



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Evaluación del polen apícola producido en Cundinamarca como fuente de componentes liposolubles de interés nutricional y antioxidante**

**Diana Carolina Prada Rodríguez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de ciencias agrarias, Departamento de agronomía  
Bogotá D.C., Colombia  
2022

# **Evaluación del polen apícola producido en Cundinamarca como fuente de componentes liposolubles de interés nutricional y antioxidante**

**Diana Carolina Prada Rodríguez**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Director (a):

Ph.D Amanda Consuelo Díaz Moreno

Codirector (a):

PhD. Carlos Alberto Fuenmayor Bobadilla

Línea de Investigación:

Calidad de Alimentos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias agrarias, Departamento de agronomía

Bogotá D.C., Colombia

2022

*Esta tesis está cariñosamente dedicada a mi madre, María Eugenia Rodríguez Parra. Su apoyo, aliento y amor constante me han sostenido a lo largo de mi vida.*



## Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Diana Carolina Prada Rodríguez

Fecha 28/04/2022

Fecha

## **Agradecimientos**

A la doctora Amanda Consuelo Díaz Moreno directora de esta tesis, por su apoyo, orientación y compromiso profesional, quien con su experiencia y dedicación hicieron posible este trabajo.

A Colciencias por el financiamiento del Fondo de Ciencia Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías, administrados por el Fondo Francisco José de Caldas - FJDC, derivado del Convenio 785 de 2017 (COLCIENCIAS - Departamento de Cundinamarca).

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia, por facilitar sus instalaciones y equipos para el desarrollo de la fase experimental y todos sus funcionarios, quienes con su larga experiencia guiaron y colaboraron en la realización de gran parte de las pruebas experimentales, especialmente a la Ingeniera María Cristina Lizarazo Aparicio y la Química Carol Edith Cortés Castillo.

Por último, agradezco a todos los compañeros de la Maestría, especialmente a Claudia, Sandra y Mónica ya que, gracias a su apoyo y colaboración, esta tesis pudo llevarse a cabo de la mejor manera.

## Resumen

### **Evaluación del polen apícola producido en Cundinamarca como fuente de componentes liposolubles de interés nutricional y antioxidante**

El trabajo presenta la evaluación de la fracción liposoluble del polen apícola y sus extractos de muestras provenientes de tres zonas del departamento de Cundinamarca en dos épocas del año. Se incluyó dentro de los análisis la caracterización palinológica, el análisis proximal, el perfil de ácidos grasos y contenido de vitamina E de las muestras de polen apícola y los extractos obtenidos por metodologías convencionales y no convencionales. A través de una metodología cromatográfica se realizó la determinación del perfil de carotenoides. Los resultados diversos en los análisis fisicoquímicos y palinológicos mostraron la influencia de las diferentes épocas (lluvia y de sequía) en la disponibilidad de las familias botánicas. En general, el análisis proximal arrojó que las muestras tienen unos contenidos de humedad de  $9,1 \pm 1,9\%$ , cenizas  $2,7 \pm 0,3\%$ , fibra  $9,1 \pm 1,9\%$  y proteína bruta  $27,1 \pm 1,7\%$ . Se determinaron las condiciones adecuadas para la extracción convencional (8 días de extracción) y por ultrasonido (34% de potencia por 14 minutos) empleando aceite comestible como solvente, las cuales junto con la extracción con fluidos supercríticos permitieron la obtención de extractos ricos en la fracción liposoluble del polen apícola. La técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleó una fase reversa con columna C30 y una fase móvil polar con gradiente de metanol: agua: tert butil metil éter. Esta técnica permitió la separación e identificación de los carotenoides presentes en las muestras de polen y en los extractos oleosos, se pudo identificar que estos son fuentes potenciales de estos compuestos bioactivos, siendo el carotenoide más abundante la  $\beta$ -criptoxantina.

**Palabras clave:** polen apícola, vitamina E, perfil de ácidos grasos, perfil de carotenoides, HPLC.

## Abstract

### **Evaluation of bee pollen produced in Cundinamarca as a source of fat-soluble components of nutritional and antioxidant interest.**

The work presents the evaluation of the fat-soluble fraction of bee pollen and its extracts from samples from three areas of the department of Cundinamarca at two times of the year. Included within the analyzes are the palynological characterization, the proximal analysis, the fatty acid profile and vitamin E content of the bee pollen samples, and the extracts obtained by conventional and unconventional methodologies. Through a chromatographic methodology, the carotenoid profile was determined. The diverse results in the physicochemical and palynological analyzes showed the influence of the different seasons (rainy and dry) on the availability of the botanical families. In general, the proximal analysis showed that the samples had moisture contents of  $9.1 \pm 1.9\%$ , ashes  $2.7 \pm 0.3\%$ , fiber  $9.1 \pm 1.9\%$  and crude protein  $27.1 \pm 1.7\%$ . The appropriate conditions were determined for conventional extraction (8 days of extraction) and by ultrasound (34% power for 14 minutes) using an edible oil as solvent, which together with the extraction with supercritical fluids allowed obtaining extracts rich in the fat-soluble fraction of bee pollen. The high-performance liquid chromatography (HPLC) technique uses a reverse phase with a C30 column and a polar mobile phase with a gradient of methanol: water: tert-butyl methyl ether. This technique allowed the separation and identification of the carotenoids present in the pollen samples and in the oily extracts, it was possible to identify that these are potential sources of these bioactive compounds, the most abundant carotenoid being  $\beta$ -cryptoxanthin.

**Keywords: Bee pollen, Vitamin E, fatty acid profile, carotenoid profile, HPLC.**

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>3</b>
Objetivo general .....	3
Objetivos específicos .....	3
<b>1. Marco Teórico</b> .....	<b>5</b>
1.1 Generalidades del polen apícola .....	5
1.2 Composición del polen apícola.....	6
1.2.1 Carbohidratos .....	7
1.2.2 Proteínas.....	7
1.2.3 Minerales .....	8
1.3 Lípidos .....	8
1.3.1 Ácidos grasos .....	11
▪ <b>Ácidos grasos en polen apícola</b> .....	13
▪ <b>Capacidad antioxidante</b> .....	14
1.3.2 Vitamina E.....	14
▪ <b>Vitamina E en polen apícola</b> .....	15
▪ <b>Capacidad antioxidante</b> .....	16
1.3.3 Esteroles .....	17
▪ <b>Esteroles en polen apícola</b> .....	18
▪ <b>Actividad antioxidante</b> .....	19
1.3.4 Carotenoides.....	19
▪ <b>Provitamina A</b> .....	20
▪ <b>Carotenoides en el polen apícola</b> .....	21
▪ <b>Actividad antioxidante</b> .....	22
<b>2. Caracterización fisicoquímica del polen apícola de Cundinamarca</b> .....	<b>24</b>
2.1 Materiales y métodos .....	24

2.1.1	Muestras de polen apícola.....	24
▪	<b>Acondicionamiento y almacenamiento de las muestras de polen apícola</b>	25
2.1.2	Actividad de agua .....	26
2.1.3	Análisis palinológico .....	27
2.1.1	Carotenoides totales.....	27
2.1.2	Capacidad antioxidante y fenoles totales .....	28
▪	<b>Preparación de extractos etanólicos</b> .....	28
▪	<b>Actividad antioxidante por FRAP</b> .....	29
▪	<b>Actividad antioxidante por TEAC</b> .....	29
▪	<b>Contenido de fenoles totales</b> .....	30
2.1.3	Análisis proximal.....	31
▪	<b>Determinación de humedad</b> .....	31
▪	<b>Determinación de cenizas y minerales</b> .....	32
▪	<b>Determinación de grasa</b> .....	32
▪	<b>Determinación de contenido de proteína (N total)</b> .....	32
▪	<b>Determinación de fibra dietaria total</b> .....	32
2.1.4	Perfil de ácidos grasos .....	33
2.1.5	Contenido de vitamina E.....	33
2.2	Análisis estadístico.....	34
2.3	Resultados y discusión.....	34
2.3.1	Muestras de polen apícola.....	34
2.3.2	Análisis palinológico .....	36
2.3.3	Carotenoides totales.....	40
2.3.4	Actividad antioxidante y fenoles totales.....	41
2.3.5	Análisis proximal.....	44
2.3.6	Perfil de ácidos grasos .....	47
2.3.7	Contenido de vitamina E.....	49
2.4	Conclusiones parciales .....	50
<b>3.</b>	<b>Extracción de los compuestos liposolubles del polen apícola</b> .....	<b>51</b>
3.1	Marco Teórico .....	51
3.1.1	Extracción sólido-líquido.....	52
▪	<b>Cinética de extracción</b> .....	54
3.1.2	Extracción asistida por ultrasonido .....	55
3.1.3	Extracción con fluidos supercríticos .....	57
3.2	Materiales y métodos .....	58
3.2.1	Polen apícola .....	58
3.2.2	Determinación de las variables de extracción convencional .....	58
3.2.3	Determinación de las variables de extracción asistida por ultrasonido .....	59
3.2.4	Extracción con fluidos supercríticos .....	60
3.2.5	Pruebas de oxidación de los extractos oleosos.....	61
▪	<b>Índice de peróxidos (PV)</b> .....	61
▪	<b>Índice de p-anisidina (AV)</b> .....	62
▪	Valor TOTOX .....	62
3.2.1	Color .....	62
3.2.2	Carotenoides totales.....	63
3.2.3	Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	63
3.3	Análisis estadístico.....	64
3.4	Resultados y discusión.....	64

