

Fracción fenólica y flavonoides totales del polen corbicular colombiano: actividad antioxidante y capacidad antirradicalaria

Phenolic fraction and total flavonoids in colombian corbicular bee pollen: antioxidant and free radical scavenging activity

^{1,2}Guillermo Salamanca Grosso, ²July Alexandra Hernández López,
²Mónica Patricia Osorio Tangarife

¹Facultad de Ciencias-Departamento de Química. ²Laboratorio de Investigaciones Mellitopalínológicas y Propiedades Físicoquímicas de Alimentos. Universidad del Tolima-Colombia. ¹Correo electrónico: salamancagrosso@gmail.com

RESUMEN

El polen corbicular, es un producto natural resultado de la actividad de las abejas que aglutinan los granos removidos de las anteras de las flores que forrajean y estructuran en diminutos pellets, tras la adición de néctar y enzimas hipofaríngeas, para el sustento de la colonia. La variabilidad y propiedades de éste producto ha llamado la atención debido a sus propiedades nutricionales. Para el estudio se colectaron y evaluaron 63 muestras de las zonas de bosque húmedo premontano (*bh-PM*) y muy húmedo premontano (*bmh-PM*). El contenido y actividad de los fenoles y flavonoides fueron determinados sobre extractos de etanol-agua (70:30). En los extractos, la densidad media oscila entre 0,8840±0,01 y 0,8851±0,01 g/mL, el rendimiento del extracto blando de 3,30±0,70 a 7,10±1,25 g/100 mL. Los espectros UV-Vis de los extractos presentan patrones propios de fenólicos y flavonoides. La fracción fenólica observada varía entre 11,8±2,22 y 30,6±7,10 mg EAG/g, los flavonoides desde 5,67±2,35 a 12,1±1,13 mg Eq. Quercetina/g polen. La capacidad reductora (11,8±2,22 a 30,6±7,10) y (9,00±3,43 y 17,9±4,30) µM de Trolox/g para FRAP y ABTS respectivamente. Una función estructural PLS-PATH y sus correlaciones en virtud a las propiedades y componentes responsables de la actividad antioxidante han sido planteadas. Los resultados son reveladores de un aporte significativo de fenoles y flavonoides, en muestras de polen corbicular de zonas altoandinas colombianas, su extracción y concentración posibilita la incorporación como aditivo en suplementos alimenticios o productos farmacéuticos.

Palabras clave: Antioxidantes, fenoles, polen, flavonoides.

ABSTRACT

Corbicular bee pollen, is a natural product result from the activity of bees that removed pollen grains from anthers and agglutinate it into tiny pellets, after the addition of nectar and hypo pharyngeal enzymes. The final product is stored in the hives and used as a nutritional sustenance of the colony. Variability and properties of this product has attracted research attention due to its nutritional properties. For the study were collected 63 samples at the premountain wet forest (*bh-PM*) and very wet premountain forest (*bmh-PM*). Phenols, flavonoids, and its activity were determined on extracts using ethanol-water (70:30) as a solvent. Average of density change between 0,8840±0,01 to 0,8851±0,01 g/mL, total extract from 3,30±0,70 to 7,10±1,25 g/100 mL. UV-Vis spectra show typical patterns of phenolic and flavonoids compounds. The phenolic fraction observed varies between 11,8±2,22 and 30,6±7,10 mg EAG/g, and flavonoids from 5,67±2,35 to 12,1±1,13 mg Eq. Quercetin/g pollen. The reducing capacity (11,8±2,22 to 30,6±7,10) and (9,00±3,43 and 17,9±4,30) µM Trolox/g for FRAP and ABTS respectively. A structural function PLS-PATH and their correlations respect to the properties and components responsible for the antioxidant activity have been raised. The results are indicative of a significant contribution of phenols and flavonoids, in colombian bee pollen from Andean zones, its removal and concentrations allows the incorporation as additive in food supplements or pharmaceutical products.

Key words: Antioxidants, phenols, pollen, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

El polen es un producto de gran demanda en el mercado de los productos naturales, debido a sus propiedades nutricionales y terapéuticas constituye la principal fuente proteica y de alimentación de las abejas en su ciclo larval (Salamanca, *et al.*, 2011); los beneficios para la salud derivan de sus características depurativas, energizantes y revitalizantes cuyas propiedades están en función de su origen botánico y de las condiciones de manejo durante las operaciones de extracción y beneficio, (Cimpoiou, *et al.*, 2013; Graikou, *et al.*, 2011; Salamanca, *et al.*, 2011; Vit, 2009; Silva, *et al.*, 2009; Sayas y Huamán, 2009; Guo, *et al.*, 2009; Del Risco, 2004; Bogdanov, 2004; 2011).

Este producto ha ganado importancia en virtud de sus propiedades funcionales y valor biológico, aporta carbohidratos y ácidos grasos insaturados; siendo posicionado como un alimento tipo II por los aminoácidos esenciales que aporta, (Kostic, *et al.*, 2015; Ketkar, *et al.*, 2014; Ciappinni, *et al.*, 2013). Contiene además vitaminas, minerales, carotenos, xantofilas y derivados fenólicos que le confieren propiedades antioxidantes (Mohdaly, *et al.*, 2015; Feás, *et al.*, 2012).

De esta manera, se conoce como actividad antioxidante total a la medición analítica de concentraciones de radicales de diferente naturaleza, en un sistema oxidativo controlado. En alimentos de origen vegetal, se atribuye esta actividad a la presencia de compuestos fenólicos, principalmente a los flavonoides, (Ciappinni, *et al.*, 2013; Gobert, *et al.*, 2013).

Es así como, la acción terapéutica del polen apícola se ha atribuido a varios compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Las propiedades bioactivas de los extractos de polen corbicular pueden ser aumentadas si se emplea un disolvente adecuado para su extracción, mejorando la actividad de secuestro de los radicales libres (Mohdaly, *et al.*, 2015).

Extractos apropiados del polen se pueden utilizar como alimento funcional o suplemento alimenticio teniendo en cuenta la cantidad de compuestos fenólicos y su capacidad de secuestro de los radicales libres responsables del estrés oxidativo y la carcinogénesis (Ketkar, *et al.*, 2014; Fatroková, *et al.*, 2013; Kacániova,

et al., 2012; Almaraz-Abarca, *et al.*, 2007a, b; Carpes, *et al.*, 2007; Basim, *et al.*, 2006; Cushnie y Lamb, 2005; Kroyer y Hegedus, 2001).

De acuerdo con lo expresado, se ha demostrado la actividad biológica de aproximadamente 250 compuestos de origen botánico asociados al polen (Nogueira, *et al.*, 2012). La composición y propiedades de las cargas de polen dependen de la flora disponible en las regiones y de factores del entorno, las principales moléculas con actividad biológica que componen la matriz de polen son Ácido fólico, Biotina, Carotenos (β -Caroteno) y Xantofilas, Vitaminas A y E, cuyo contenido varía dependiendo de la fuente floral.

Además, se ha encontrado una alta concentración de polifenoles en muestras de polen corbicular (Kroyer y Hegedus, 2001), responsables entre otras cosas del crecimiento de las plantas y la reproducción, proporcionan resistencia contra agentes patógenos por la acción de las fitoalexinas y protección contra plagas ya que contribuyen a que éstas aumenten su astringencia, siendo menos comestible para los insectos, (Hung-Ju, *et al.*, 2012; Angelo y Jorge, 2007). Estas sustancias polifenólicas son responsables de las tonalidades del polen y actúan como barreras protectoras de las plantas absorbiendo la radiación solar (Kacániova, *et al.*, 2012; Almaraz-Abarca, *et al.*, 2007a, b).

Los flavonoides son polifenoles caracterizados por su estructura benzo- α -pirano de origen vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares en forma de glucósidos importantes para el desarrollo y funcionamiento de las plantas (Aličić, *et al.*, 2014; Aksoy, *et al.*, 2013; Pascoal, *et al.*, 2013; Morais, *et al.*, 2011; Cartaya y Reynaldo, 2001).

Su estructura básica comprende un núcleo central que contiene 15 átomos de carbono (C15). Este grupo de compuestos tiene dos anillos fenólicos sustituidos (A y B) y un heterociclo oxigenado (anillo C), que forman un sistema C6-C3-C6. El anillo A proviene de la ruta de la malonil-coenzima A, y los anillos B y C, provienen de la ruta del ácido shikímico, (Pérez-Pérez, *et al.*, 2012; Pinheiro y Justino, 2012; Hossain y Rahman, 2011; Crozier, *et al.*, 2009; Dornas, *et al.*, 2007; Araujo, *et al.*, 2005; Cushnie y Lamb, 2005; Duthie, 2003). Los flavonoides suelen

presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente como flavonoides libres (agliconas) o combinados con azúcares en forma de glucósidos.

Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo con la sustitución del anillo C. En esta clasificación son de suma importancia el estado de oxidación del anillo heterocíclico y la posición del anillo B, (Araujo, *et al.*, 2005; Cartaya y Reynaldo, 2001). Los que poseen en su estructura unidades de azúcares además de los grupos hidroxilos, presentan un marcado efecto polar, razón por la cual pueden ser extraídos con etanol, metanol, butanol, acetona principalmente como ocurre con algunos flavonoides, es el caso de la quercetina e isoramnetina-3-glucósido, miricetina y kaempferol-3-glucósido además de naringina, isoramnetina, rutina, apigenina, naringenina, como los más predominantes, (Carpes, 2008; Leja, *et al.*, 2007; Almaraz-Abarca, *et al.*, 2007a,b; Serra-Bonvehí, *et al.*, 2001).

Las razones de la existencia ubicua de tipos monoméricos y oligómeros de flavonoides, como metabolitos secundarios son bien conocidas, entre ellos el rol como agente protector contra hongos y patógenos y como indicador de polinizadores. La protección de la radiación UV, es prueba de su efecto fotosensible, (Saxena, *et al.*, 2012).

En muestras de polen mexicano, se encontró una elevada actividad antioxidante, provenientes de especies de *Amaranthus hybridus*, *Prosopis juliflora*, *Tapetes sp.* y mezclas de éste con polen de *A. hybridus*, (Almaraz-Abarca, *et al.*, 2007a, b). En pólenes brasileros de *Mimosa gemmulata*, se encontró cierta actividad antirradicalaria, (Freire, *et al.*, 2012; Sarmiento, *et al.*, 2006), al igual que en los extractos etanólicos de pólenes japoneses de *Cistus ladaniferus*, (Nagai, *et al.*, 2002). La actividad antioxidante y capacidad antirradicalaria es mayor cuanto más fresco es el polen, disminuyendo con el almacenamiento, (Almaraz-Abarca, *et al.*, 2004; Campos, *et al.*, 2003). En pólenes europeos se observó del mismo modo, una importante actividad biológica, (Kroyer y Hegedus, 2001).

Estudios más recientes han mostrado una amplia variabilidad en la actividad antioxidante del polen polaco, (Leja, *et al.*, 2007). Los compuestos responsables de ésta actividad y de manera

contraria a lo observado en otros productos de origen vegetal o apícola, se encuentran como agliconas, es decir, no están glucosilados o unidos a carbohidratos, pues el enlace que los une se rompe cuando la abeja mezcla el polen colectado con su saliva y secreciones de sus glándulas hipofaríngeas, lo que incrementa su posible bioactividad, (Serra-Bonvehí, *et al.*, 2001).

