”, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 65, pp. 808–815, 2015.
- [12] M. L. Carrillo Inungaray y A. Reyes Munguía, “Vida útil de los alimentos / Lifetime food”, *CIBA Rev. Iberoam. las Ciencias Biológicas y Agropecu.*, vol. 2, núm. 3, p. 32, 2013.
- [13] J. Barajas, M. Cortes-Rodríguez, y E. Rodríguez-Sandoval, “Effect of temperature on the drying process of bee pollen from two zones of Colombia”, *J. Food Process Eng.*, vol. 35, núm. 1, pp. 134–148, 2012.



- [14] J. G. Ribeiro y R. a Silva, “Estudio comparativo da qualidade de pólen apícola fresco, recém processado, não processado e armazenado em freezer e pólen de marca comercial através de análises físico-químicas”, *Tecnol. Desenvolv. Sustentável*, pp. 33–47, 2007.
- [15] I. Cinkmanis, F. Dimins, y V. Mikelsone, “Influence of Lyophilization and convective type drying on antioxidant properties, total phenols and flavonoids in pollens”, pp. 201–203, 2017.
- [16] M. Marcucci, “Propolis : chemical composition , biological properties and therapeutic activity”, *Apidologie*, vol. 26, núm. 2, pp. 83–99, 1995.
- [17] V. Bankova, M. Popova, y B. Trusheva, “New emerging fields of application of propolis”, *Maced. J. Chem. Chem. Eng.*, vol. 35, núm. 1, pp. 1–11, 2016.
- [18] E. Bedascarrasbure, L. Maldonado, W. F. Morales, y A. Alvarez, *Propóleos. Caracterización y normalización de propóleos argentinos*. Tucumán, Argentina.: Ed. Magna, 2006, 218 p.
- [19] M. P. Popova *et al.*, “Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin”, *Apidologie*, vol. 38, pp. 306–311, 2007.
- [20] J. Figueroa, J. Salcedo, Y. Aguas, R. Olivero, y G. Narváez, “Recubrimientos comestibles en la conservación del mango y aguacate, y perspectiva al uso del propóleo en su formulación.”, *Rev. Colomb. Cienc. Anim. - RECIA*, vol. 3, núm. 2, pp. 386–400, 2011.
- [21] R. Gyawali, S. A. Hayek, y S. A. Ibrahim, “Plant extracts as antimicrobials in food products: Types”, en *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, Elsevier Ltd, 2015, pp. 31–47.
- [22] H. Aloui y K. Khwaldia, “Natural Antimicrobial Edible Coatings for Microbial Safety and Food Quality Enhancement”, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 15, núm. 6, pp. 1080–1103, 2016.
- [23] N. H. Bahtiti, “Study of Preservative Effect of ‘Propolis’ on the Storage Quality of Mashed Potatoes”, *Food Sci. Technol.*, vol. 1, núm. 2, pp. 17–20, 2013.
- [24] E. Barrera Bello, M. Gil Loaiza, C. M. García Pajón, D. L. Durango Restrepo, y J. H. Gil González, “Empleo de un Recubrimiento Formulado con Propóleos para el Manejo Poscosecha de Frutos de Papaya (Carica papaya L. cv. Hawaiana)”, *Rev. Fac. Nac. Agron.*, vol. 65, núm. 1, pp. 6497–6506, 2012.
- [25] D. S. Khalaf, A. O. Rustem, y P. H. Sharef, “Waxing of gouda cheese by using bee wax with different concentration of propolis.”, *J. Agric. Sci. Technol. B*, vol. 4, núm. 6, pp. 501–507, 2014.
- [26] L. Gallez, M. Kiehr, L. Fernández, R. Delhey, y D. Stikar, “Antifungal activity in vitro of propolis solutions from Argentina against two plant pathogenic fungi: *Didymella bryoniae* and *Rhizotocnia solani*”, *J. Apic. Res.*, vol. 53, núm. 4, pp. 438–440, 2014.
- [27] *Norma, I. I. (2008). 15935-2. Extractos de Propóleos*. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización.
- [28] V. L. Singleton, R. Orthofer, y R. M. Lamuela-Raventós, “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent”,



- Methods Enzymol.*, vol. 299, pp. 152–178, 1999.
- [29] R. M. Retamoso, G. B. Ruiz, y M. B. Ahrendts, “Antifungal Activity in Propolis Extracts Obtained in Jujuy, Argentina”, *Int. J. Appl. Chem.*, vol. 6, núm. 3, pp. 1–5, 2019.
- [30] E. Bedascarrasbure, L. Maldonado, A. Alvarez, y E. Rodríguez, “Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos Argentino”, *Acta Farm. Bonaer.*, vol. 23, núm. 3, pp. 369–372, 2004.
- [31] S. M. Osés, L. Melgosa, A. Pascual-Maté, M. A. Fernández-Muiño, y M. T. Sancho, “Design of a food product composed of honey and propolis”, *J. Apic. Res.*, vol. 54, núm. 5, pp. 461–467, 2016.
- [32] S. Bogdanov y V. Bankova, “The Propolis Book”, 2016. [En línea]. Disponible en: [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net).