3.4.1	Determinación de las variables de extracción .....	64
▪	<b>Extracción asistida por ultrasonido</b> .....	67
3.4.2	Extracción con fluidos supercríticos.....	69
3.4.3	Pruebas de oxidación de los extractos oleosos.....	70
▪	<b>Índice de peróxidos</b> .....	70
▪	<b>Índice de p-anisidina</b> .....	71
▪	<b>Índice TOTOX</b> .....	72
3.4.1	Color .....	73
3.4.2	Carotenoides totales .....	77
3.4.3	Perfil de ácidos grasos.....	79
3.4.4	Contenido de vitamina E.....	81
3.4.5	Microscopia electrónica de barrido .....	82
3.1	Conclusiones parciales.....	85
<b>4.</b>	<b>Perfil de carotenoides .....</b>	<b>86</b>
4.1	Fundamento teórico.....	86
4.1.1	HPLC .....	86
4.1.2	Saponificación.....	89
4.1.3	Separación cromatográfica .....	89
4.1.4	Identificación de carotenoides .....	92
▪	<b>Detector de matriz de diodos (PDA)</b> .....	92
▪	<b>Espectrometría de masas acoplada a HPLC</b> .....	92
4.2	Materiales y métodos .....	93
4.2.1	Muestras .....	93
4.2.2	Reactivos .....	93
4.2.3	Pretratamiento para las muestras.....	93
▪	<b>Pretratamiento para polen apícola</b> .....	94
▪	<b>Pretratamiento para el extracto oleoso</b> .....	95
4.2.4	Análisis de extractos .....	96
4.2.5	Curvas de calibración .....	97
4.2.6	Límite de detección (LOD) Y límite de cuantificación (LOQ) .....	98
4.3	Análisis estadístico .....	98
4.4	Resultados.....	98
4.4.1	Curvas de calibración .....	98
▪	<b>β-caroteno</b> .....	98
▪	<b>Zeaxantina</b> .....	100
▪	<b>Luteína</b> .....	102
4.4.2	LOD y LOQ .....	104
4.4.1	Perfil de carotenoides del polen.....	105
▪	<b>Muestra Nororiente</b> .....	105
▪	<b>Muestra Occidente</b> .....	106
▪	<b>Muestra Suroriente</b> .....	107
4.4.2	Perfil de carotenoides de los extractos oleosos.....	108
4.4.3	Cuantificación de carotenoides.....	110
4.5	Conclusiones parciales.....	112
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>115</b>
5.1	Conclusiones .....	115
5.2	Recomendaciones.....	116
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>117</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1-1:</b> Producción del polen apícola. ....	6
<b>Figura 1-2:</b> Estructura de los ácidos grasos omega-3. ....	11
<b>Figura 1-3:</b> Estructura química de los diferentes isómeros de la vitamina E. ....	15
<b>Figura 1-4:</b> Estructura de los esteroides. ....	17
<b>Figura 1-5:</b> Estructura de diferentes carotenoides. ....	20
<b>Figura 1-6:</b> estructura química de a. Retinol y b. ácido retinoico. ....	21
<b>Figura 2- 1:</b> Distribución geográfica de los apiarios muestreados. ....	25
<b>Figura 2- 2:</b> Tamices usados para la separación del polen apícola. ....	26
<b>Figura 2- 3:</b> Composición proximal de los alimentos. ....	31
<b>Figura 2- 4:</b> Ciclizado, secado, tamizado y almacenamiento de polen apícola. ....	34
<b>Figura 2- 5:</b> Actividad del agua de las muestras secas de cada zona de la época seca. ....	35
<b>Figura 2- 6:</b> Vista microscópica de los tipos polínicos presentes en polen de Cundinamarca. ....	39
<b>Figura 2- 7:</b> Contenido de vitamina E en polen apícola. ....	49
<b>Figura 3- 1:</b> Ultrasonido. ....	60
<b>Figura 3- 2:</b> Microscopio electrónico de barrido. ....	64
<b>Figura 3- 3:</b> Cinética de extracción de carotenoides del polen apícola. ....	65
<b>Figura 3- 4:</b> Modelo de segundo orden aplicado a la cinética de extracción de carotenoides del polen apícola. ....	65
<b>Figura 3- 5:</b> Promedio y desviación estándar del contenido de carotenoides en diferentes días de extracción. ....	66
<b>Figura 3- 6:</b> Grafico de superficie de respuesta. ....	68
<b>Figura 3- 7:</b> Contenido de vitamina E en los extractos oleosos. ....	82
<b>Figura 3- 8:</b> Microscopía electrónica de barrido. ....	83
<b>Figura 4- 1:</b> Separación de carotenoides en columna a) C <sub>18</sub> b) C <sub>30</sub> . Fuente: (González Cárdenas, 2010) ....	91
<b>Figura 4- 2:</b> Etapas de los pretratamientos de las muestras de polen apícola y de los extractos oleosos. ....	93
<b>Figura 4- 3:</b> Diferentes tonalidades del polen. ....	94

<b>Figura 4- 4:</b> diferentes tonalidades de los extractos .....	95
<b>Figura 4- 5:</b> Cromatogramas de $\beta$ -caroteno a diferentes concentraciones.....	99
<b>Figura 4- 6:</b> Espectro de absorción del $\beta$ -caroteno.....	99
<b>Figura 4- 7:</b> Curva de calibración de $\beta$ -caroteno.....	99
<b>Figura 4- 8:</b> Cromatogramas de zeaxantina a diferentes concentraciones.....	101
<b>Figura 4- 9:</b> Espectro de absorción de la zeaxantina.....	101
<b>Figura 4- 10:</b> Curva de calibración de Zeaxantina .....	101
<b>Figura 4- 11:</b> Cromatogramas de Luteína a diferentes concentraciones.....	103
<b>Figura 4- 12:</b> Espectro de absorción de Luteína.....	103
<b>Figura 4- 13:</b> Curva de calibración de Luteína.....	103
<b>Figura 4- 14:</b> Perfil de carotenoides de la muestra NO en época de lluvia.....	105
<b>Figura 4- 15:</b> Perfil de carotenoides de la muestra SO en época de sequía. ....	106
<b>Figura 4- 16:</b> Perfil de carotenoides de la muestra O en época de lluvia. ....	106
<b>Figura 4- 17:</b> Perfil de carotenoides de la muestra O en época de sequía.....	107
<b>Figura 4- 18:</b> Perfil de carotenoides de la muestra SO en época de lluvia.....	107
<b>Figura 4- 19:</b> Perfil de carotenoides de la muestra SO en época de sequía. ....	108
<b>Figura 4- 20:</b> Perfil de carotenoides del extracto convencional de la muestra NO en época de lluvia.....	108
<b>Figura 4- 21:</b> Perfil de carotenoides del extracto por ultrasonido de la muestra NO en época de lluvia.....	109
<b>Figura 4- 22:</b> Perfil de carotenoides del extracto supercrítico de la muestra NO en época de lluvia.....	109