En el contexto anterior y teniendo en cuenta la ausencia de trabajos relacionados con la determinación de fenoles, flavonoides, la capacidad antioxidante y actividad antirradicalaria, de extractos de polen corbicular beneficiado en diferentes entornos biogeográficos; se ha planteado en éste trabajo adelantar un estudio analítico y comparativo de los parámetros indicadores de fenoles totales, flavonoides, actividad antirradicalaria y capacidad reductora de extractos hidroalcohólicos de polen corbicular de las zonas biogeográficas de bosque húmedo y muy húmedo premontano, en los departamentos de Quindío y Tolima, como contribución al estudio de los productos naturales de interés apícola y como modelo de trabajo para estudios posteriores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se recolectaron un total de 63 muestras de polen corbicular colectado por *Apis mellifera* L., en dos zonas de vida (Figura 1). Se consideraron 37 muestras de bosque húmedo premontano (*bh-PM*; 800 a 2000 m.s.n.m; precipitación anual 1000-2000 mm/año; sensación térmica 17-24°C), 26 muestras de bosque muy húmedo premontano (*bmh-PM*; 800 a 2000 m.s.n.m; precipitación anual 2000-4000 mm/año; sensación térmica 17-24°C). En el Cuadro 1, se muestran las zonas de muestreo y la información geográfica asociada. Las muestras del sector de Cajamarca abarcan dos consociaciones biogeográficas. La muestra de Ibagué esta asociada al bosque húmedo premontano.

Frecuencias polínicas

El proceso de clasificación de las cargas de polen en cada una de las muestras estudiadas,

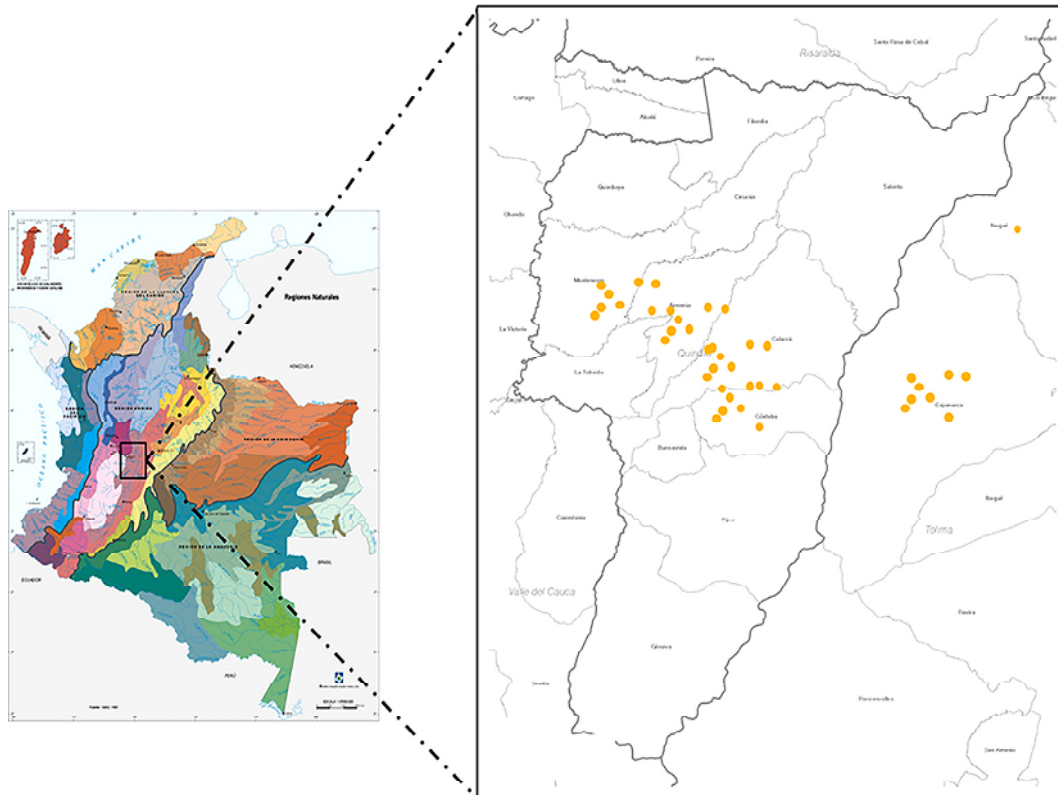


Figura 1. Posicionamiento geográfico de los departamentos de Quindío y Tolima y las zonas asignadas al muestreo de polen corbicular.

se realizó de forma manual y bajo estereoscopio, una fracción de polen fresco de $2,0 \pm 0,1$ g de muestra homogenizada, usando una lámpara lupa tipo Hammer™ (Tecgnology and Tools) con tamaño de lente de 90 mm; dioptría 3D+12 y lámpara fluorescente compacta T4 12 W (Modelo FJ1209 LL8092). Cada una de las tonalidades separadas fue codificada, siguiendo los estándares de la guía internacional de colores, Pantone 747XR, (Salamanca, *et al.*, 2011). Una vez separadas las cargas cromáticas se adelantó una valoración microscópica con la intención de relacionar los tipos polínicos como componentes de las cargas de cada una de las muestras. La técnica de acetólisis, fue implementada siguiendo la metodología descrita en la literatura, (Borja, *et al.*, 2011). El proceso de preparación y limpieza de los granos durante la acetólisis se realizó mediante centrifugado en la unidad Dynac™ 297C a 3500-4000 rpm por 20 min, la composición de las cargas separadas y acetolizadas fueron analizadas en un microscopio Olympus™ Modelo CX21FS1, con aumento de 10, 40 y 100

X y disposición de acople para cámara digital (Motic™) y software Motic Image Plus™ 2.0 ML. El proceso de separación y los protocolos de trabajo melitopalínológico siguiendo los criterios de Louveaux, *et al.*, (1978).

Extractos

Para la obtención de extractos hidroalcohólicos de polen (EHAPo) se realizaron operaciones de lixiviación. En todos los casos se pesaron $2,0 \pm 0,1$ g de polen seco y se homogenizaron con 15 mL de etanol al 70% a 50°C , en baño de agua marca Dubnoff BT56, durante 45 min con agitación constante. A continuación, los lixiviados se filtraron, centrifugaron y almacenaron a 4°C hasta el momento de análisis, conforme a las directrices de Carpes, *et al.*, (2007). A 2 mL de los EHAPo's, le fue removido el solvente determinando la fracción seca, que se ha expresado en g de extracto seco por 100 mL y relacionados como extracto blando. La densidad de los extractos se determinó a partir del volumen y peso de los mismos.

Cuadro 1. Relación de muestras de polen corbicular de las regiones geográficas y zonas de vida colombianas consideradas en el estudio.

Zona de Vida Holdrige	Departamento	Municipio	<i>n</i>	LN	LO	ST °C	A m.s.n.m.	P mm/año	
<i>bh-PM</i>	Quindío	Calarcá	5	4°34'18"	75°42'28"	20	1431	1543	
			5	4°26'05"	75°41'42"	19	1656	1700	
		Montenegro	10	4°31'17"	75°48'33"	21	1234	2700	
			Ibagué	1	4°27'53"	75°08'01"	23	1270	2100
	Tolima			6	4°27'31"	75°23'45"	14	1946	1300
			Cajamarca	6	4°23'22"	75°26'33"	12	2004	1415
				4	4°22'09"	75°20'40"	15	1818	1580
<i>bmh-PM</i>	Quindío	Armenia	11	4°28'58"	75°42'03"	24	1315	2200	
		Génova	11	4°11'54"	75°47'09"	19	1617	2000	
	Tolima	Cajamarca	4	4°28'02"	75°22'39"	10	2213	1300	

bh-PM: bosque húmedo premontano. *n*: número de muestras. *bmh-PM*: bosque muy húmedo premontano. P: precipitación media anual. A: cota altitudinal. ST: sensación térmica. LN: latitud Norte. LO: longitud Oeste.

Espectroscopia UV/Visible

Con el propósito de verificar las características de los extractos etanólicos de polen, se registraron sus espectros en el rango entre 200 y 400 nm, haciendo uso de cubetas de cuarzo de 10 mm de paso espectral, por medio del espectrofotómetro Beckman Coulter Du 800 y siguiendo los protocolos de la literatura (Cabral, *et al.*, 2012; Alencar, *et al.*, 2007).

Fenoles y acidez total

Los compuestos fenólicos totales fueron determinados por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Morais, *et al.*, 2011; Kroyer y Hegedus, 2001), empleando ácido gálico (100 µg/mL) como patrón de referencia. A una alícuota de 100 µL de EHAPo, se le adicionaron 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10, pasados 2 minutos 400 µL de solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 7,5%. Luego de 60 minutos de incubación sin luz a temperatura ambiente se registró la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Biospectro, Modelo SP-22. El contenido de fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (mg GAE/g polen seco), la acidez total se determinó por microtitulación potenciométrica a pH 8,20.

Flavonoides

El contenido de flavonoides fue determinado conforme a las directrices de Miliuskas, *et al.*, (2004), con las siguientes especificaciones: una alícuota de 50 µL de EHAPo se mezcló con 50 µL de cloruro de aluminio al 2% y 1150 µL de etanol absoluto, cuando fue necesario se realizó dilución de la muestra con etanol al 70%. Las muestras fueron homogenizadas e incubadas durante 40 min a temperatura ambiente protegiéndolos de la luz, la absorbancia fue medida a 415 nm en espectrofotómetro Biospectro, Modelo SP-22. El contenido de flavonoides fue calculado como mg equivalente de Quercetina/g de polen seco.

FRAP

La capacidad reductora de los extractos se determinó mediante un ensayo de la capacidad del ion férrico en el complejo formado con 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), que se transforma a su forma ferrosa, en la presencia de antioxidantes, (Thaiponga, *et al.*, 2006). Se preparo solución tampón de acetato 300 mM pH 3.6, solución de HCl 40 mM, solución de TPTZ 10mM usando como solvente el HCl, solución de cloruro de hierro (FeCl₃.6H₂O) 20 mM y solución Trolox 1000 µM. El reactivo FRAP fue preparado

en proporción 10:1:1, tampón acetato 300 mM pH 3.6, solución de TPTZ 10 mM y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM respectivamente. A alícuotas de 50 μL de la muestra diluida se le adicionaron 950 μL del reactivo FRAP. Las muestras fueron homogenizadas y dispuestas en baño de María a 37°C por 30 minutos. Las lecturas fueron realizadas a 593 nm en un espectrofotómetro Biospectro, Modelo SP-22. Para los cálculos finales fue empleada la curva de calibración de Trolox 500 μM , siendo los resultados expresados en μM de Trolox por g de muestra.

ABTS

A los fines de determinar la actividad antioxidante de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, basada en la reducción del radical $[\text{ABTS}]^{+\cdot}$, por antioxidantes presentes en extractos naturales (Dudonné, *et al.*, 2009; Surveswaran, *et al.*, 2007; Re, *et al.*, 1999), se utilizó el reactivo [(2,2'-azino-bis-) (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)] el radical $[\text{ABTS}]^{+\cdot}$ fue generado a partir de la reacción del ABTS 7 μM y persulfato de amonio 2,45 μM , dejado a temperatura ambiente con agitación constante entre 12 a 16 horas en oscuridad. La solución de $[\text{ABTS}]^{+\cdot}$ resultante, se diluyó en etanol absoluto hasta alcanzar una absorbancia de 0,700 a 0,800 a la longitud de onda de 750 nm. El volumen total de la reacción fue de 1.000 μL , con un volumen fijo de 950 μL de la solución $[\text{ABTS}]^{+\cdot}$ y volúmenes del solvente y muestra diluida alcanzando 50 μL . Las determinaciones fueron realizadas en la unidad espectrofotométrica Beckman Coulter™ DU 800 después de 6 minutos de incubación. La curva de calibración fue construida empleando diferentes concentraciones de la solución Trolox 500 μM , a través de la reducción de las absorbancias del radical $[\text{ABTS}]^{+\cdot}$. Los resultados fueron expresados en mg equivalente de Trolox/g de muestra de polen.