## Capítulo 7



Conclusiones



## Conclusiones generales

En un contexto en el que la rentabilidad apícola es escasa si solo se contempla la extracción de miel de las colmenas, la posibilidad de la diversificación productiva a través de la producción de polen surge como una interesante alternativa. El polen de abeja es un producto natural con muchas propiedades nutricionales y bioactivas de alta variabilidad composicional dependiendo principalmente del origen botánico. Así el análisis entomopalinológico permitió clasificar el polen obtenido en la zona central de Argentina como así también validar su origen. En este sentido las muestras analizadas presentaron taxones compatibles con la descripción fitogeográfica de los sitios de muestreo destacándose la familia Brassicaceae con predominio de *Diplotaxis tenuifolia*; aunque también hubo una presencia importante de los géneros *Lotus* y *Eucalyptus*. Asimismo, se observó la posible obtención de polen monofloral de estos taxones según el sitio de recolección, época del año y condiciones climáticas.

Con respecto a la calidad relacionada con la composición química se logró desarrollar una metodología rápida y de bajo costo empleando una técnica no destructiva para la determinación simultánea de humedad y contenido proteico. Asimismo, se realizó una clasificación teniendo en cuenta el contenido de proteína que permite establecer polen con calidad diferenciada para su empleo en la industria alimenticia. Por otra parte, se pudo comprobar la alta variabilidad en el contenido de polifenoles, flavonoides y proteínas a través de microanálisis de cargas corbiculares individuales siendo el primer parámetro el que presentó el mayor coeficiente de variación. Asimismo, se determinó el contenido de polifenoles totales en las mencionadas cargas polínicas utilizando NIR y quimiometría generando un precedente analítico para esta matriz con potencial uso en el procesamiento poscosecha lo cual permitiría definir su destino comercial.

Finalmente se evaluó un método de preservación de polen apícola fresco empleando un extracto etanólico de propóleos logrando una inhibición de más del 50% en el crecimiento de bacterias mesófilas heterótrofas y mohos/levaduras en cargas corbiculares individuales durante 26 días en un rango de temperaturas de 25° a 35° C.

Anexos



## ANEXO I

### 1. Técnica de wodehouse

Esta técnica se utiliza para realizar una observación rápida de los granos de polen.

1. Tomar una pequeña cantidad de la carga corbicular utilizando una aguja histológica y colocarla sobre un porta-objeto.
2. Agregar una gota de colorante (fucsina en solución alcohólica) y una pequeña porción de glicerina-gelatina.
3. Calentar sobre mechero suavemente hasta que se funda la glicerina-gelatina homogeneizando con una aguja de disección.
4. Colocar el cubre-objeto y sellar con esmalte de uñas.

### 2. Técnica de acetólisis (Erdtman, 1960)

Esta técnica elimina el contenido celular del grano de polen y la intina, permitiendo un análisis detallado de la esporodermis. La técnica utilizada en este trabajo de tesis incluyó un pre-procesamiento de muestra detallado en el apartado 3.3.2.2 por lo cual la técnica que se describe aquí es a partir del material obtenido de éste.

Es recomendable trabajar bajo campana y en un lugar bien ventilado ya que los reactivos utilizados en esta técnica son tóxicos y tanto las mezclas entre ellos como la etapa de calentamiento generan muchos vapores nocivos para el operador.

1. Los tubos con el material resultante del pre-tratamiento de muestra se agitan en el vórtex para homogeneizarlos y la suspensión se pasa a tubos de centrifuga. Se enrasan los tubos con ácido acético glacial (AAG).
2. Se prepara la mezcla acetolítica (9 anhídrido acético : 1 ácido sulfúrico) a razón de  $\pm 5$  mL por muestra. También se pone a hervir un recipiente con agua.