## Lista de tablas

<b>Tabla 1-1:</b> Componentes nutricionales, humedad y cenizas de muestras de polen apícola de Colombia y diferentes países .....	10
<b>Tabla 1-2:</b> Ácidos grasos presentes en muestras de polen apícola colombiano y otros países .....	12
<b>Tabla 1-3:</b> Rangos de concentración de la Vitamina E en el polen apícola de diferentes orígenes.....	15
<b>Tabla 1-4:</b> Contenido de fitoesteroles en pólenes de diferentes países .....	18
<b>Tabla 1-5:</b> Contenido de carotenoides totales en pólenes de diferentes países .....	21
<b>Tabla 2- 1:</b> Muestras de polen apícola.....	24
<b>Tabla 2- 2</b> Muestras de polen apícola homogenizado .....	35
<b>Tabla 2- 3:</b> Abundancia y riqueza de los tipos polínicos presentes en las muestras de polen seco .....	36
<b>Tabla 2- 4:</b> Contenido de carotenoides totales en muestras de polen de Cundinamarca	40
<b>Tabla 2- 5:</b> Capacidad antioxidante, y contenido de fenoles .....	41
<b>Tabla 2- 6:</b> Análisis proximal de las muestras de polen apícola .....	44
<b>Tabla 2- 7:</b> Contenido de minerales en las muestras de polen apícola .....	45
<b>Tabla 2- 8:</b> Aporte porcentual de los minerales a los valores diarios de referencia.....	45
<b>Tabla 2- 9:</b> %Perfil de ácidos grasos del polen apícola .....	47
<b>Tabla 3- 1:</b> Condiciones supercríticas de algunos compuestos (Román et al., 2016).....	58
<b>Tabla 3- 2:</b> Diseño experimental, variables independientes y sus niveles de variación...	59
<b>Tabla 3- 3:</b> Índice de peróxidos de extractos oleosos del polen apícola expresado como mEq de oxígeno/ kg de extracto .....	70
<b>Tabla 3- 4:</b> Índice de p-anisidina de extractos de polen apícola expresado como mEq de oxígeno / kg de extracto .....	71
<b>Tabla 3- 5:</b> Índice TOTOX de extractos ricos en carotenoides .....	73
<b>Tabla 3- 6:</b> Color de los diferentes extractos del polen apícola .....	73
<b>Tabla 3- 7:</b> Coordenadas CIELAB (L*, a*, b*) de los extractos oleosos .....	74
<b>Tabla 3- 8:</b> Croma y Tono de los extractos oleosos de polen.....	75
<b>Tabla 3- 9:</b> Correlaciones entre los componentes principales del color y los carotenoides totales de las muestras oleosas del polen.....	77

---

<b>Tabla 3- 10:</b> Carotenoides totales en los extractos oleosos de polen apícola expresado como mg $\beta$ -caroteno/ kg aceite.....	77
<b>Tabla 3- 11:</b> Perfil de ácidos grasos de los extractos convencionales, ultrasonido y supercríticos de la muestra NO en la época de lluvia.....	79
<b>Tabla 4- 1:</b> Gradiente de trabajo .....	97
<b>Tabla 4- 2:</b> Coeficientes de la curva de calibración de $\beta$ -caroteno .....	100
<b>Tabla 4- 3:</b> Coeficientes de la curva de calibración de zeaxantina .....	102
<b>Tabla 4- 4:</b> Coeficientes de la curva de calibración de Luteína.....	104
<b>Tabla 4- 5:</b> Intercepto (a), pendiente, LOD y LOQ .....	104
<b>Tabla 4- 6:</b> Cuantificación de luteína, zeaxantina y $\beta$ -caroteno en las muestras de polen apícola .....	110
<b>Tabla 4- 7:</b> Cuantificación de luteína, zeaxantina y $\beta$ -caroteno en los extractos oleosos de polen apícola.....	111

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos y Abreviaturas

---

Abreviatura	Término
%	Porcentaje
±	Mas o menos
≤	Menor o igual que
≥	Mayor o igual que
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
°C	Grados Celsius
kHz	kilohercio
MHz	Megahercio
cm	centímetros
K	kelvin
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
UFC	Unidades formadoras de colonias
g	Gramos
Kg	Kilogramos
μg	Microgramos
mL	Mililitros
μL	Microlitros
nm	Nanómetros
SFA	Ácidos grasos saturados
UFA	Ácidos grasos monoinsaturados
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturado
LA	Acido linoleico
GLA	Acido gamma linolénico
ALA	Acido alfa linolénico
UI	Unidades internacionales
ROS	Especies reactivas del oxígeno
c.d.b.	Dobles enlaces conjugados
β-sterol	β-sitosterol
Es-sterol	Estigmasterol
C-sterol	Campesterol
24MC	24-metilencolesterol
Frap	Capacidad de reducción del hierro
Teac	Capacidad antioxidante equivalente al trolox
β-c	β-caroteno

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
sln	Solución
DM	Materia seca
Zea	zeaxantina
RDA	Cantidad diaria recomendada
RAE	Equivalentes de actividad de retinol
ECV	Enfermedades cardiovasculares
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
rpm	Revoluciones por minuto
CT	Carotenoides totales
UV-VIS	Ultravioleta-visible
A.O.A.C	ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL COLLABORATION
FDS	Fibra dietaria soluble
FDI	Fibra dietaria insoluble
ANOVA	análisis de varianza
SFAS	Ácidos grasos saturados
MUFAS	Ácidos grasos monoinsaturados
PUFAS	Ácidos grasos polinsaturados
n-3	Ácidos grasos Omega 3
n-6	Ácidos grasos Omega 6
n6/n-3	Relación omega3 – omega6
EAM	Extracción asistida por microondas
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EFS	Extracción con fluidos supercríticos
atm	Atmosfera

## Superíndices

---

<b>Superíndice</b>	<b>Término</b>
n	Exponente, potencia



# Introducción

El polen apícola es uno de los principales productos de la colmena, contiene componentes nutricionales y bioactivos que contribuyen a los requerimientos nutricionales necesarios para el correcto funcionamiento de la colmena y utilizados como un suplemento nutricional para los seres humanos. La calidad y el contenido de los componentes nutricionales y bioactivos varían según el origen botánico y geográfico (Li et al., 2018), lo que genera características específicas del producto según la diversidad floral de las zonas. Gracias a la posición geográfica y la presencia de todos los pisos térmicos, Colombia cuenta con una gran diversidad floral que permite la producción de una amplia variedad de polen, principalmente su producción se centra en la región andina a alturas superiores a los 2600 metros sobre el nivel del mar y se destacan como principales productores los departamentos de Boyacá y Cundinamarca con un promedio de producción de 35-40 Kg/colmena/año (CPAA, 2018).

La composición química del polen apícola presenta la mayor variabilidad dentro de los productos de la colmena, lo cual se debe principalmente a la disponibilidad de los recursos florales visitados por las abejas, los cuales pueden sufrir algunas variaciones según la época del año y la zona de producción. La correcta caracterización fisicoquímica del polen apícola en las diferentes regiones y épocas del país es indispensable para poder asegurar su calidad y brindar información completa a los consumidores o para el desarrollo de nuevas formulaciones.

Los diferentes compuestos nutricionales y bioactivos del polen apícola pueden ser aprovechados en productos de distintas industrias como la alimenticia, farmacéutica, cosmética, etc. En estos casos la incorporación de los compuestos de interés puede realizarse de manera directa o indirecta en forma de extractos ya sean acuosos u oleosos, extraídos con diversas metodologías. El principal objetivo de este trabajo fue la evaluación de los componentes liposolubles de interés nutricional y antioxidante en el polen apícola de tres zonas de Cundinamarca y de sus extractos oleosos obtenidos por metodologías de

extracción convencional (agitación) y no convencionales (ultrasonido y fluidos supercríticos).

Los resultados obtenidos indican que el polen apícola recolectado en Cundinamarca presenta buenas características nutricionales y bioactivas en base al contenido de proteína ( $27.1 \pm 1.7$  g/100g de polen), ácidos grasos ( $3,1 \pm 0,5$  g de ácido  $\alpha$ -linolénico /100g de polen), carotenoides totales ( $65,4-1302$   $\mu$ g  $\beta$ caroteno/g de polen) y vitamina E ( $40,0 \pm 12,4$   $\mu$ g  $\alpha$ -tocoferol/g de polen). Adicionalmente, se utilizó un método cromatográfico para conocer el perfil de carotenoides e identificar el compuesto presente en mayor proporción fue la  $\beta$ -criptoxantina.

En el desarrollo de la técnica cromatográfica se establecieron los procesos y parámetros necesarios para la separación de impurezas que pudieran interactuar con la fase estacionaria, tales como; ceras, ácidos grasos, esteroides, etc. Adicionalmente, las condiciones operacionales del equipo (Jasco LC-2000 plus) se adaptó del estudio publicado por Stinco et al., (2019). La incorporación de la metodología cromatográfica desarrollada en este trabajo permitirá la correcta caracterización del polen apícola y sus extractos oleosos, con ello se podrá definir su aplicación en las diferentes industrias. Por ejemplo, en la acuicultura, los carotenoides (carotenos y xantofilas) son utilizados como aditivos alimentarios para la coloración y estabilidad de la carne de los salmónidos. Más específicamente, la luteína y la zeaxantina; presentes en todas las muestras analizadas, son uno de los carotenoides más utilizados como aditivos alimentarios, en la industria cosmética se aprovechan sus características antioxidantes para utilizarlos como suplementos nutricionales y componentes de cremas (Meléndez-Martínez, 2017; Suárez Heredia et al., 2019). La  $\beta$ -criptoxantina es el segundo carotenoide después del  $\beta$ -carotenos con la mayor actividad provitamina A, recomendado en la ingesta diaria para cumplir con los requerimientos nutricionales (Meléndez-Martínez, 2017).