Conglomerados componentes principales y PLS-PATH

Con la información generada en el estudio de las propiedades fisicoquímicas arriba indicadas, se realizó un estudio de relaciones funcionales asociadas al origen geográfico, la densidad del extracto hidroalcohólico de polen corbicular (EHAPo), su capacidad reductora y potencial

de inhibición de radicales libres, considerando algunos trabajos reportados en la literatura (Álvarez y Salamanca, 2009, 2007; Pages y Tenenhaus, 2001).

Estadística

Las muestras fueron analizadas por triplicado, evaluando en cada caso el promedio, desviación estándar, coeficientes de variación y las correspondientes determinaciones del análisis de varianza entre grupos de muestras por origen. Los resultados de los análisis para cada uno de los parámetros fueron ordenados verificando los índices de correlación, se planeó un análisis de conglomerados como índice de similitud de extractos, que se complementó con la proyección de un modelo de redes neuronales. El análisis estadístico se evaluó haciendo uso del paquete estadístico Statgraphics Centurión™ XVI (Versión 16.1.02), JMPPro11™ y XLSTAT™ 2014.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las 63 muestras de polen corbicular de las zonas de Quindío y Tolima, han sido heterogéneas en su presentación, en cuanto a su composición, los granos de polen (cargas) acumulados en las colonias de abejas son de naturaleza multifloral, con prevalencia de 3 a 8 tipos distintos de polen con composición cromática variable. 34,9% de las muestras presentaron 6 tipos polínicos, entre 4 (19) y 5 (22,2) cargas el 41,2%.

La frecuencia más baja fue de 3 cargas (4,76%), la mayor diversidad se encontró en las muestras de Cajamarca. En los apiarios de Armenia, se han encontrado 18 frecuencias polínicas, con predominio de las tonalidades 154c (20,6), 153c (17,2), 146c (16,8) y 143c (14,6%). Los tipos polínicos de Calarcá, muestran 7 frecuencias polínicas que corresponden a las tonalidades 146c (34,8%), 131u (20,0%), 139c (17,3%), 141u (10,9%), 154c (7,60%) y 464u (9,40%); en Génova y Montenegro 23 y 17 frecuencias respectivamente, siendo afines las tonalidades 139c, 146 y 160u (Figura 2).

La mayor diversidad se presentó en las muestras del Tolima (Cajamarca e Ibagué), con 25 frecuencias polínicas y dominancia de las tonalidades 4635pc (12,9%), 126pc (10,8%) y 117pc (9,38%), siendo comunes los grupos 146c,

143c, 139c y 154c en las muestras evaluadas. Los tipos cromáticos corresponden a las familias *Asteraceae* (146c y 160u), *Myrtaceae* (143c, 146c y 125pc), *Rosaceae* (139c, 146c y 154c), *Bignoniaceae*, *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lauraceae* y *Solanaceae* (139c, 143c, 146c y 154c), que se relacionan con tonalidades café, marrón, amarillo y naranja, principalmente, los resultados son concordantes con los reportes de Salamanca, *et al.*, 2014. La variabilidad en la composición de los tipos polínicos incide en las propiedades fisicoquímicas finales del polen corbicular. El perfil cromático señala una mayor diversidad en muestras de polen corbicular del Tolima.

Los componentes solubles en etanol, son de tonos amarillo y amarillo naranja, en virtud a la solubilidad de xantofilas y compuestos fenólicos. La densidad media de los EHAPo's aunque son

diferentes, no presentan diferencias estadísticas significativas entre si, los valores observados son del orden de $0,8840 \pm 0,01$ y $0,8851 \pm 0,01$ g/mL para los extractos de las muestras de *bh-PM* y *bmh-PM*, respectivamente. Entre tanto en el extracto blando hay diferencias estadísticas significativas entre los grupos de muestras de acuerdo al origen que revelan 3 grupos distintos, ($P_v < 0,05$). Los extractos blandos de mayor rendimiento, corresponden a las muestras del Quindío tipo 1 (Q1), con $7,10 \pm 1,25$ g/100 mL que son comparables con las muestras del Tolima tipo 1 (T1: $6,00 \pm 0,05$). Las categorías de EHAPo's del tipo 2 Quindío (Q2) y Tolima (T2), son dominantes al provenir del mayor número de muestras, Q2 con 37 (58,7; $5,20 \pm 0,50$) y T2 con 18 (28,6%; $5,00 \pm 0,50$ g/100 mL). En este sentido, las del tipo 3 Quindío y Tolima (Q3 y T3), son del orden de $3,70 \pm 0,30$ a $3,30 \pm 0,70$ g/100 mL, (Cuadro 2).

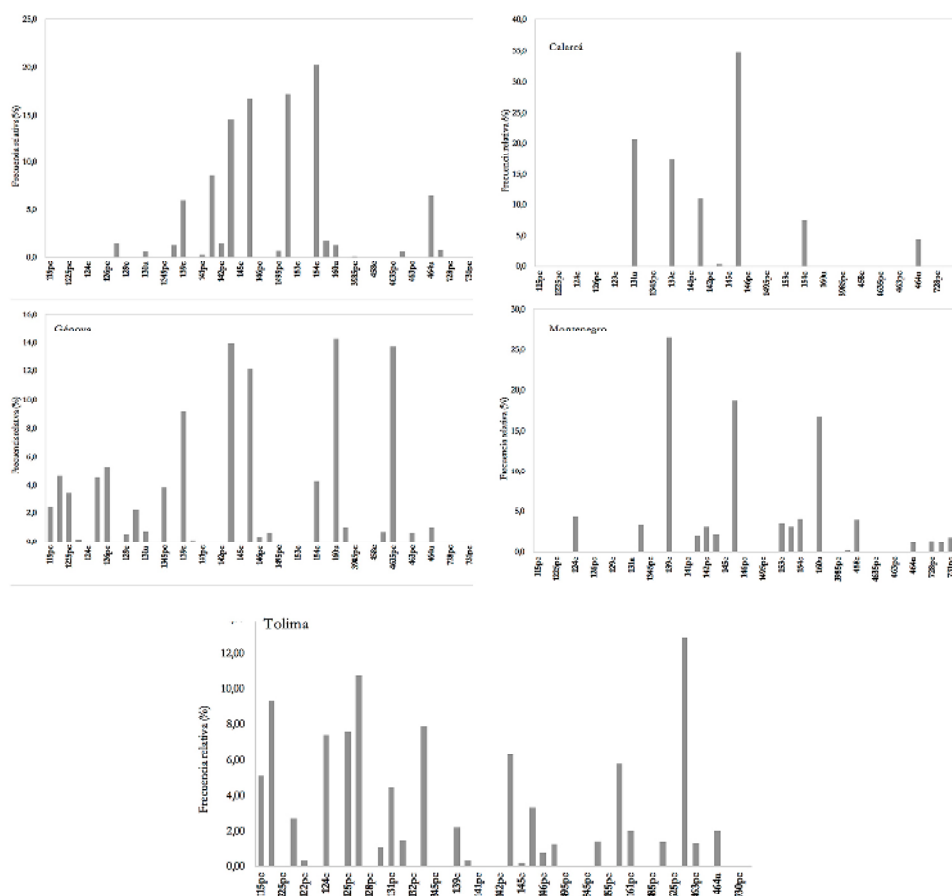


Figura 2. Frecuencias polínicas asociadas a la dominancia cromática de las cargas de polen corbicular de las zonas apícolas en los Departamentos del Quindío y Tolima.

El análisis de varianza revela diferencias estadísticamente significativas entre los extractos de muestras de los departamentos del Quindío y Tolima, pero también entre los grupos de muestras de las 2 zonas geográficas estudiadas, ($P_v < 0,05$; Razón-F, 64,4). Estos parámetros revisten particular interés desde el punto de vista de la calidad de los extractos y existe un vacío en la literatura en relación al rendimiento de la fracción soluble, por ello los resultados se consolidan como un parámetro de referencia.

En relación al contenido fenólico de los EHAPo's, las concentraciones más elevadas se han presentado en las muestras de Cajamarca ($25,3 \pm 6,81$) y Armenia ($18,9 \pm 9,70$ mg EAG/g polen), diferencias que pueden ser explicadas si se tiene en cuenta la diversidad y oferta floral en los emplazamientos establecidos para el beneficio del producto, que consolidan polen corbicular multifloral y que para el caso del Tolima (Ibagué y Cajamarca), la diversidad es de 25 tipos polínicos diferentes. Las categorías para el contenido fenólico por departamento se agrupan en 5 tipos Q1 a Q5 (Quindío) y 4 T1 a T4 (Tolima).

Los tenores tipo 1 (Q1 y T1), presentan niveles superiores a 35 mg EAG/g de polen ($37,2 \pm 3,90$ y $35,7 \pm 7,40$), los contenidos más bajos se presentan en las categorías Q4, Q5 y T4, (Cuadro 3). Como complemento a lo expuesto, es importante notar que la acidez natural del polen está asociado no sólo a la presencia de ácidos grasos volátiles y

productos del metabolismo de algunos agentes microbianos naturales. En la literatura, se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos en polen que contienen grupos carboxilo en su estructura y le confieren propiedades ácidas como el caso de los ácidos caféico, ferúlico, *p*-coumárico y clorogénico, (Almaraz-Abarca, *et al.*, 2007a, b).

En relación a los flavonoides, es importante considerar, que éstos compuestos usualmente se encuentran en su forma glucosilada y los azúcares asociados *D*-glucosa, *D*-galactosa y *L*-ramnosa, son los que suelen anclar la estructura de éstos metabolitos, (Campos, *et al.*, 2003). Los compuestos fenólicos asociados al polen, en general son metabolitos como Apigenina-7-*o*-glucósido, Luteolina-7-*o*-glucósido, Quercetina-3-glucósido, isoflavonas glucosiladas de Genisteina, dihidroflavonoides de Quercetina, Isorhamnetina-3-*o*-glucósido e Isorhamnetina-3-*o*-glucósido, derivados de los ácidos cinámicos (Rzepecka-Stojko, *et al.*, 2015; Almaraz-Abarca, *et al.*, 2007).

Los ácidos clorogénicos, gálicos, ferúlicos, hidroxicinámicos, caféicos, han sido igualmente relacionados como metabolitos secundarios del polen, (Rzepecka-Stojko, *et al.*, 2015; Chu, *et al.*, 2007; Serra-Bonvehí, *et al.*, 2001), así como isoquercetina, miricetina, tricetina, quercetina, luteolina, selangina, kaempferol e isoramnetina, (Kristerson, *et al.*, 2012). Extractos orgánicos de polen en solventes polares ponen en evidencia la presencia de éste tipo de compuestos a partir

Cuadro 2. Rendimiento del extracto blando del polen corbicular (EHAPo's) en muestras de Quindío y Tolima.