3. Se vierten  $\pm 5$  mL de mezcla acetolítica en cada tubo y se homogeniza con varilla de vidrio. Tener la precaución de usar una varilla por tubo.
4. Los tubos se ponen a “baño María” durante  $\pm 3$  minutos (con el agua en ebullición) mientras se va agitando el contenido con las varillas.
5. Se equilibran los tubos con AAG y se centrifugan  $\pm 15$  minutos rpm. Al finalizar se descarta el sobrenadante.
6. Para remover lo que pudiera quedar de mezcla acetolítica se realizan dos lavados de acuerdo al siguiente procedimiento: a cada tubo se le agrega agua destilada enjuagando las paredes de vidrio. Se enrasa a 10 mL y se agita en el vortex. Se lleva a centrífuga 15 minutos. Se descarta el sobrenadante.
7. Se prepara una solución de glicerina en agua (1:1) y se agrega  $\pm 1$  mL en cada tubo. Se agita con varilla de vidrio (siempre individual), se deja reposar durante 10 minutos. Posteriormente se enrasa a 10 mL con agua destilada y se lleva a centrífuga 15 minutos. Se descarta el sobrenadante.
8. Montaje de los preparados:
  1. Con una aguja histológica o pequeña espátula, disponer una capa delgada de material acetolizado en el centro de un portaobjetos limpio y seco.
  2. Agregar un pequeño trozo de glicerina-gelatina (medio de montaje).
  3. Con una varilla de vidrio colocar 4 gotas de parafina derretida en los ángulos de un cuadrado sobre las que se apoya un cubreobjetos limpio y seco.
  4. Flamear suavemente para que se derritan el medio de montaje y la parafina selle la periferia. Presionar suavemente en el centro del cubreobjetos.
  5. Dejar enfriar y secar invertidos sobre un soporte (de manera que los granos de polen se ubiquen en un mismo plano sobre la cara interna del cubreobjetos).
9. El sobrante de material puede ser conservado en tubos eppendorf. Para ello se agrega agua y se agita en vortex para pasar el residuo de los tubos de centrífuga grandes a los eppendorf. Éstos se centrifugan durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se le agrega glicerina pura y 1 cristal de fenol.

Observación:



A partir del paso 7, el proceso puede ser interrumpido ya que el material puede conservarse agregando AAG o bien 1 cristal de fenol, si el material está en agua destilada.

### **3. Microacetólisis (Pla-Dalmau 1961)**

1. Tomar una pequeñísima cantidad de la carga corbicular utilizando una aguja histológica y colocarla sobre un porta-objeto.
2. Agregar una gota de mezcla acetolítica y homogeneizar la muestra.
3. Calentar suavemente sobre la llama de un mechero homogeneizando con una aguja hasta que la muestra tome color castaño.
4. Realizar al menos dos lavados con agua destilada de la siguiente manera: agregar una gota sobre la muestra y homogeneizar sobre el calor suave del mechero hasta evaporación total del agua.
5. Agregar una gota de agua glicerina al 50% y colocar el cubre-objetos.



## ANEXO II

Resultados de los valores de humedad y proteínas totales obtenidos por los respectivos métodos de referencia para las muestras de los Grupos A (Tabla A.1) y B (Tabla A.2) analizadas.

**Tabla A.1.** Resultados de humedad y proteínas totales obtenidos para el grupo A de muestras.

Muestras Grupo A N°	% Proteínas totales (6.25)	% Humedad
1	20,3	12,9
2	19,7	17
3	19,9	14,2
4	18,2	13
5	16,8	16,1
6	17	17,4
7	17,2	14
8	16,9	18,4
9	16,6	27,2
10	18,3	18,3
11	19	17,7
12	20	14,6
25	17,1	11,7
26	19	5,8
27	14,4	18
29	19,4	7,4
30	24,9	12,9
31	19,9	14,1
32	19	23,5
33	19,8	17,9
34	18,9	11,2
35	18,8	15,2
36	19,6	14,2
37	18,3	10,4
38	22,4	6,5
39	22,7	11,9
40	22,6	7,5
41	23,1	6,5
42	19,7	12,5
43	17,9	16,3
44	18	17,7
45	25,9	6,4
46	21,1	16
47	22,4	18,4
48	26,7	9,7
49	22,7	15,2
50	24,5	12,2

Muestras Grupo A N°	% Proteínas totales (6.25)	% Humedad
51	22,3	15,3
52	19,8	20,6
53	19,2	19,1
54	19,3	21,5
55	20,2	14,3
56	23,1	17,4
57	22	17,9
58	23,2	16
59	23,5	15,5
60	19,8	17,3
61	22,1	7,7
62	17,1	9,8
63	18,1	24,3
<b>Promedio</b>	<b>20,2</b>	<b>14,7</b>
<b>DE</b>	<b>2,6</b>	<b>4,75</b>

Fuente: propia.