Finalmente, estos resultados pueden usarse como una herramienta importante para facilitar la promoción, comercialización y consumo del polen apícola, que finalmente ayudaría a fomentar la apicultura y el mejor aprovechamiento de esta materia prima especialmente por sus cualidades funcionales.

---

# Objetivos

## Objetivo general

Identificar los componentes liposolubles de interés nutricional y antioxidante en polen apícola de tres zonas de Cundinamarca obtenidos por tres metodologías de extracción.

## Objetivos específicos

- Determinar el pretratamiento y las condiciones cromatográficas (HPLC), que permitan la separación de los carotenoides en polen apícola.
- Identificar las diferencias en el contenido de vitamina E, perfil de ácidos grasos y perfil de carotenoides en polen apícola de tres regiones de Cundinamarca.
- Analizar el contenido de vitamina E, perfil de ácidos grasos y perfil de carotenoides en extractos de polen apícola obtenidos a través de tres metodologías de extracción (extracción por agitación, asistida por ultrasonido y fluidos supercríticos).



---

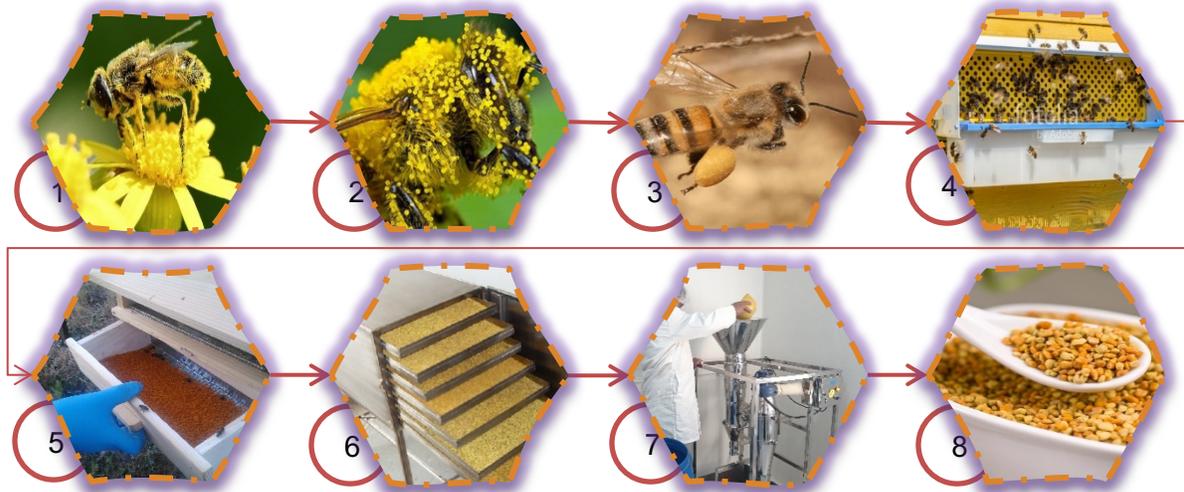
# 1. Marco Teórico

## 1.1 Generalidades del polen apícola

La producción de polen apícola comienza durante el pecoreo de las abejas. El polen floral (gametofitos masculinos utilizados en la reproducción de plantas con semillas) se adhiere a los pelos presentes en sus cuerpos, una vez que la abeja está cubierta de polen, la "peinan" con una serie de pelos rígidos ubicados en sus patas; simultáneamente, lo mezclan con néctar, productos salivales y obtienen dos pellets que cargan en sus corbículas, y lo transportan a la colmena (Agus et al., 2019; Gardana et al., 2018). Los apicultores colocan trampas en la entrada de la colmena que pueden ser mallas de alambre o placas perforadas de madera, metal o plástico, con orificios de 4 a 5 mm de diámetro, a través de las cuales las abejas son obligadas a pasar. En este camino, las abejas pierden parte de los gránulos de polen, los cuales se va recolectando dentro de la trampa (Durán, 2014; Hoover & Ovinge, 2018).

En el proceso de beneficio y comercialización, se recomienda almacenar el polen apícola a  $-20^{\circ}\text{C}$ , inmediatamente después de la cosecha, debido a su alta humedad (20-30 g agua/100 g) y contenido de nutrientes, estas condiciones lo convierten en un medio ideal para el crecimiento de microorganismos, como levaduras, mohos, bacterias formadoras de esporas y cocos, afectando las características organolépticas y la seguridad del polen apícola (presencia de patógenos bacterianos, producción de aminas biogénicas, etc.). Por ello, los productores deben realizar un proceso de secado para conservar el producto y comercializarlo de forma segura (Pascal, 2018). Un buen índice de calidad microbiológica está relacionado con la concentración de bacterias en el polen apícola (De-Melo et al., 2016). Sin embargo, depende en gran medida de factores ambientales. Por lo tanto, para reducir la contaminación del polen por microorganismos, debe prepararse adecuadamente y almacenarse en fresco a  $-20^{\circ}\text{C}$  o a temperatura ambiente con humedad menor al 8%. (A. Kostić et al., 2019; Nuvoloni et al., 2021; Sinkevičienė et al., 2021). En la

Figura 1-1 se muestra el proceso de beneficio del polen apícola



**Figura 1-1:** Producción del polen apícola.

1. Abeja en la flor, 2. Abeja cubierta de polen floral, 3. Abeja transportando polen en sus patas traseras, 4. Abejas pasando a través de una trampa, 5. Bandeja de recolección del polen, 6. Secado del polen, 7. Limpieza del polen por medio de ciclizado, 8. Polen listo para el consumo.

## 1.2 Composición del polen apícola

Las características organolépticas y los componentes químicos del polen pueden variar debido a factores como: el clima, la estacionalidad y el tipo de flora visitada por la abeja. Por ejemplo, en clima cálido y húmedo con alta diversidad forestal, y una mayor variedad de flores, encontramos polen apícola multifloral, con un origen botánico mucho más diverso que un polen apícola monofloral (Negrão & Orsi, 2018).

El polen apícola tiene un alto valor nutricional, así como varias biofuncionalidades, incluyendo actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, antibacteriana y cardioprotectora, principalmente asociadas a la composición nutricional y componentes bioactivos, como los compuestos fenólicos ( flavonoides y ácidos fenólicos), ácidos grasos, carotenoides y vitamina E (Abu Shady et al., 2016; Cabrera & Montenegro, 2013; Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016; Kafadar et al., 2012; Klaric et al., 2018; Rodríguez et al., 2015; Velásquez et al., 2017).

La composición del polen apícola en materia seca puede variar entre un 13-85% de carbohidratos, 10-30% de proteínas, 0.04-20% de lípidos, 0.3-34% de fibra, 0,5-3% de cenizas, además de vitaminas, precursores de hormonas, enzimas, flavonoides y

---

carotenoides (Barajas et al., 2012; Komosinska-Vassev et al., 2015; Q.-Q. Li et al., 2018; Velásquez et al., 2017; Zuluaga, 2015; Aylanc et al., 2021).

### **1.2.1 Carbohidratos**

Los carbohidratos son el componente nutricional más abundante en el polen apícola (13 - 85 %), incluidos los azúcares, el almidón y la fibra dietética (Ares et al., 2018). La fructosa, la glucosa y la sacarosa representan más del 90 % de los azúcares de bajo peso molecular (Bertoncelj et al., 2018). Contiene polisacáridos y oligosacáridos como la maltosa y la melecitosa (Zuluaga, 2015). Los azúcares reductores pueden variar entre 23,2-44,8%. El contenido de azúcar reductor del polen apícola está asociado con la presencia de néctar de plantas/saliva de abeja, que las abejas utilizan para aglutinar los pellets del polen apícola (Hsu et al., 2021; Mazurek et al., 2021).

En general, el polen apícola demuestra ser una buena fuente de fibra dietética, la cual, está compuesta principalmente por una fracción insoluble que representa el 73–83% (Bertoncelj et al., 2018; Díaz M. et al., 2012). Cabe señalar que el compuesto florizina (phloridzin) fue identificado por primera vez en muestras de polen apícola por Bayram et al., (2021), este glucósido pertenece a la subclase de las dihidrocalconas y, casi exclusivamente, se encuentra entre las plantas que pertenecen a la familia Rosaceae o Ericaceae y puede ser utilizado como marcador quimiotaxonómico de la presencia de polen de rosáceas (género *Malus* o *Prunus*) en polen apícola.