Departamento	Categoría	<i>n</i>	Extracto blando polen (g por 100 mL)		
			Mínimo	Máximo	Promedio \pm ds
Quindío	Q1	2	6,00	8,60	7,10 \pm 1,25 ^d
	Q2	37	4,10	5,90	5,20 \pm 0,50 ^b
	Q3	3	3,20	3,90	3,70 \pm 0,30 ^a
Tolima	T1	1	6,00	6,15	6,00 \pm 0,05 ^c
	T2	18	4,10	5,95	5,00 \pm 0,50 ^b
	T3	2	2,50	3,90	3,30 \pm 0,70 ^a

Número de muestras (*n*). Letras diferentes en las columnas revelan las diferencias significativas con nivel de confianza del 95%. ds: desviación estándar. Q1 a Q3 y T1 a T3: muestras de zonas biogeográficas del Quindío y Tolima.

Cuadro 3. Valores medios de fenoles totales en extractos hidroalcohólicos de polen corbicular de las zonas de Quindío y Tolima.

Departamento	Categoría	n	E. Ácido Gálico (mg/g de polen)		
			Mínimo	Máximo	Promedio±ds
Quindío	Q1	2	32,5	42,1	37,2±3,90 ^f
	Q2	3	24,6	27,7	26,4±1,15 ^{d,e}
	Q3	5	16,9	26,2	22,0±2,90 ^c
	Q4	29	8,10	25,4	14,2±3,50 ^b
	Q5	3	6,53	10,0	8,70±1,50 ^a
Tolima	T1	3	29,5	45,4	35,7±7,40 ^f
	T2	9	18,7	32,2	26,0±3,50 ^e
	T3	7	20,0	31,5	23,3±2,90 ^{c,d}
	T4	2	10,8	17,4	14,1±3,40 ^b

Número de muestras (*n*). Letras diferentes en las columnas revelan las diferencias significativas con nivel de confianza del 95%. ds: desviación estándar. Q1 a Q5 y T1 a T4: muestras de zonas biogeográficas del Quindío y Tolima.

de las determinaciones con cloruro de aluminio y 2,4-D, (Salamanca *et al.*, 2007). El uso de cloruro de aluminio en determinaciones de algunos tipos de flavonoides, como es el caso de flavonas, flavonoles y flavanonas se encuentra bien documentado, (Salamanca, *et al.*, 2007; Kosalec, *et al.*, 2004). El complejo entre tipos de flavonoides tipo apigenina, crisina y luteonina, los flavonoles rutina, morina, quercetina, miricetina, kaempferol, quercetina y galangina, se expresan a través del complejo estable con un máximo de absorción a 415 nm, (Pallab, *et al.*, 2013; Pal, *et al.*, 2009).

Tres categorías de valores se han presentado en la determinación de flavonoides; con una mayor concentración en las muestras del Tolima, que son significativamente mayores en relación con las del Quindío. Al igual que en fenoles, las mayores concentraciones en los EHAPo's se presentan en las muestras de Cajamarca. La concentración media en atención al origen en los EHAPo's es mayor en Cajamarca respecto de las muestras de Ibagué que a su vez son mayores en relación a los extractos de polen de Armenia, Montenegro y Calarcá, (Cuadros 4 y 5). Una correlación lineal positiva entre extractos blandos y su contenido de fenoles y/o flavonoides puede resultar relevante en el diagnóstico de calidad de EHAPo's.

Los resultados de la evaluación de extractos hidroalcohólicos de polen de las muestras

colombianas, son similares al comportamiento de los extractos alcohólicos de polen brasileros, pero no en cantidad. En esos extractos los tenores en fenoles oscilan entre 19,3 y 48,9 mg GAE/g de polen, con un valor medio de 30,8±8,22, (Carpés, *et al.*, 2009) que es mayor al observado en el presente trabajo.

No obstante, los promedios encontrados son similares a los reportes observados en los extractos de polen austriacos, cuyos tenores son del orden de 24,6 mg GAE/g de polen (Kroyer y Hegedus, 2001). Los extractos etanólicos de polen monoflorales de la zona de Bahía en el nordeste brasiler, para las especies *Cecropia*, *Eucalyptus*, *Elaeis*, *Mimosa pudica*, *Eupatorium* y *Scoparia*, mostraron amplia variabilidad en su fracción fenólica en diferentes periodos. Algunos de los valores reportados oscilan entre 59,9±0,80 y 188,6±1,70 mg EAG/g, (Kristerson, *et al.*, 2012) en diferentes periodos del año. Estos valores son similares a los reportados en muestras del estado Paraná, (Carpés, *et al.*, 2009), en muestras rumanas se han observado valores similares a los reportados para el caso colombiano, desde 8,32 a 22,7 mg GAE/g de muestra.

En extractos alcohólicos de polen argentinos (Aloisi y Ruppel, 2014), el contenido de flavonoides oscila entre 50,5 y 109,2 y 51,7 y 163,9 mg EAG/g, en dos entornos diferentes, situación que revela diferencias en la

Cuadro 4. Valores medios para el contenido de flavonoides en extractos hidroalcohólicos de polen corbicular de las zonas geográficas de Quindío y Tolima.

Departamento	Categoría	n	(mg Eq. Quercetina/g de polen)		
			Mínimo	Máximo	Promedio \pm ds
Quindío	QF1	4	5,04	6,08	^a 5,50 \pm 0,40
	QF2	28	2,00	4,95	^b 2,80 \pm 0,70
	QF3	10	1,40	1,99	^c 1,80 \pm 0,10
Tolima	TF1	3	7,54	8,49	^d 8,00 \pm 0,30
	TF2	2	5,65	5,79	^a 5,70 \pm 0,10
	TF3	16	2,0	4,96	^f 3,50 \pm 0,80

Número de muestras (n). Letras diferentes en las columnas revelan las diferencias significativas con nivel de confianza del 95%. ds: desviación estándar. QF1 a QF3 y TF1 a TF3: muestras de zonas biogeográficas del Quindío y Tolima.

Cuadro 5. Contenido medio de la fracción de fenoles y flavonoides en extractos Hidroalcohólicos de polen y por localidad.

Localidad	FT \pm ds	FLV \pm ds
Armenia	18,9 \pm 9,70 ^b	3,30 \pm 1,66 ^b
Cajamarca	25,3 \pm 6,81 ^c	4,32 \pm 1,80 ^c
Calarcá	12,2 \pm 2,18 ^a	2,33 \pm 0,30 ^a
Génova	18,3 \pm 6,15 ^b	2,56 \pm 0,78 ^{a,b}
Ibagué	23,3 \pm 6,17 ^c	3,87 \pm 1,22 ^c
Montenegro	17,1 \pm 5,95 ^b	3,03 \pm 1,10 ^{a,b}
Total	19,5 \pm 8,01	3,29 \pm 1,55
Razón-F	14,3	9,89
Valor-P	< 0,05	< 0,05

FT: fenoles totales (mg de Ácido Gálico/g).
FLV: flavonoides (mg Eq. Quercetina/g polen).
ds: desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna representan valores con diferencias estadísticas significativas.

composición de la fracción flávica en relación al origen geográfico y por ende al botánico. Esto puede evidenciarse además a partir de los resultados de las evaluaciones de extractos alcohólicos de pólenes monoflorales chilenos. La especie *Quillaja saponaria*, demostró la presencia de un mayor contenido de fenoles en relación a *Echinopsis chiloensis* y *Schinus polygamus*, (Montenegro, et al., 2013).

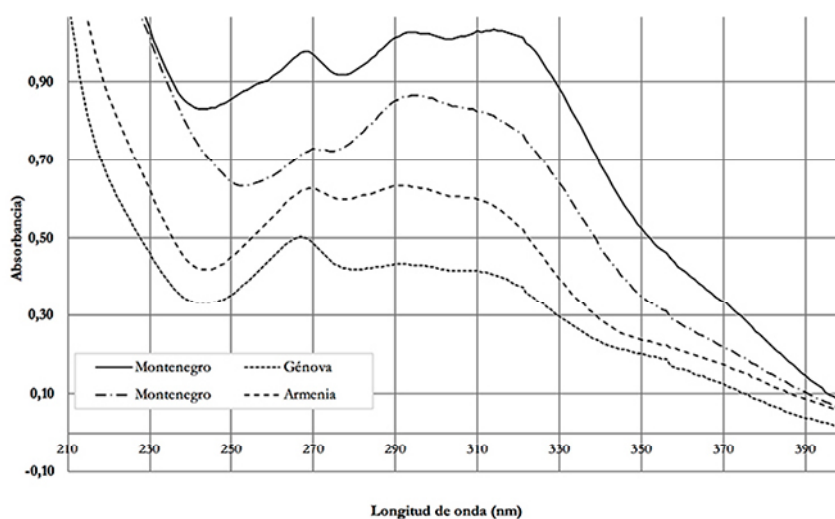
La condición austral en Chile propicia el desarrollo de un tipo de flora muy diferente a la observada en zona de trópico. Se sugiere considerar aspectos del orden fisiológico en plantas, que con mayor área foliar expresan una mayor acumulación de antioxidantes, debido a factores de entorno, (Gao, et al., 2010).

La presencia de fenoles y derivados de ácidos, como también la de flavonoides, en principio podrían evidenciarse a partir de sus

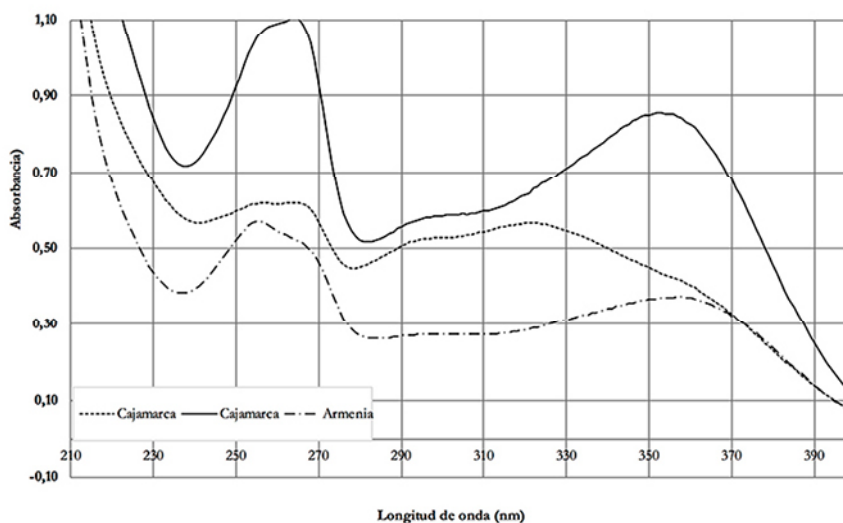
espectros UV. En cromatografía de líquidos la detección se realiza haciendo uso de sistemas electrónicos con arreglo de diodos, (Campos, *et al.*, 2003). Los espectros UV, de extractos, ponen en evidencia la presencia y dominancia de éstos compuestos, (Carpés, *et al.*, 2009). Las principales absorciones de los ácidos fenólicos y sus derivados de flavonoides, se presentan entre 200 y 400 nm. Los espectros UV de EHAPo's colombianos, se muestran en la Figura 3. Las bandas de absorción y sus longitudes de onda máxima son coincidentes con otros reportes de la literatura, para ácidos fenólicos

identificados a través de sistemas de detección en HPLC, con arreglo de diodos (DAD), en ácidos dihidroxibenzoicos, caféico, ferúlico e isoferúlico, (Kao, *et al.*, 2011) y para flavonas y flavonoles sustituidos en sus banda I y II, que son característicos de flavonoides, (Carpés, *et al.*, 2009; Campos, *et al.*, 2003).