**Tabla A.2.** Resultados de humedad y proteínas totales obtenidos para el grupo B de muestras.

Muestras Grupo B N°	% Proteínas totales (6.25)	% Humedad
13	23,2	4
14	24,6	4,1
15	24,3	3
16	22,6	3,4
17	20,4	4
18	21,6	2,6
19	21,2	3,5
20	22,3	2,9
21	23,3	2,2
22	22,9	3,1
23	24,1	3,2
24	23,7	2,9
<b>Promedio</b>	<b>22,9</b>	<b>3,2</b>
<b>DE</b>	<b>1,3</b>	<b>0,6</b>

Fuente: propia.



## ANEXO III

### TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS

- ♣ **XI Congreso Latinoamericano de Apicultura - FILAPI** (Federación Latinoamericana de Apicultura). Puerto Iguazú, Argentina, 3 a 6 de septiembre de 2014. “Determinación de metales en polen corbicular recolectado por *Apis mellifera* en el valle bonaerense del Río Colorado”. García Paoloni, M.S.; Grau Talevi, T.; Andrada, A.C.; Pistonesi M. F.
  
- ♣ **8° Congreso Argentino de Química Analítica**. La Plata, 3 a 6 de noviembre de 2015. “Determinación de humedad y proteínas totales en polen corbicular empleando espectroscopía en infrarrojo cercano”. García Paoloni, M. S.; Véras Neto, G. J.; Pistonesi, M. F.
  
- ♣ **31° Congreso Argentino de Química**. Bs As, 25 a 28 de octubre 2016. “Determinación de polifenoles totales en polen de abejas empleando espectroscopía en infrarrojo cercano”. García Paoloni, M. S.; Vallese, F. D.; Springer, V.; Pistonesi, M. F.; Véras, G.; Nóbrega, R. O.; Oliveira, S. C.
  
- ♣ **VIII Workshop de Quimiometría**. Salvador, Brasil, 24 a 27 de abril de 2017. “Determinação dos teores de umidade e proteínas totais em pólen apícola utilizando NIR e regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS)”. Oliveira, S.; García Paoloni, M.S.; Véras, G.; Pistonesi, M. F.
  
- ♣ **21<sup>st</sup> IUNS International Congress of Nutrition**. Bs. As., Argentina, 15 a 20 de octubre de 2017. “Nutritional, bioactive, and botanical characterization of bee pollen harvested in the Colorado River Valley, Argentina”. García Paoloni, M. S.; Vallese, F.; Springer, V.; Andrada, A. C.; Pistonesi, M. F.
  
- ♣ **21<sup>st</sup> IUNS International Congress of Nutrition**. Bs. As., Argentina, 15 a 20 de octubre de 2017. “Propolis ethanolic extract as natural bee pollen load preservative”. García



Paoloni, M. S.; Krepper, G.; Cibanal, I.; Fernandez, L.; Centurión, M. E.; Di Nezio, M. S.; Pistonesi, M. F.

- ♣ **XIII Congreso Latinoamericano de Apicultura.** Montevideo, Uruguay, 2 a 5 de agosto de 2018. Determinación del origen botánico de polen corbicular recolectado por *Apis mellifera* en el valle bonaerense del Río Colorado, Argentina. García Paoloni, M.S.; Andrada, A.C.; Pistonesi, M.F.
- ♣ **VII Congreso Internacional Ciencia y Tecnología de los Alimentos.** Córdoba, Argentina, 1 a 3 de octubre de 2018. “Caracterización nutricional del polen de abeja recolectado en el valle bonaerense del Río Colorado, Argentina”. García Paoloni, M.S.; Vallese, F.; Salaberría F.; Bäumlér E.; Pérez E.; Pistonesi, M.
- ♣ **XI Workshop de Quimiometría.** Campina Grande, Brasil, 30 de noviembre a 3 de diciembre de 2020. “Discriminación de polen de abeja en función del contenido proteico utilizando espectroscopía NIR y algoritmo de proyecciones sucesivas”. García Paoloni, M.S.; Vallese, F.; Springer V.; Sousa Fernandes, D.D.; Dias Diniz, P.H.G.; Pistonesi, M.F.

### **TRABAJOS ENVIADOS PARA SU PUBLICACIÓN EN REVISTAS CIENTÍFICAS**

- ♣ **“Propolis ethanolic extract as natural bee pollen load preservative for human consumption”.** Leticia A. Fernández, Irene L. Cibanal, Soledad García Paoloni, Gabriela Krepper, Marcelo Pistonesi.
- ♣ **“Discriminating bee-pollen as a dietary supplement based on the protein content using NIR spectroscopy and the Successive Projections Algorithm”.** Soledad García Paoloni, Federico Vallese, Valeria Springer, David Douglas de Sousa Fernandes, Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz, Marcelo Fabián Pistonesi. Food Chemistry.