### **1.2.2 Proteínas**

Las proteínas son el segundo macronutriente, representando entre el 10 y el 32,2% de la composición total. El contenido de proteína del polen apícola es de gran importancia ya que se utiliza principalmente para clasificar la calidad del polen apícola de la siguiente manera: excelente (>25 %), media (20–25 %) y mala (<20 %) (Hsu et al., 2021). También es fundamental la presencia y cantidad de aminoácidos esenciales, los cuales representan el 34,59-48,49 % en esta fracción ( Taha et al., 2017).

En el polen apícola se han identificado los nueve aminoácidos esenciales, la prolina y la serina como aminoácidos condicionales (da Silva et al., 2014; Komosinska-Vassev et al., 2015; Paramás et al., 2006). La prolina, principal aminoácido libre en el polen recolectado por las abejas, es fundamental porque las abejas lo utilizan como compuesto estimulante

de fagos y fuente de energía para sus vuelos. Además, la proporción de prolina/aminoácidos totales se puede utilizar como parámetro de frescura. Si esta relación es inferior a 0,65, se puede suponer que las muestras se secaron y almacenaron adecuadamente (Bayram et al., 2021; Castagna et al., 2020).

### 1.2.3 Minerales

En los minerales presentes en el polen apícola se encuentran macroelementos como: sodio ( $\leq 0.835\%$ ), potasio (0.1.43-0.991%), calcio (0.010-0.575%), magnesio (0.022-0.568%) y fósforo (0.029-0.886%), microelementos como: hierro (0.0011-0.0552%), zinc (0.0016-0.0340%), manganeso (0.0005-0.0430%) y cobre (0.0003-0.0028%) y oligoelementos como: cromo, níquel y selenio así como algunos otros metales como: aluminio, estroncio, estaño y vanadio (Altunatmaz et al., 2017; Liolios et al., 2019; Morgano et al., 2012; Taha, 2015).

## 1.3 Lípidos

El contenido de la fracción lipídica es muy variable y representa entre el 0,04 y el 20 % de la composición del polen apícola (Sattler et al., 2015). Está formado por compuestos como carotenoides (0,0003-0,0763%), vitamina E (0,0017-0,0196%), ésteres (0,046-1,132%) y ésteres de glicerol saturados (31,6%-80%) e insaturados (24,22- 73,7%) ácidos grasos, pero también incluye lípidos secundarios menores como se comenta a continuación (Alayunt et al., 2013; Gardana et al., 2018; Pereira De Melo & de Almeida-Muradian, 2010; Vanderplanck et al., 2014; Velásquez et al., 2017; Xu et al., 2011). La variabilidad significativa en la composición de lípidos del polen apícola dependerá del origen botánico, el clima, las temporadas de cosecha, etc. En países con estaciones, Al-Kahtani et al., (2021) recomiendan recolectar cargas de polen durante la primavera y el verano para alimentar colonias de abejas durante los períodos de escasez y para su uso como alimento saludable y nutritivo para los humanos. La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.-1** muestra la composición química del polen de diferentes orígenes.

La composición lipídica del polen apícola incluye esteroides, mono, di y triglicéridos, ácidos grasos esenciales, fosfolípidos, hidrocarburos y terpenos. Las sustancias antioxidantes lipofílicas, que también pueden ser relevantes en la nutrición humana, se distribuyen principalmente en la capa externa del grano de polen (exina) (Conte et al., 2017; Vaudo et al., 2020; Zuluaga, 2015). El perfil de lípidos en el polen apícola multifloral ha sido un desafío

---

para dilucidar completamente utilizando técnicas analíticas, como la espectrometría de masas convencional, debido a las estructuras complejas y los numerosos isómeros de lípidos. Por lo tanto, la información sobre los perfiles de lípidos completos en el polen apícola es algo limitada en la literatura. La espectrometría de masas Q-Exactive Orbitrap ha sido utilizada con éxito por Li et al., (2017) para perfilar y cuantificar varios lípidos en el polen apícola, incluidas 41 fosfatidilcolinas ( $3052,71 \pm 1891,08 \mu\text{g/g}$ ), 43 fosfatidiletanolaminas ( $1002,88 \pm 1133,79 \mu\text{g/g}$ ), 9 fosfatidilglicerol ( $125,00 \pm 88,38 \mu\text{g/g}$ ), 10 fosfatidilserinas ( $43,79 \pm 42,81 \mu\text{g/g}$ ), 12 lisofosfatidilcolinas ( $636,18 \pm 523,14 \mu\text{g/g}$ ), 8 ceramidas ( $9,92 \pm 9,91 \mu\text{g/g}$ ), 27 diglicéridos ( $3,93 \pm 167513 \mu\text{g/g}$ ), 137 triglicéridos ( $3215,91 \pm 1367,99 \mu\text{g/g}$ ) y 47 ácidos grasos. Estos hallazgos destacan la composición altamente compleja del contenido de lípidos del polen apícola.

**Tabla 1-1:** Componentes nutricionales, humedad y cenizas de muestras de polen apícola de Colombia y diferentes países

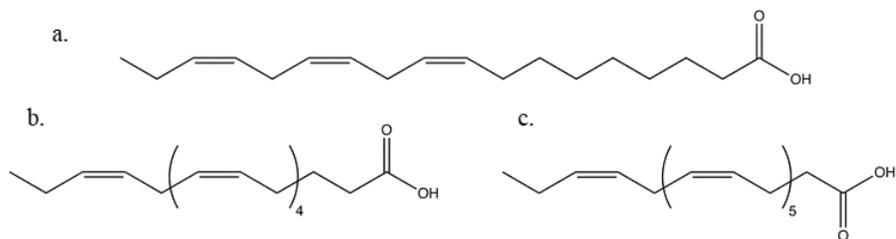
g/100g	Humedad	aW	Proteína	Grasa	Cenizas	Fibra	Carbohidratos	Fructosa	Glucosa	Referencias
<b>Colombia</b>	8,3 ± 1,9	0,4 ± 0,1	28,8 ± 3,0	5,1 ± 1,8	2,9 ± 0,3	0,4 ± 0,5	-	-	-	(BARAJAS et al., 2012)
	7,1 ± 2,0	0,3 ± 0,1	28,2 ± 1,9	2,2 ± 1,8	3,2 ± 0,3	-	-	-	-	
	7,7 ± 5,2	-	23,8 ± 3,2	6,9 ± 3,5	2,5 ± 0,4	14,5 ± 3,5	-	19,5 ± 0,9	13,6 ± 2,4	(Fuenmayor B. et al., 2014)
	15,5 ± 0,4*	-	21,6 ± 0,5	6,0 ± 0,2	2,1 ± 0,2	-	39,1 ± 1,9	18,7 ± 1,2	14,4 ± 0,9	(Gardana et al., 2018)
<b>Portugal</b>	6,0 - 8,40	0,3 - 0,4	18,8 - 25,1	2,3 - 3,1	1,7 - 2,4	-	69,7 - 76,5	-	-	(Nogueira et al., 2012)
	-	0,3 - 0,3	17,5 - 24,5	4,5 - 6,4	2,0 - 2,6	1,3 - 3,9	-	-	-	(Anjos et al., 2019)
	-	0,4 ± 0,1	21,8 ± 2,2	5,2 ± 0,6	2,9 ± 0,7	-	67,6 ± 2,6	-	-	(Feás et al., 2012)
<b>España</b>	6,9 - 7,8	0,3 - 0,4	12,5 - 22,5	2,7 - 2,9	0,5 - 2,16	-	72,5 - 84,2	-	-	(Nogueira et al., 2012)
	14,9 ± 0,4*	-	12,3 ± 0,2	5,9 ± 0,6	1,6 ± 0,2	-	37,7 ± 1,4	17,1 ± 1,1	14,1 ± 1,3	(Gardana et al., 2018)
<b>Filipinas</b>	15,0 ± 1,0*	0,6 ± 0,0	21,69 ± 1,63	3,9 ± 1,0	3,6 ± 0,3	-	55,7 ± 2,4	30,3 ± 6,8		(Belina-Aldemita et al., 2019)
<b>Turquía</b>	6,2 ± 0,4	-	16,8 ± 1,0	4,9 ± 0,0	-	-	-	-	-	(Keskin & Özkök, 2020)
	-	-	17,5 - 22,2	2,4 - 5,1	2,3 - 2,7	-	-	-	-	(Mayda et al., 2020)
	16,6 ± 0,09*	-	15,7 ± 0,8	2,2 ± 0,0	-	-	-	-	-	(Kanar & Mazi, 2019)
	-	-	12,4 - 20,4	5,6 - 7,2	2,1 - 2,2	-	71,8 - 78,7	-	-	(Isik et al., 2019)
<b>Sur corea</b>	4,5	-	20,5 - 26,8	5,0 - 12,2	5,3 - 5,7	5,1 - 6,2	49,5 - 63,7	-	-	(Ghosh & Jung, 2020)
<b>Bosnia</b>	2,9 - 6,7	-	16,7 - 26,4	2,5 - 6,8	2,0 - 3,1	-	61,5 - 73,8	-	-	(Aličić et al., 2020)
<b>Brasil</b>	-	-	7,9 - 32,2	4,0 - 13,5	1,9 - 3,6	-	-	-	-	(De-Melo et al., 2018)
	19 - 35*	-	4,5 - 9,9	2,0 - 6,0	-	-	18,5 - 45,0	-	-	(Duarte et al., 2018)
	3,4 ± 0,2	-	19,8 ± 0,5	3,4 ± 0,4	2,0 ± 0,1	-	-	5,4 ± 0,3	6,8 ± 0,4	(Sattler et al., 2015)
	-	-	10,2 - 24,0	2,4 - 7,9	3,5 - 5,9	-	10,8 - 28,9	-	-	(Oliveira et al., 2021)
<b>India</b>	12,7 - 19,6*	0,4 - 0,5	19,6 - 25,40	7,1 - 12,4	2,3 - 3,5	3,0 - 4,3	42,3 - 46,2	-	-	(Thakur & Nanda, 2018)
<b>China</b>	1,8 - 7,5	-	14,3 - 29,0	0,7 - 6,6	1,7 - 5,0	17,6 - 31,3	59,4 - 77,8	-	-	(K. Yang et al., 2013)
<b>Italia</b>	15,1 ± 6,8	-	25,3 ± 27,5	1,3 ± 0,5	2,5 ± 0,4	-	56,1 ± 5,30	-	-	(Sagona et al., 2017)