Los ácidos y derivados de ácido cinámico (AC) y ácido benzoico (AB), son significantes en la evaluación del poder reductor; sus derivados hidroxilados presentan diferencias importantes en su poder reductor, siendo los mayores en



A



B

Figura 3. Espectros UV-Vis de los extractos hidrolcoólicos de polen corbicular de muestras de Quindío y Tolima. **A.** Perfiles asociados a tipos de ácidos fenólicos sustituidos, **B.** Flavonas y flavonoles hidroxilados.

los derivados del ácido cinámico que en los benzoicos. Estas diferencias se han explicado teniendo en cuenta aspectos estructurales de sus moléculas y la presencia de hidroxilos y sus efectos estéricos, (Rzepecka-Stojko, *et al.*, 2015). Los derivados (AB) *n*-hidroxilados exhiben una mayor capacidad reductora respecto de los dihidroxiderivados tipo *o*-dihidroxilados y *n*-hidroxilación.

La fracción de ácidos fenólicos del polen se ha estimado en 0.20%, (Rzepecka-Stojko, *et al.*, 2015). La variabilidad en la capacidad reductora de los EHAPo's de muestras colombianas en principio puede ser explicada en términos de su capacidad reductora FRAP, en una escala de 16,2±4,00 a 52,8±5,20 a favor de los grupos Q1 (52,8±5,20) > T1 (43,8±2,00) mg Trolox/g de polen, (Cuadro 6).

Mientras que para la capacidad antirradicalaria ABTS en una escala de 8,50±1,10 a 34,2±1,80 a favor de los grupos QA1 (34,2±1,80) > TA1 (22,0±1,60) mg Trolox/g de polen, (Cuadro 7). Este mismo parámetro en función del origen por localidad, se presentan diferencias estadísticas significativas entre muestras del mismo sector, con 30,6±7,10 mg Trolox/g de polen, que es

mayor a los promedios de Armenia Calarcá, Génova y Montenegro, (Cuadro 8).

Los EHAPo's analizados en éste trabajo revelan una considerable actividad antirradicalaria, que puede ser explicada teniendo en cuenta la concentración de fenoles totales, flavonas y flavonoles, (Cuadros 8 al 10), donde se relacionan los parámetros respecto de su origen biogeográfico y por localidad. Los resultados se validan tomando como referencia otros trabajos reportados en la literatura, (Kristerson, *et al.*, 2012; Carpés, *et al.*, 2009). La baja actividad antioxidante y antirradicalaria, puede estar relacionada con una reducida concentración de compuestos fenólicos.

El análisis de los resultados recién expuestos y sus interrelaciones presentan correlaciones lineales positivas. Una concentración elevada de flavonoides, se corresponde con el contenido de fenoles totales, que a su vez representa elevada capacidad reductora. La pendiente de la curva de la relación fenoles-FRAP es de 1,23 y la de Fenoles-Flavonoides es de 0,117. En este caso la relación es de la forma: $FLV=0,117C_{x1}+1,015$, en la expresión es $FRAP=1,23C_{x2}-2,373$, siendo C_{x1} y C_{x2} las concentraciones de fenoles, como equivalentes de ácido gálico (EAG mg AG/g).

Cuadro 6. Valores estadísticos básicos asociados al test de capacidad reductora (FRAP) de los extractos hidroalcohólicos de polen corbicular.

Departamento	Categoría	n	FRAP mg Trolox/ g de polen		
			Mínimo	Máximo	Promedio±ds
Quindío	Q1	2	46,8	56,1	52,8±5,20 ^h
	Q2	4	23,9	38,7	32,0±4,20 ^f
	Q3	7	20,6	29,6	24,0±2,70 ^d
	Q4	23	10,1	19,9	13,0±2,50 ^b
	Q5	6	5,30	9,97	8,10±1,80 ^a
Tolima	T1	2	41,4	45,9	43,8±2,00 ^g
	T2	9	30,2	38,2	33,4±1,90 ^f
	T3	8	24,6	29,9	27,4±1,40 ^e
	T4	2	11,3	19,7	16,2±4,00 ^c

Número de muestras (n). Letras diferentes en las columnas revelan las diferencias significativas con nivel de confianza del 95%. Q1 a Q5 y T1 a T4: Muestras de zonas biogeográficas del Quindío y Tolima.

Cuadro 7. Valores estadísticos básicos asociados a la capacidad antirradicalaria (ABTS) de los extractos hidroalcohólicos de polen corbicular.

Departamento	Categoría	n	ABTS (mg Eq. Trolox/g de polen)		
			Mínimo	Máximo	Promedio±ds
Quindío	QA1	4	32,3	36,6	34,2±1,80 ^g
	QA2	11	10,1	16,2	12,7±2,10 ^d
	QA3	14	5,03	9,73	6,70±1,80 ^b
	QA4	13	3,30	4,99	4,40±0,45 ^a
Tolima	TA1	8	20,0	24,8	22,0±1,60 ^f
	TA2	11	13,1	19,9	17,0±2,10 ^e
	TA3	2	7,50	9,60	8,50±1,10 ^c

Número de muestras (n). Letras diferentes en las columnas revelan las diferencias significativas con nivel de confianza del 95%. ds: desviación estándar. QA1 a QA4 y TA1 a TA3: muestras de zonas biogeográficas del Quindío y Tolima.

Cuadro 8. Contenido medio de los indicadores de capacidad reductora (FRAP) y antirradicalaria (ABTS) de extractos etanólicos de polen corbicular.

Localidad	FRAP±ds	ABTS±ds
Armenia	20,3±15,7 ^b	12,1±11,3 ^b
Cajamarca	30,6±7,10 ^c	17,9±4,30 ^c
Calarcá	11,8±2,22 ^a	5,67±2,35 ^a
Génova	17,9±8,00 ^b	9,29±4,51 ^b
Ibagué	28,5±2,30 ^c	18,4±1,80 ^c
Montenegro	18,8±7,71 ^b	9,00±3,43 ^{a,b}
Total	21,6±11,2	11,9±7,38
Razón-F	17,3	18,4
Valor-P	< 0,05	< 0,05

FRAP (mg Eq. Trolox/g). ABTS (mg Eq. Trolox/g). Letras diferentes en la misma columna representan valores con diferencias estadísticas significativas. ds: desviación estándar.

Cuadro 9. Contenido medio de la fracción de fenoles, flavonoides, capacidad reductora (FRAP) y antirradicalaria (ABTS) de extractos etanólicos de polen corbicular por zona de vida.

Zona de vida	FT±ds	FLV±ds	FRAP±ds	ABTS±ds
<i>bh-PM</i>	19,7±8,00 ^a	3,49±1,70 ^b	22,4±9,91 ^c	12,1±6,50 ^d
<i>bhm-PM</i>	19,2±8,10 ^a	3,04±1,29 ^b	20,4±12,7 ^c	11,6±8,51 ^d
Total	19,5±8,01	3,29±1,55	21,6±11,2	11,9±7,38
Razón-F	19,5	2,58	0,94	0,14
Valor-P	0,73	0,11	0,33	0,71

Cuadro 10. Relación de cargas polínicas, extracto blando, fracción fenólica e indicadores de capacidad antioxidante de extractos etanólicos de polen corbicular.

Origen	Cargas	EHAPo's ¹	Fenoles ²	Flavonoides ³	FRAP ⁴	ABTS ⁵
Armenia	8	4,49±0,89	23,5±2,64	3,72±0,21	30,4±0,81	15,8±0,24
	4	5,33±0,38	14,1±1,38	5,19±0,15	13,0±2,09	4,55±0,08
	3	5,77±0,03	15,8±0,27	1,90±0,10	12,1±1,27	4,87±0,51
	4	5,27±0,08	16,1±1,78	3,80±0,06	20,3±0,34	5,36±0,07
	7	4,25±0,10	35,1±2,64	5,91±0,14	42,8±4,06	33,2±0,82
	3	4,81±0,21	39,3±2,79	5,86±0,22	55,7±0,39	35,3±1,29
	5	5,75±0,18	12,9±0,04	1,48±0,08	9,50±0,48	5,07±0,16
	6	3,28±0,01	13,9±0,64	1,99±0,20	12,9±1,26	4,88±0,03
	4	5,87±0,49	16,3±1,01	1,73±0,05	10,6±1,46	8,68±0,48
	8	5,45±0,26	11,5±0,48	2,49±0,13	5,77±0,24	4,21±0,16
7	5,88±0,07	9,16±1,07	2,13±0,11	10,0±0,52	10,4±0,04	
Cajamarca	5	4,46±0,31	17,0±0,34	2,99±0,02	26,9±0,48	15,2±0,35
	7	5,58±0,25	24,1±0,96	5,72±0,07	34,1±1,31	24,4±0,41
	5	4,82±0,07	11,2±0,45	2,53±0,02	12,9±1,64	9,52±0,08
	5	4,92±0,07	28,8±3,21	4,22±0,26	40,5±5,49	20,5±0,67
	5	5,36±0,16	25,7±3,30	3,48±0,08	32,1±0,44	17,1±0,59
	3	3,48±0,91	21,5±1,18	3,00±0,26	29,7±1,69	20,3±0,25
	6	5,22±0,42	29,9±0,39	4,16±0,07	28,4±0,53	19,1±0,28
	6	5,60±0,35	29,5±2,66	7,75±0,22	31,9±0,91	14,2±0,15
	6	6,14±0,01	25,6±0,81	8,01±0,16	33,4±0,30	19,8±0,15
	4	5,24±0,37	24,6±0,71	4,87±0,09	26,9±0,11	20,0±0,78
	6	5,63±0,39	22,4±0,06	8,25±0,24	32,7±2,52	16,5±0,05
	6	4,64±0,13 ^a	27,1±0,46	3,94±0,41	30,2±1,85	20,5±0,42
	6	5,56±0,03	21,9±0,84	2,63±0,03	28,0±0,55	16,5±0,17
	5	5,71±0,25	20,4±0,31	2,05±0,05	27,5±2,49	7,54±0,02
	7	5,01±0,11	22,4±3,67	4,35±0,01	19,4±0,31	14,9±0,26
	5	4,38±0,25	28,1±3,41	3,43±0,44	37,9±3,40	23,6±0,67
	4	4,37±0,02	38,2±7,23	3,94±0,05	33,8±0,02	22,3±1,10
6	3,94±0,42	24,2±1,93	3,12±0,10	25,8±1,16	16,1±0,27	
5	4,87±0,14	38,9±5,90	4,52±0,10	40,7±2,46	21,3±1,07	
6	4,07±0,20	24,9±2,32	3,43±0,57	39,0±5,76	19,9±0,96	
Calarcá	7	5,27±0,47	13,2±0,60	2,67±0,09	12,4±0,63	4,15±0,22
	6	5,19±0,72	13,3±0,86	2,31±0,21	14,2±2,52	9,31±1,53
	6	4,87±0,23	15,8±1,24	2,45±0,19	12,6±0,89	4,35±0,21
	6	6,68±1,90	11,7±1,12	2,69±0,21	15,3±0,87	4,79±0,51
	6	5,53±0,19	12,1±1,09	2,40±0,01	10,6±0,01	5,27±0,12
	6	4,95±0,05	10,3±2,21	2,07±0,28	10,8±0,08	10,7±0,39
	7	5,42±0,16	11,7±0,35	2,11±0,01	10,7±0,55	4,40±0,52
	4	4,81±0,08	12,4±0,32	2,27±0,38	12,4±0,71	4,81±0,19
	6	4,71±0,06	9,86±0,15	2,31±0,12	10,2±0,94	5,23±0,10
	6	6,39±2,00	12,1±3,18	2,06±0,09	8,44±0,39	3,80±0,22

../... continúa

.../... continuación Cuadro 10.