\*Muestras de polen frescas

### 1.3.1 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son componentes esenciales presentes en las moléculas lipídicas, como los triacilgliceroles y los fosfolípidos (Silva-Lannes & Ignácio, 2013), se pueden clasificar en saturados e insaturados según el tipo de enlace presente en su estructura química (Cabezas-Zábala et al., 2016). Dentro de estos últimos destacan los ácidos grasos omega-3, omega-6 y 9 por sus efectos relacionados con la salud. El ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) (C18:3n-3) y el ácido linoleico (LA) (C18:2n-6) son los principales ácidos grasos omega-3 y omega-6 presentes en el polen apícola, los cuales son considerados esenciales para la mayoría de los insectos, como las abejas, pero también para los humanos (Arien et al., 2015). Además, los ácidos grasos aportan  $O_2$  a la sangre para la división celular y la síntesis de hemoglobina. Entre los diversos ácidos grasos, el oleico y el palmítico son los principales componentes de la grasa corporal hasta el 60 % en las abejas obreras, el 40 % en las larvas y el 58 % en las pupas de reina (Al-Kahtani, 2017).

Los ácidos grasos omega-3 pueden reducir la inflamación y tienen efectos hipolipidémicos, antitrombóticos, vasodilatadores y antiarrítmicos. Los ácidos omega-3 más importantes para la salud humana son el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Los omega-3 de cadena larga son componentes importantes del cerebro de los mamíferos. Con una alta proporción de omega-6:3, esta deficiencia se asocia con muchas enfermedades y trastornos neurológicos. En insectos como las abejas, el polen apícola juega un papel clave como fuente principal de ácidos grasos poliinsaturados; las deficiencias pueden provocar deformaciones en adultos, crecimiento lento y sistemas nervioso y cerebral deficientes (Arien et al., 2015; Dong et al., 2015; Jarukas et al., 2020).



**Figura 1-2:** Estructura de los ácidos grasos omega-3.

(a.) ácido linolénico, ácido graso insaturado de 18 carbonos y 3 enlaces dobles (C 18:3 n3), (b.) ácido eicosapentaenoico con cadena de 20 carbonos y 5 enlaces dobles (C 20:5 n3) y (c.) ácido docosahexaenoico con 22 carbonos y 5 enlaces dobles (C 22:6 n3).

Tabla 1-2: Ácidos grasos presentes en muestras de polen apícola colombiano y otros países

g/100 g lípidos	Colombia		Portugal	India	Bosnia	China		Filipinas	Italia		Romania	Sur Corea
	C8:0	-	-	1,9 - 2,8	0,5 ± 0,0	1,6 - 16,7	-	0,7 - 3,2	-	-	2,5 ± 1,6	0,0 - 1,7
C12:0	1,7 ± 0,0	4,6 ± 2,5	0,5 - 1,8	0,1 - 0,4	0,7 - 10,5	-	0,2 - 1,4	-	0,2 - 1,2	-	0,13 - 3,6	-
C14:0	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,4	0,5 - 2,5	1,6 - 5,5	1,8 - 11,2	0,1 - 0,6	0,6 - 0,8	0,8 ± 0,3	0,7 - 3,1	-	0,18 - 3,6	0,6 - 4,0
C15:0	0,1 ± 0,0	-	-	0,7 ± 0,1	0,5 - 3,2	0,1	0,3 - 1,8	0,1 ± 0,0	-	0,4 ± 0,6	-	-
C16:0	25,3 ± 1,4	11,3 ± 2,8	13,5 - 19,6	8,7 - 14,6	15,8 - 40,5	12,8 - 22,8	0,4 - 0,8	28,5 ± 1,8	19,4 - 20,3	10,5 ± 3,0	18,4 - 30,9	24,4 - 26,8
C17:0	0,2 ± 0,0	-	-	2,5 - 3,3	0,7 - 2,7	0,0 - 0,1	9,5 - 36,4	-	0,2 - 0,3	11,1 ± 7,8	-	-
C18:0	2,4 ± 0,2	1,9 ± 0,4	1,1 - 3,0	1,2 - 2,8	6,4 - 15,5	0,6 - 1,3	0,4 - 4,0	3,2 ± 0,7	1,8 - 5,5	4,2 ± 1,5	1,6 - 9,0	2,3 - 3,5
C18:1	-	-	-	7,6 - 10,9	-	2,4 - 14,5	0,7 - 13,4	-	-	25,2 ± 11,7	-	3,0 - 6,2
C18:2n-6 (LA)	10,6 ± 2,4	8,2 ± 1,4	20,5 - 30,1	3,8 - 11,4	3,9 - 11,2	3,0 - 8,3	-	24,5 ± 3,6	19,6 - 37,9	-	7,6 - 33,2	7,5 - 22,2
C18:3n-6 (GLA)	0,3 ± 0,4	-	-	0,6 - 29,6	0,6 ± 0,0	37,3 - 57,1	2,0 - 23,3	-	-	0,6 ± 0,8	-	-
C18:3n-3 (ALA)	44,1 ± 5,4	25,7 ± 7,8	28,9 - 43,3	0,5 - 16,3	7,5 - 36,8	-	-	27,7 ± 3,1	24,3 - 33,1	14,7 ± 8,1	20,3 - 46,9	-
C20:0	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,3	-	0,6 - 1,5	0,8 - 5,9	0,4 - 1,7	12,0 - 55,7	1,1 ± 0,5	1,0 - 1,5	0,9 ± 0,5	0,5 - 2,1	36,5 - 44,1
C22:0	0,9 ± 0,1	-	-	0,2 - 2,0	0,7 - 10,9	0,3 - 4,2	-	2,2 ± 0,8	1,0 - 1,7	0,6 ± 0,4	0,5 - 1,8	0,2 - 1,0
C23:0	0,1 ± 0,1	1,2 ± 0,6	-	0,1 - 8,1	-	0,1 - 0,6	-	-	0,1 - 0,3	2,3 ± 1,6	-	-
C24:0	0,3 ± 0,3	-	-	0,4 - 1,5	1,0 - 3,2	0,9 - 8,6	-	1,0 ± 0,1	0,8 - 1,3	0,4 ± 0,6	-	0,2 - 0,8
SFA	34,9 ± 0,7	36,6 ± 4,9	23,1 - 31,3	13,1 - 31,2	42,9 - 80,0	21,4 - 56,6	-	36,9 ± 1,3	-	36,4 ± 4,3	-	30,0 - 37,1
UFA	-	63,4 ± 4,9	-	68,8 - 86,9	28,1 - 57,1	2,8 - 17,1	-	61,2 ± 1,7	-	-	-	-
PUFA/SFA	1,6 ± 3,8	-	30,1 - 55,1	2,2 - 6,7	0,2 - 1,0	0,7 - 3,2	-	52,2 ± 1,6	-	-	-	-
Referencias	(Gardana et al., 2018)	(Fuenmayor B. et al., 2014)	(Estevinho et al., 2019)	(Thakur & Nanda, 2018)	(Kostić et al., 2017)	(Li et al., 2017)	(Dong et al., 2015)	(Belina-Aldemita et al., 2019)	(Conte et al., 2017)	(Sagona et al., 2017)	(Mărgăoan et al., 2014)	(Ghosh & Jung, 2020)

SFA=ácidos grasos saturados, UFA= ácidos grasos monoinsaturados, PUFA=ácidos grasos poliinsaturado, LA=acido linoleico, GLA= acido gamma linolénico, ALA= acido alfa linolénico.