Cuadro 10. Relación de cargas polínicas, extracto blando, fracción fenólica e indicadores de capacidad antioxidante de extractos etanólicos de polen corbicular.

Origen	Cargas	EHAPo's ¹	Fenoles ²	Flavonoides ³	FRAP ⁴	ABTS ⁵
Genova	6	5,74±0,11	11,5±0,81	1,78±0,06	12,8±0,58	5,25±0,11
	6	5,88±0,19	15,9±3,58	1,62±0,02	12,9±0,50	5,13±0,05
	4	5,31±0,06	14,1±1,16	1,94±0,15	12,7±1,10	4,65±0,20
	4	5,53±0,20	15,1±1,17	1,82±0,03	9,71±0,36	4,91±0,13
	4	5,09±0,24	8,03±1,50	2,28±0,29	5,45±0,16	3,42±0,14
	4	5,71±0,01	27,1±0,06	3,55±0,14	30,4±1,06	12,7±1,10
	6	5,03±0,10	19,4±0,52	3,23±0,27	17,7±5,12	11,8±0,47
	7	5,77±0,42	22,3±2,53	3,64±0,06	26,6±4,88	13,6±0,25
	5	5,26±0,08	26,1±1,59	3,50±0,22	23,2±1,51	11,2±0,13
	8	5,54±0,45	21,3±4,09	2,24±0,06	23,4±0,06	15,9±0,34
	5	5,10±0,38	20,2±0,01	2,61±0,06	22,8±1,10	13,7±0,61
Ibagué	6	5,22±0,67	23,3±6,17	3,87±1,22	28,5±2,30	18,4±1,80
	5	4,87±0,07	19,1±2,26	2,75±0,19	20,9±3,95	8,91±0,21
	6	4,35±0,15	12,8±0,29	3,80±0,15	9,85±0,22	8,79±0,11
	8	5,02±0,02	25,9±0,02	5,18±0,04	33,8±0,83	4,83±0,21
	6	5,34±0,14	22,9±2,67	4,59±0,36	26,9±3,11	12,9±0,27
	7	4,03±0,11	12,3±0,27	2,63±0,20	13,5±2,77	5,48±0,09
	4	5,52±0,19	14,1±0,80	2,74±0,14	15,9±0,68	9,27±0,46
	5	4,37±0,24	12,5±1,50	2,23±0,14	10,6±0,46	4,52±0,04
	5	3,53±0,29	8,21±1,06	1,84±0,13	14,2±1,39	9,03±0,11
	5	5,07±0,19	24,1±0,03	2,19±0,34	23,7±1,67	15,5±0,06
	6	5,41±1,24	19,4±0,51	2,38±0,09	18,4±1,42	10,6±0,53

¹Extracto etanólico de polen al 70% (g/100mL). ²Fenoles (mg GAE/g polen). ³Flavonoides (mg quercetina/ g polen). ⁴Capacidad reductora (mg Trolox/g polen). ⁵Actividad antirradicalaria (mg Trolox/g polen). Grupos de la misma letra representan tipos de muestras con diferencias estadísticamente significativas al 95%. Notaciones con letras (^{a,b}) diferentes en la misma columna denotan diferencias entre en los valores medios.

Estas mismas correlaciones entre Flavonoides y su actividad antirradicalaria (ABTS), se ajusta a la regresión de la forma $FLV=2,7624C_{x3} + 2,8326$, pero el coeficiente de correlación es bajo, ($R^2: 0,33582$), aquí C_{x3} es la concentración de flavonoide como equivalentes de quercetina. No obstante, la relación Fenoles-ABTS, es de la forma $Fenoles = 0,7467C_{x4} - 2,6209$ ($R^2: 0,65695$), donde C_{x4} corresponde a la concentración de fenoles como Eq. Acido gálico/g de polen. La Figura 4, ilustra la relaciones para cada una de las observaciones descritas.

El análisis de componentes principales (CP) de los parámetros analizados, genera 5 CP, que permiten explicar la variabilidad de los EHAPo's en un plano de dos dimensiones de las variables

rotadas (Figura 5). El Cuadro 11, recoge los 5 componentes. El porcentaje acumulado en el segundo componente es de 61,45. La matriz de correlaciones entre parámetros se muestra en el Cuadro 12. Se resaltan las relaciones entre fenoles, flavonoides y los indicadores de la capacidad reductora e inhibición de radicales libres.

El análisis de conglomerados muestra tres grupos de EHAPo's, según su origen geográfico y por zona de vida (Figura 6). La estructura final del clúster resulta de alguna manera compleja si se observa en detalle, pues esta representa la relación entre muestras. En este sentido, es importante considerar los indicadores de actividad antirradicalaria (ABTS), capacidad

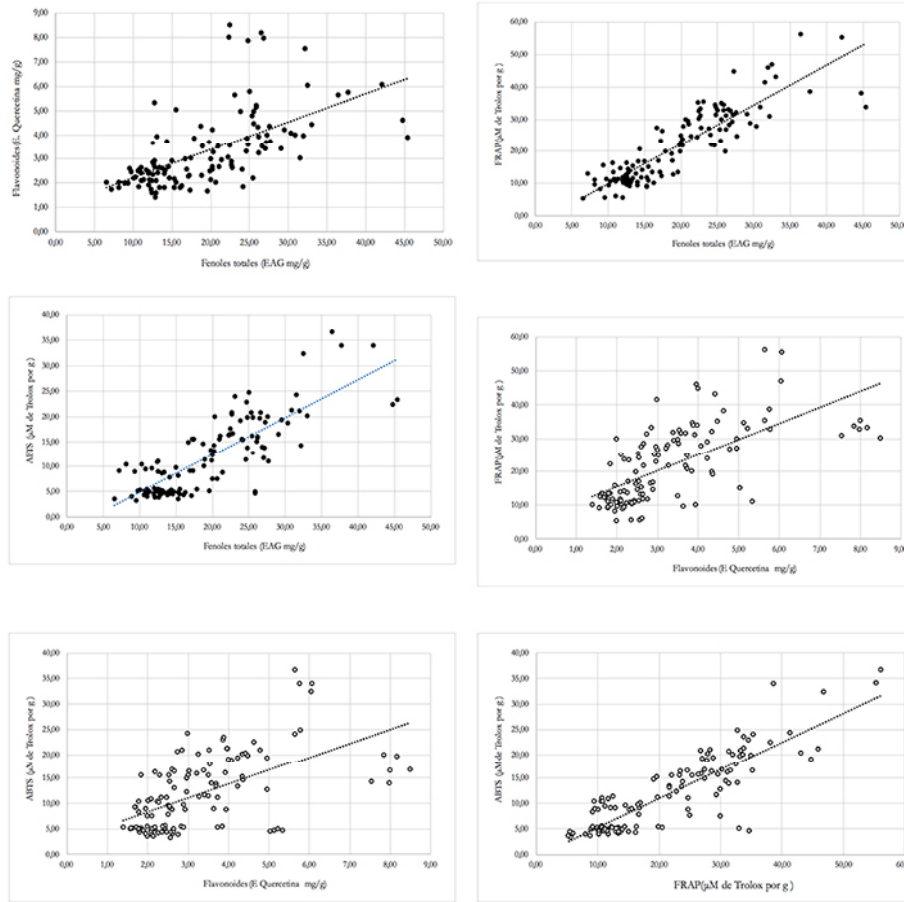


Figura 4. Representación de las relaciones entre parámetros relacionados con la fracción fenólica, los flavonoides, la actividad reductora y antirradicalaria.

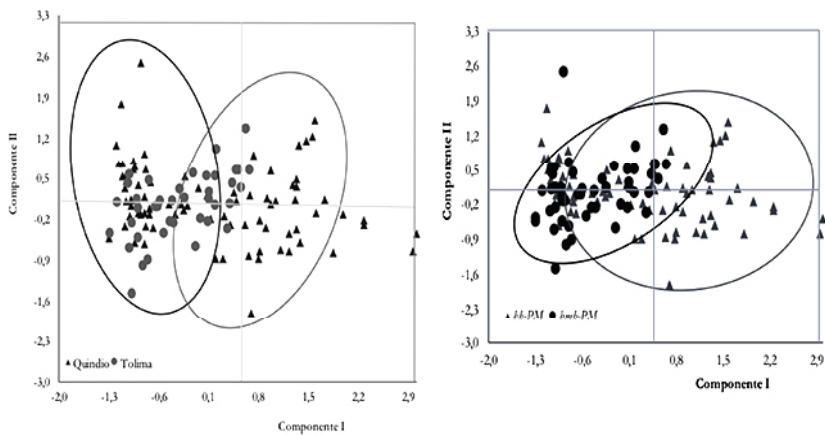


Figura 5. Representación del análisis factorial de los parámetros asociados a extractos hidroalcohólicos de muestras de polen corbicular. A. Departamento, B. Zona de vida.

Cuadro 11. Valores propios asociados al análisis de componentes principales.

Componentes	Valor propio	Variabilidad (%)	%Acumulado
F1	3,262	40,77	40,77
F2	1,654	20,68	61,45
F3	1,072	13,41	74,86
F4	0,509	10,45	85,39
F5	0,510	6,373	91,70

F1 a F5: Componentes del Análisis de Componentes principales.

Cuadro 12. Matriz de correlaciones de Pearson de los parámetros asociados a las características de extractos hidroalcohólicos del polen corbicular.

Parámetros	T. Polen	Densidad	EBL	A. Total	Fenoles	FLV	FRAP	ABTS
T. Polen	1,000							
Densidad	0,128	1,000						
EBL	0,177	0,545	1,000					
A. Total	0,104	0,060	-0,089	1,000				
Fenoles	-0,096	0,062	-0,028	-0,132	1,000			
FLV	0,049	0,121	0,065	-0,107	0,606	1,000		
FRAP	-0,099	0,072	-0,102	-0,128	0,811	0,659	1,000	
ABTS	-0,092	0,086	-0,186	-0,064	0,811	0,579	0,864	1,000

T.Polen: cargas de polen. EBL: extracto blando. A. Total: acidez total. FLV: flavonoides. FRAP: capacidad reductora. ABTS: actividad antirradicalaria.