- **Ácidos grasos en polen apícola**

Los ácidos grasos saturados totales en el polen apícola pueden variar entre 1 y 13 g/100 g de peso seco, se puede destacar una mayor proporción de ácidos grasos insaturados que de saturados, independientemente del origen (Dong et al., 2015; Feás et al., 2012; Jarukas et al., 2020), lo que permite considerarlo como un buena fuente de ácidos grasos poliinsaturados con contenidos que van desde 24,22 a 73,7 g/100 g de ácidos grasos totales.

En general, el polen apícola contiene palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), araquídico (C20:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y eicosenoico (C20:1) ácidos (Tabla 1-2). Las proporciones de cada uno variarán de acuerdo con el origen botánico, como se muestra en la Tabla 1-2. Los contenidos más importantes de ácidos grasos son: el ácido linoleico, mirístico y láurico, los cuales tienen propiedades bactericidas y antifúngicas, importantes para la higiene de la colonia (Kaškonienė et al., 2020).

El contenido de ácidos grasos de las muestras de polen apícola está fuertemente asociado con su contenido fenólico y moderadamente asociado con el contenido de flavonoides y actividad antioxidante. Además, los ácidos grasos se pueden utilizar como herramientas quimiotaconómicas útiles para establecer conexiones potenciales con el origen botánico del polen. Por ejemplo, el ácido behénico y el ácido palmítico son característicos de los granos de polen de *Rubus sp.* (A. Ž. Kostić et al., 2021; Kostryco & Chwil, 2021). Mărgăoan et al., (2021) notaron una fuerte correlación entre los ácidos grasos y el análisis palinológico en muestras de Rumania y Turquía, se identificó al ácido palmítico como el FA predominante para *Brassica sp.* en el polen apícola serbio, que también era un indicador de su actividad antimicrobiana. El polen de *Brassica* también tuvo un contenido significativo en ácidos linolénico y oleico, mientras que el polen de *Salix* tiene un alto contenido de ácidos palmítico, esteárico y linoleico (Mărgăoan et al., 2021).

Según la Academia Nacional de Medicina, se recomienda una ingesta adecuada de omega-3 (1,6 g por día) para adultos humanos (Instituto de Medicina, 2005). Según esto, una porción de 25 g de polen apícola suple a la ingesta adecuada de 41,3 ± 5 % en polen de Colombia, 9 ± 0,9 % en polen de Italia, 17 ± 1,6 % en polen de España (Gardana et al., 2018) 27,8 ± 4,2 % en polen de Portugal (De-Melo et al., 2018), 57,2 ± 41 % en polen de India (Thakur & Nanda, 2018), 11,2 ± 5,8 % en polen de Serbia (Kostić et al., 2017) y 4,8 ± 0,8 % en polen de China (Xu et al., 2011). Por lo tanto, el polen de Colombia, Portugal e

India puede considerarse una buena fuente de omega-3, ya que aporta más del 20% de la ingesta adecuada.

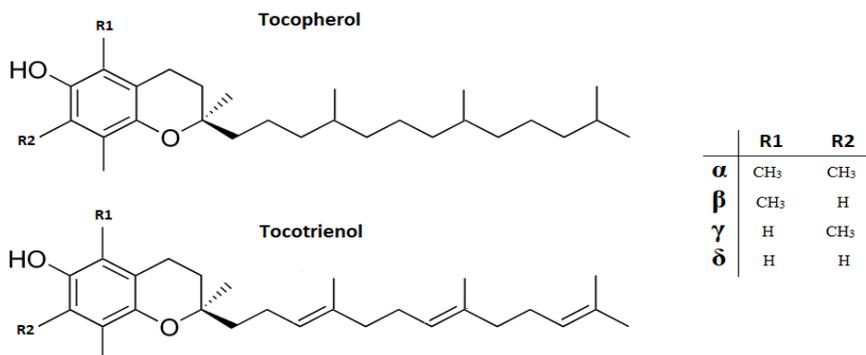
- **Capacidad antioxidante**

El ácido linolénico y linoleico en muestras de polen apícola es esencial para sintetizar otros ácidos poliinsaturados (Chen et al., 2012; Marangoni et al., 2020). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) pueden regular la vía de señalización antioxidante y modular los procesos inflamatorios, el estrés oxidativo y, a su vez, el riesgo de aterosclerosis y trastornos degenerativos, como las enfermedades cardiovasculares (Djuricic & Calder, 2021; Giordano & Visioli, 2014; Leger et al., 2019).

Los efectos antioxidantes de los omega-3 se atribuyen a su capacidad para eliminar especies reactivas de oxígeno, inhibir la propagación de radicales libres y suprimir la peroxidación lipídica (Preston-Mason, 2019; Richard et al., 2008). En consecuencia, el omega-3 puede ser utilizado como una estrategia nutricional que permitiría evitar alteraciones funcionales por la mejora del sistema de defensa antioxidante de las células (Chen et al., 2012; Guermouche et al., 2014; Yessoufou et al., 2006). Además, la administración de EPA aumenta varias enzimas antioxidantes endógenas, a saber, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, al mismo tiempo que disminuye los niveles de malondialdehído (Saenz de Viteri et al., 2020).

### **1.3.2 Vitamina E**

La vitamina E sirve como factor de fertilidad para las abejas, incluida la espermatogénesis y la maduración de los huevos (Kraus et al., 2019). En los seres humanos, la vitamina E es esencial para el crecimiento y la supervivencia y es necesaria para la salud. Sin embargo, el cuerpo humano no puede sintetizarlo y lo ingiere con los lípidos presentes en los alimentos. Solo las plantas y los organismos fotosintéticos son capaces de sintetizarlo. La vitamina E tiene un grupo de isómeros ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) con cuatro especies de tocoferoles de cadena saturada y cuatro tocotrienoles con dobles enlaces en los carbonos (Etsuo et al., 2019). De los ocho isómeros presentes de forma natural en los alimentos, solo el  $\alpha$ -tocoferol permanece en el plasma, lo que representa el 90 % de todos los tocoferoles presentes en el organismo (CODEX, 2016; Lorenzo et al., 2008).



**Figura 1-3:** Estructura química de los diferentes isómeros de la vitamina E. La presencia de los grupos -CH<sub>3</sub>, o -H en el anillo cromano definen que estas sustancias sean  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , o  $\delta$

Generalmente en el polen apícola el isómero más abundante es el  $\alpha$ -tocoferol, representando más del 50% de los isómeros presentes, seguido por  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$ -tocoferol (Conte et al., 2017; Sattler et al., 2015).

#### ▪ Vitamina E en polen apícola

La vitamina E es esencial para la salud humana, sin embargo, no puede ser sintetizada y debe ingerirse unida a los lípidos presentes en alimentos (Etsuo et al., 2019) como el polen apícola. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presentan los contenidos de Vitamina E calculado como  $\alpha$ -tocoferol de pólenes de diferentes países.

**Tabla 1-3:** Rangos de concentración de la Vitamina E en el polen apícola de diferentes orígenes

Polen apícola	$\mu\text{g/g DM}$	Ref.
Colombia	4,74-95,90	(Salazar González et al., 2020)
	39,24 – 116,42	(Pulido et al., 2012)
Brasil	4,7 - 114	Sattler et al., 2015
	27,2-53,7	(De-Melo et al., 2016)
	16,27-43,00	(Pereira De Melo & De Almeida-Muradian, 2010)
Turquía	114,86-162,35	(Kanar & Mazı, 2019)
	163,52-340,72	(Alayunt et al., 2013)
Italia	4,73-7,95	(Conte et al., 2017)
Portugal	7,1-23,7	(Barbosa et al., 2006)

<b>Tailandia</b>	62,1	(Chantarudee et al., 2012)
------------------	------	----------------------------

Generalmente, en el polen apícola, el isómero más abundante es el  $\alpha$ -tocoferol, que representa más del 50 % de los isómeros, seguido del  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$ -tocoferol (Conte et al., 2017; Sattler et al., 2015). La Tabla 1-3 presenta los contenidos de vitamina E calculados como  $\alpha$ -tocoferol del polen apícola de diferentes países. Según la FDA, la cantidad diaria recomendada de vitamina E es de 15 miligramos o 22,4 unidades internacionales (UI) para personas mayores de 14 años (Etiquetado de alimentos: revisión de las etiquetas de información nutricional y de suplementos, 2016). En promedio, 25 g de polen apícola colombiano aportan entre el 10 y el 19 % del requerimiento diario en una dieta de 2000 kilocalorías. De ahí que se considere una buena fuente de vitamina E. En otros países, como Turquía y Tailandia, también se pueden destacar los contenidos de vitamina E en el polen, ya que son equiparables al porcentaje de ingesta diaria que aportan otras fuentes como el aceite de soja, pistachos y tomate ( $7,13 \pm 0,67$  %,  $4,33 \pm 0,20$  %,  $5,87 \pm 0,13$  %, respectivamente) (Grilo et al., 2014; Stuetz et al., 2017).