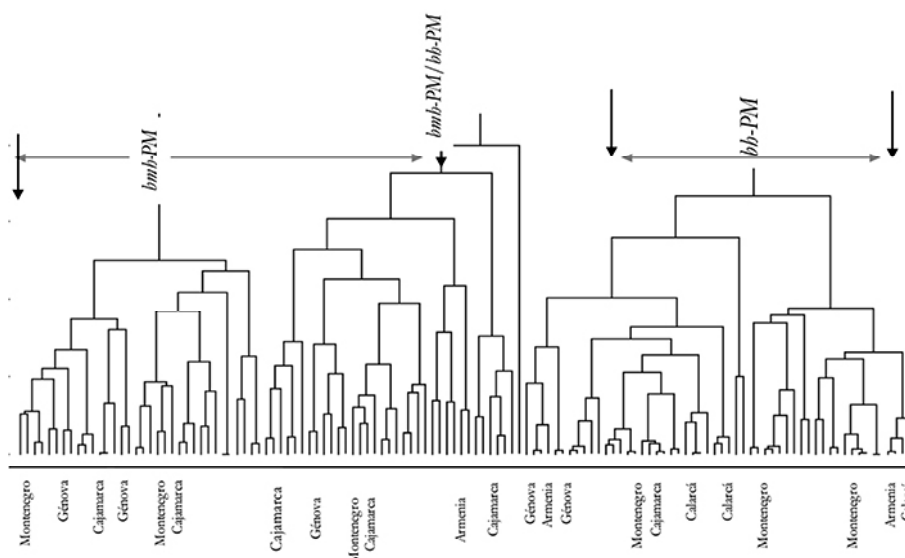


Figura 6. Representación del análisis de conglomerados generados a partir del contenido de fenoles flavonoides y la capacidad reductora y actividad antirradicalaria de extractos etanólicos de polen corbicular.

reductora (FRAP) y el contenido de fenoles y flavonoides de las muestras analizadas y agrupadas en subniveles, (Cuadros 3 al 8). No obstante, el dendograma señala los grupos de muestras con características análogas, pero se revela el origen y su zona de vida, adicionalmente se describe la presencia de muestras de los dos entornos biogeográficos que presentan propiedades similares, este comportamiento se puede explicar teniendo en cuenta los periodos de oferta floral para polen en las zonas de estudio y los índices de similitud de Jaccard, (Salamanca, *et al.*, 2014).

La implementación de un sistema modelo mediante PLS-PATH para la relación entre la capacidad reductora y actividad antirradicalaria, el origen y la calidad de los extractos de polen corbicular, se ha desarrollado, para identificar la relación entre variables latentes y sus indicadores. El modelo estructural ha partido de tablas múltiples. El diagrama revela la correlación entre el origen del polen corbicular

y el poder reductor de los componentes en los EHAPo's (Corr.:0,21) y los componentes causantes de la actividad y capacidad de los fenoles y flavonoides de éstos mismos extractos (Corr.:0,528). La correlación de las fracciones fenólicas, la acidez total y la capacidad reductora y actividad antirradicalaria en significativa (Corr.:0,857), la diversidad polínica y composición del polen corbicular según el origen, definen la calidad de los extractos y rendimiento en la extracción de metabolitos con actividad y capacidad reductora. La proyección factorial de los EHAPo's se ilustra en la Figura 7.

Como complemento a las observaciones y exposición de resultados, vale indicar que los EHAPo's adicionalmente a los componentes fenólicos y flavonoides, contienen tipos de pigmentos que contribuyen en la determinación del poder antioxidante. La presencia y actividad de compuestos bioactivos esta influenciada por factores de entorno.

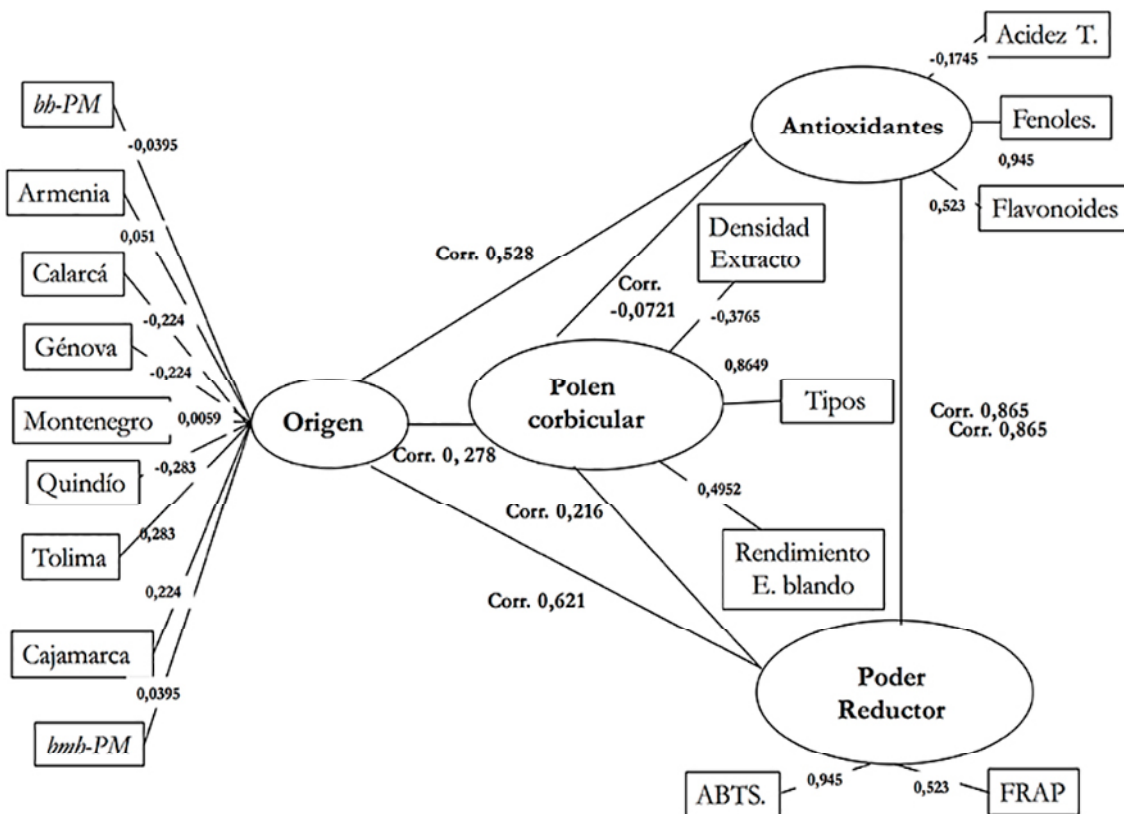


Figura 7. Relaciones PLS-PATH entre el origen biogeográfico de tipos de polen corbicular, los componentes de la actividad antirradicalaria y la capacidad reductora de extractos hidroalcohólicos.

CONCLUSIONES

Las muestras colectadas por las abejas en las dos zonas de vida son del tipo multifloral, con amplia variabilidad en la composición cromática en virtud a la biodiversidad en la oferta polinifera que marca la relación planta insecto con mayor variabilidad en muestras de bosque húmedo premontano de la zona de Cajamarca, con predominio de taxones botánicos de tonos café, marrón, amarillos y naranja, correspondientes a las familias *Asteraceae*, *Myrtaceae*, *Rosaceae*, *Bignoniaceae*, *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lauraceae* y *Solanaceae*, principalmente. La variabilidad de los tipos polínicos que constituyen las cargas polínicas inciden en las propiedades fisicoquímicas finales de los extractos, la densidad, rendimiento y calidad del extracto blando.

Los componentes solubles presentan tonalidades del amarillo al amarillo naranja. El rendimiento de los extractos blandos y la densidad de los mismos en relación al origen biogeográfico no presenta diferencias marcadas, no así el aporte de metabolitos, la fracción fenólica revela una importante propiedad antioxidante, complementaria al contenido de flavonoides, que ha sido estimada frente a estándares de referencia y que han permitido comparar la calidad de los extractos con otros trabajos reportados en la literatura. El perfil espectrofotométrico confirma la presencia de estructuras fenólicas y flavonoides sustituidos, de los cuales deriva su poder reductor y su actividad antirradicalaria con una marcada correlación entre el origen y sus componentes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a los apicultores de las localidades de Cajamarca, Ibagué y Armenia, en particular a Jorge Saavedra y Abdón Salazar Méndez, por su acompañamiento y apoyo en el proceso de colecta de las muestras. A Silvana Pugine y las Dras. Mariza Pires de Melo y Catarina Abdalla Gomide de los departamentos de Ciencias Básicas y Zootecnia, de la Facultad de Zootecnia e Ingeniería de Alimentos de la Universidade de Sao Paulo (Pirassununga, Brasil), por la acogida y asesoría en el proceso de evaluación de los parámetros analíticos. A Marisol Campuzano

Castellanos, Luis Carlos Casas Restrepo, por su apoyo en la fase de caracterizaciones cromáticas y análisis polínico. A la Universidad del Quindío por el apoyo económico para la estancia en Brasil. A Colciencia por el apoyo económico a través del programa de Jóvenes investigadores e Innovadores. Finalmente expresamos toda nuestra gratitud a los evaluadores del artículo y los colaboradores permanentes de la Revista Zootecnia Tropical, por las observaciones, sugerencias y recomendaciones al documento final durante el proceso de arbitraje.

LITERATURA CITADA

- Alencar, S. M., T. L. C. Oldoni, M. L. Castro, I. S. R. Cabral, C. M. Costa-Neto, J. A. Cury, P. L. Rosalen, M. Ikegaki. 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J. Ethnopharmacol.*, 113(2): 278-283.
- Aličić, D., D. Šubarić, M. Jašić, H. Pašalić, D. Ačkar. 2014. Antioxidant properties of pollen. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 3(1):6-12.
- Almaraz-Abarca, N., M. Campos, A. Delgado-Alvarado, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, A. F. Tomatas, A. J. Almeida, A. Vieira. 2007a. Fenoles del polen de *Stenocactus*, *Echinocereus* y *Mammillaria* (Cactaceae). *Polibotánica*, 23:37-55.
- Almaraz-Abarca, N., M. Campos, J. A. Ávila-Reyes. 2007b. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2): 119-124.
- Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera, L. S. González-Valdés. 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 29(10): 574-578.
- Almeida-Muradian, L. B., L. C. Pamplona, S. Coimbra, M. O. Barth. 2005. Chemical composition and botanical evaluation

- of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, Rome, 18(1):105-111.
- Aloisi y Ruppel, 2014. Propiedades bioactivas y nutricionales del polen apícola de la provincia del Chubut, Argentina. *Revista de investigaciones agropecuarias. RIA* (14):3, 296-302.
- Ângelo, P. M., N. Jorge. 2007. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Instituto Adolfo Lutz*, 66:1-9.
- Araujo, P. W. B., L. J. Q. Junior, H. D. Vasconcelos, J. R. G. S. Almeida. 2005. Flavonóides e hipertensão. *Revista Brasileira de Hipertensão*, 12(3): 188-189.
- Álvarez, L. H. R., G. G. Salamanca. 2009. Metodología de análisis sensorial de alimentos multivariado utilizando regresión partial least squares (RPLS) y el análisis factorial múltiple robusto (AFMROB). *Revista De La Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos: Alimentos Hoy. Rev. Asociación Colombiana De Ciencia y Tecnología de Alimentos Acta*, 17: 5D1.
- Álvarez, L. H. R., G. G. Salamanca. 2007. Caracterización de mieles a través del análisis factorial múltiple y el modelamiento PLS PATH". **En:** Ecuador In: *Alimentos ciencia e Ingeniería*, 16(1): 311-314.
- Aksoy, L., E. Kolay, Y. Agilönü, Z. Aslan, M. Kargiooglu. 2013. Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(3):235-239.
- Basim, E., H. Basim, M. Özcan. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77: 992-996.
- Bogdanov, S. 2011. Pollen: Production, nutrition and health: A Review, (November). pp. 1-29.
- Bogdanov, S. 2004. Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38: 334-34.
- Borja, P. F., G. G. Salamanca, S. Guzmán, M. Osorio. 2011. Validación de especies Botánicas de interés apícola a partir de Colección de referencia. *Memorias de 46 Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. ACCB. Medellín. Colombia.*
- Cabral, I.S.R., T. L. C. Oldoni, S. M. Alencar, P. L. Rosalen, M. Ikegaki. 2012. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(3): 557-564.
- Campos, M. G., R. F. Webby, K. R. Markham, K. A. Mitchall, A. P. Cunha. 2003. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 742-745.
- Carpes, S. T., R. Begnini, S. M. Alencar. 2007. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(6): 1818-1825.
- Carpes, S. T. 2008. Estudo das características Físico-Químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Sector de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.
- Carpes, S. T., B. G. Mourão, M. S. Alencar, L. M. Mansson. 2009. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47(2): 154-161.
- Cartaya, O., I. Reynaldo. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2): 5-14.
- Chantarudee, A., P. Phuwapraisirisan, K. Kimura, M. Okuyama, H. Mori, A. Kimura, C. Chanchao. 2012. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12: 45.

- Chu, Q., X. Tian, L. Jiang, J. Ye. 2007. Application of capillary electrophoresis to study phenolic profiles of honeybee-collected pollen. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 31: 8864-8869.
- Ciappinni, M. C., F. Stoppani, R. Martinez, M. Álvarez. 2013. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 19: 45-51.
- Cimpoi, C., A. Hosu, V. Miclaus, A. Puscas. 2013. Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. *Spectrochimica Acta A, Mol Biomol Spectrosc*, 100:149–154.
- Crozier, A., I. B. Jaganath, M. N. Clifford. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Reports*, 26:1001-1043.
- Cushnie, T. P. T., A. J. Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26:343–356.
- Del Risco, R. C. 2004. Polen-pan de abejas: Composición, nutrición, acción en la salud humanaymicrobiología, Cuba. Disponible en: <http://www.agroparlamento.com/agroparlamento/notas.asp?n=2308>. [Jun. 10, 2015].
- Dornas, W. C., T. T. Oliveira, R. G. Rodrigues-das-dores, A. F. Santos, T. J. Nagem. 2007. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28: 241-249.
- Dudonné, S. X., P. Vitarc, Coutière, M. Willez, J. Mérillon. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 57: 1768-1774.
- Duthie, G. G. 2003. Antioxidants. *Medicine*, 31: 25-26.
- Fatrocová-Šramková, K., J. Nozková, M. Kačániová, M. Máriássyová, K. Rovná, M. Stričík. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48:133-138.
- Feás, X., M. P. Vázquez-Tato, L. Estevinho, J. A. Seijas, A. Iglesias. 2012. Organic bee pollen: Bioactive compounds, antioxidante activity and microbiological quality. *Molecules*, 17: 8359-8377.
- Freire, K. R. L., C. S. Lins, M. C. Dórea, A. R. Santos, A. C. Camara, M. S. Silva. 2012. Palynological Origin, Phenolic Content, and Antioxidant Properties of Honeybee-Collected Pollen from Bahia, Brazil. *Molecules*, 17: 1652-1664.
- Gao, W., D. Schmoltdt, J. R. Slusser. 2010. UV radiation in global climate change. Tsinghua University Press, Beijing. 544 p.
- Gobert, M., M. Damon, D. Durand. 2013. Stress oxydant et qualités nutritionnelles des produits animaux. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, 48(5): 225–232.
- Guo, J., P. Zhang, Z. Zhang. 2009. Studies on chemical constituents from bee-collected rape pollen. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 34(10): 1235-1237.
- Graikou, K., S. Kapeta, N. Aligiannis, G. Sotiroidis, N. Chondrogianni, E. Gonos, I. Chinoul. 2011. Chemical analysis of greek pollen-Antioxidant, antimicrobial and proteosome activation properties. *Chemical Central Journal*, 5(33): 2-9
- Hernández, L. J., V. C. Reyes. 2012. Origen botánico, propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de polen corbicular colectado por *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en la zona de bosque altoandino de Boyacá. Trabajo de grado. Programa de Licenciatura en Educación Básica con énfasis en Ciencias Naturales y Educación Ambiental. Facultad de Ciencias de la Educación. Universidad del Tolima. Colombia.
- Hossain, M. A., S. M. Rahman. 2011. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 44(3): 672-676.

- Hung-Ju, C., B. S. Baskaran Inbaraj, C. Bing-Huei. 2012. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. *International Journal of Molecular Science*, 13(1): 260-285.
- Kao, Y. T., M. J. Lu, C. Chen. 2011. Preliminary analyses of phenolic compounds and antioxidant activities in tea pollen extracts. *Journal of Food Drug Analysis* 19: 470-477.
- Kacániová, M.; N. V. Chlebo, P. Hascík, K. Rovná, J. Cubon, M. Dzukan, A. Pasternakiewicz. 2012. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Archives of Biological Science*, 64(3): 927-934.
- Ketkar, S., A. Rathore, S. Lohidasan, L. Rao, A. Paradkar, K. Mahadik. 2014. Investigation of the nutraceutical potential of monofloral Indian mustard bee pollen. *Journal of Integrative Medicine*, 12(4): 379-389.
- Kosalec, M., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., Kne. S.V. 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica-Zagreb*, 54(1): 65-72.
- Kostic, A. Z., B. B. Miroljub, S. P. Stanojevic, D. M. Milojkovic-Opsenica, Z. Tesic, B. Sikoparija, P. Radisic, M. Prentovic, M. Pesic. 2015. Physicochemical composition and techno-functional properties of beepollen collected in Serbia. *LWT - Food Science and Technology*, 62: 301-309.
- Kroyer, G., N. Hegedus. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2:171-174.
- Kristerson, R. L., A. Freire, C. S. Lins, M. C. Dórea, A. R. Santos, C. A. Camara, T. S. M. Silva. 2012. Palynological Origin, Phenolic Content, and Antioxidant Properties of Honeybee-Collected Pollen from Bahia, Brazil. *Molecules*, 17(2): 1652-1664.
- LeBlanc, B. W., O. K. Davis, S. Boue, A. DeLucca, T. Deeby. 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, 115(4): 1299-1305.
- Leja, M., A. Mareczek, G. Wyzgolik, J. Klepacz-Baniak, K. Czekonska. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100(1): 237-240.
- Louveaux, J., A. Maurizio, G. Vorwohl. 1978. Methods of melisopalynology. *Bee world*, 59:139-157.
- Marchini, C. L., D. V. Acassio dos Reis, C. A. Carmelo. 2006. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. *Ciência rural*, 36(3): 949-953.
- Miliauskas, G., P. R. Venskutonisa, T. A. Beek. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2): 231-237.
- Mohdaly, A del A. A., A. A. Mahmoud, M. H. H. Roby, I. Smetanska, M. F. Ramadan. 2015. Phenolic Extract from Propolis and Bee Pollen: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities. *Journal of Food Biochemistry*, 39: 538-547.
- Montenegro, G., R. Pizarro, E. Mejias, S. Rodríguez. 2013. Evaluación biológica de polen apícola de plantas nativas de Chile. *Phyton (B. Aires)*, 82(1): 7-14.
- Morais, M., L. Moreira, X. Feás, L. M. Estevinho. 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidante properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(5): 1096-1101.
- Nagai, T., R. Inoue, H. Inoue, N. Suzuki. 2002. Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicais, hydroxyl radicais, and DPPH radicais. *Nutrition Research*, 22: 519-526.
- Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., Estevinho, L. M. 2012. Commercial bee pollen with different geographical origins: A

- comprehensive approach. *International Journal of Molecular Science*, 13(9): 11173-11187.
- Stanciu, O., L. Mârghitaş, D. Dezmirean, M. Campos. 2009. Macro- and oligomineral elements from honey bee collected pollen and beebreak harvested from Transylvania (Romania). *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary*, 66 (1/2):276-283.
- Pages, J., M. Tenenhaus. 2001. Multiple factor analysis combined with PLS path modelling. Application to the analysis of relationships between physicochemical variables, sensory profiles and hedonic judgements. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58: 261-273.
- Pal, D., S. Sannigrahi, U. Mazumder. 2009. Analgesic and anticonvulsant effects of saponin isolated from the leaves of *Clerodendrum infortunatum* Linn. in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 743-747.
- Pascoal, A., S. Rodrigues, A. Teixeira, X. Feás, L. M. Estevinho. 2013. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 63: 233-239.
- Pallab, K., B. K. Tapan, P. K. Tapas, K. Ramen. 2013. Estimation of total flavonoids content (tfc) and anti oxidant activities of methanolic whole plant extract of *biophytum sensitivum* linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3(4): 33-37.
- Pérez-Pérez, E. M., P. Vit, E. Rivas, R. Sciortino, A. Sosa, D. Tejada, A. J. Rodríguez-Malaver. 2012. Antioxidant activity of four color fractions of bee pollen from Mérida, Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 62(4): 375-380.
- Pinheiro, P. F., G. C. Justino. 2012. Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. Chapter 2. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds – A Review of Spectroscopic Applications. INTECH Open Access Publisher, ISBN9535102966. pp. 33-51.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Min Yang, C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
- Rzepecka-Stojko, A., J. Stojko, A. Kurek-Górecka, M. Górecki, R. Kubina, A. Mozdzierz, E. Buszman. 2015. Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. *Molecules*, 20(12): 21732-21749.
- Salamanca, G., T. M. Osorio, R. L. Casas. 2014. Origen botánico y dominancia cromática de las cargas de polen corbicular colectado por *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) en cuatro Zonas biogeográficas colombianas. *Zootecnia Tropical*, 32(4): 377-390.
- Salamanca, G., T. M. Osorio O. M. Gutiérrez. 2011. Sistema trazable en el proceso de extracción y beneficio del polen corbicular colectado por *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) en la zona Altoandina de Boyacá. *Zootecnia Tropical*, 29(1): 127-138.
- Salamanca, G. G., C. I. Correa, J. Principal. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, 25(2): 95-102.
- Sarmiento, T., C. Amorin, A. da Silva, J. Barbosa-Filho, E. Samento, B. Magalhães, F. Ribeiro. 2006. Chemical composition and free scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Duke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 507-511.
- Saxena, M., J. Saxena, A. Pradhan. 2012. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 16(2) No. 28: 130-134.
- Sayas, R. R., M. L. Huamán. 2009. Determinación de la flora polinífera del Valle de Oxapampa (Pasco – Perú) en base

- a estudios palinológicos. *Ecología aplicada*, 8(2): 53-59.
- Serra-Bonvehí, J., M. Soliva Torrentó, E. Centelles Lorente. 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1848-1853.
- Silva, T. M., C. A. Camara, A. C. Lins, M. F. Agra, E. M. Silva, T. Reis, B. M. Freitas. 2009. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(2): 173-178.
- Surveswaran, S., Y. Z. Cai, H. Corke, M. Sun. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102(3): 938-953.
- Thaiponga, K., U. Boonprakoba, K. Crosbyb, L. Cisneros-Zevallosc, D. Byrned. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC essays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7): 669-675.
- Vit, P. 2009. Origen botánico y propiedades medicinales del polen apícola. *Revista médica de la Extensión Portuguesa. ULA*, 3(1): 27-34.