#### ▪ **Capacidad antioxidante**

Los vitámeros de la vitamina E actúan de forma coordinada con otras moléculas y enzimas para defender las células del ataque de los radicales libres y la peroxidación lipídica (EFSA & NDA, 2010; Lagouri, 2015; Sayago et al., 2007).

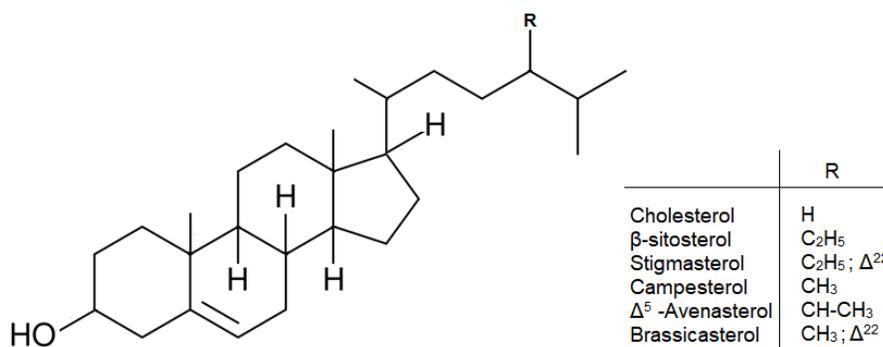
Los efectos antioxidantes de los isómeros de la vitamina E dependen del número de grupos metilo en el anillo cromano. Por ejemplo, el  $\alpha$ -tocoferol tiene tres grupos metilo, mientras que el  $\delta$ -tocoferol tiene un grupo metilo en el anillo cromano. En general, se reconoce que la fuerza de la actividad antioxidante es del orden de  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$  entre los isómeros de la vitamina E, y que el tocoferol es más fuerte que el tocotrienol (Miyazawa et al., 2019). En consecuencia, el  $\alpha$ -tocoferol tiene la mayor bioactividad *in vivo* y es el único esencial para los humanos (Raederstorff et al., 2015). Además, la vitamina E protege a las células de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Lorenzo et al., 2008; Major et al., 2012; Rezaieyazdi et al., 2018). En consecuencia, la deficiencia induce la peroxidación lipídica del hígado y provoca trastornos neurológicos y cardiovasculares que pueden revertirse con suplementos dietéticos (Zal et al., 2012). La acción de la vitamina E depende en gran medida de otras vitaminas como la C, B3 y minerales como el selenio. Todos los compuestos presentes en el polen apícola, como los ácidos grasos, la vitamina C y el  $\beta$ -

caroteno, interactuarán para mejorar la eficacia de los sistemas de defensa antioxidantes en las células (Passerieux et al., 2015; Rizvi et al., 2014; Zal et al., 2012).

### 1.3.3 Esteroles

Los esteroides son una clase de lípidos importantes entre los esteroides. Estructuralmente contienen un núcleo esteroide de cuatro anillos (tres de 6 carbonos y uno de 5 carbonos), fusionados con una cadena lateral de hidrocarburos y un grupo alcohol en el primer anillo 6-C (Monreal & Schnitzer, 2013). Dependiendo de su origen los esteroides se clasifican en: zoosterol (animal), micosteroides o ergosterol (fúngico) y fitoesteroides (vegetal) (Moldoveanu, 2019).

En las plantas los esteroides se presentan como mezclas de  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Figura 1-4-4), los cuales constituyen aproximadamente el 98% de los fitoesteroides consumidos (Nzekoue et al., 2020).



**Figura 1-4:** Estructura de los esteroides

Las abejas, como todos los insectos, no pueden biosintetizar esteroides y dependen completamente de los recursos dietéticos para obtener esteroides. Los esteroides son precursores de las hormonas de la muda de los insectos, actúan como moléculas de señalización para varios procesos de desarrollo y son fundamentales para mantener la integridad estructural y funcional de las membranas celulares de los insectos (Chakrabarti et al., 2020). El contenido de esteroides en el polen apícola es muy variable, y esa variabilidad podría impulsar (al menos en parte) la selección floral de las abejas y sus interacciones con las especies de plantas circundantes. Vanderplanck et al., (2020). observaron que las especies de abejas especialistas se alimentan de plantas que

proporcionan polen con algunos esteroides particulares, como el colesterol y el desmosterol, que tienen una columna vertebral de 27 carbonos y son esteroides vegetales poco comunes.

#### ▪ Esteroides en polen apícola

El contenido de fitoesteroides libres muestra un perfil variable entre las diferentes muestras de polen. Sin embargo, se puede observar que el estigmasterol es generalmente el menos abundante, mientras que el  $\beta$ -sitosterol y el campesterol están presentes en mayores proporciones. Además de estos esteroides, también se ha cuantificado colesterol, desmosterol, colesteno,  $\Delta^7$ -stigmasterol,  $\Delta^7$ -avenasterol,  $\Delta^5$ -avenasterol, Lanosterol, Isofucosterol  $\beta$ -amirina, 24-metilcolesterol, 25-deshidrositosterol, en muestras de diferentes países (Ferreira-Caliman et al., 2012; Vanderplanck et al., 2014).

**Tabla 1-4:** Contenido de fitoesteroides en pólenes de diferentes países

g/ 100g esterol	$\beta$ -sterol	Es-sterol	C-sterol	24 MC	Total, mg/g base seca	Fuente
<b>China</b>	23,1 $\pm$ 1,4	37,5 $\pm$ 1,2	13,1 $\pm$ 0,9	-	0,5	(Xu et al., 2011)
<b>Bélgica</b>	3,0 - 51,2	0,4 - 1,1	6,3 - 84,1		2,5 - 9,6 *	(Vanderplanck et al., 2014)
<b>Brasil</b>	52,2 - 53,1	1,4 - 2,0	11,0 - 15,0	-	-	(Ferreira-Caliman et al., 2012)
<b>USA</b>	31,9 - 33,7	1,8	4,7 - 4,7	7,0 - 8,1	-	(Feldlaufer & Harrison, 2020)
<b>Italia</b>	27,7 - 51,5	0,2 - 0,3	2,2 - 21,7	7,5 - 12,7	-	(Conte et al., 2017)
<b>Filipinas</b>	11,8 - 27,3	3,8 - 7,7	7,0 - 27,1	6,4 - 38,8	3,2 - 6,7	(Belina-Aldemita et al., 2020)
<b>Portugal</b>	4,9 - 35,7	4,1 - 4,9	12,0 - 14,0	-	0,4-2,3	(Barbosa et al., 2006)
$\beta$ -sterol= $\beta$ -sitosterol, Es-sterol= estigmasterol, C-sterol= campesterol, 24MC= 24-metilcolesterol						
*muestra liofilizada						
**En condiciones analíticas, el campesterol y el 24-metilcolesterol son casi imposibles de separar; los resultados se agrupan.						

Muchos esteroides se producen en las células vegetales, lo cual es característico de cada especie y puede utilizarse como huella química (Ostlund, 2002). Además de los fitoesteroides comunes, se pueden encontrar cantidades considerables de colesterol 24-metileno (24MC) en el polen apícola, que se considera el esteroide más crítico para el crecimiento y la longevidad de las abejas (Chakrabarti et al., 2020). El contenido de los diferentes fitoesteroides libres muestra un perfil variable entre las distintas muestras de polen apícola. Además de estos esteroides, también se han cuantificado colesterol, desmosterol, colesteno,  $\Delta^7$ -stigmasterol,  $\Delta^7$ -avenasterol,  $\Delta^5$ -avenasterol, lanosterol,

---

isofucoesterol  $\beta$ -amirina, 24-metileno colesterol y 25-deshidrositostanol en muestras de diferentes países (Ferreira-Caliman et al., 2012; Vanderplanck et al., 2014) El contenido total de fitoesteroles del polen apícola en la Tabla 1-4 ( $5,89 \pm 5,43$  mg/g de polen) es comparable a los aceites vegetales como el aceite de colza y de maíz ( $8,94 \pm 2,38$ ,  $9,91 \pm 2,41$  mg/g de aceite) (R. Yang et al. , 2019), las cuales han sido reportadas como una excelente fuente natural (Belina-Aldemita et al., 2020).

- **Actividad antioxidante**

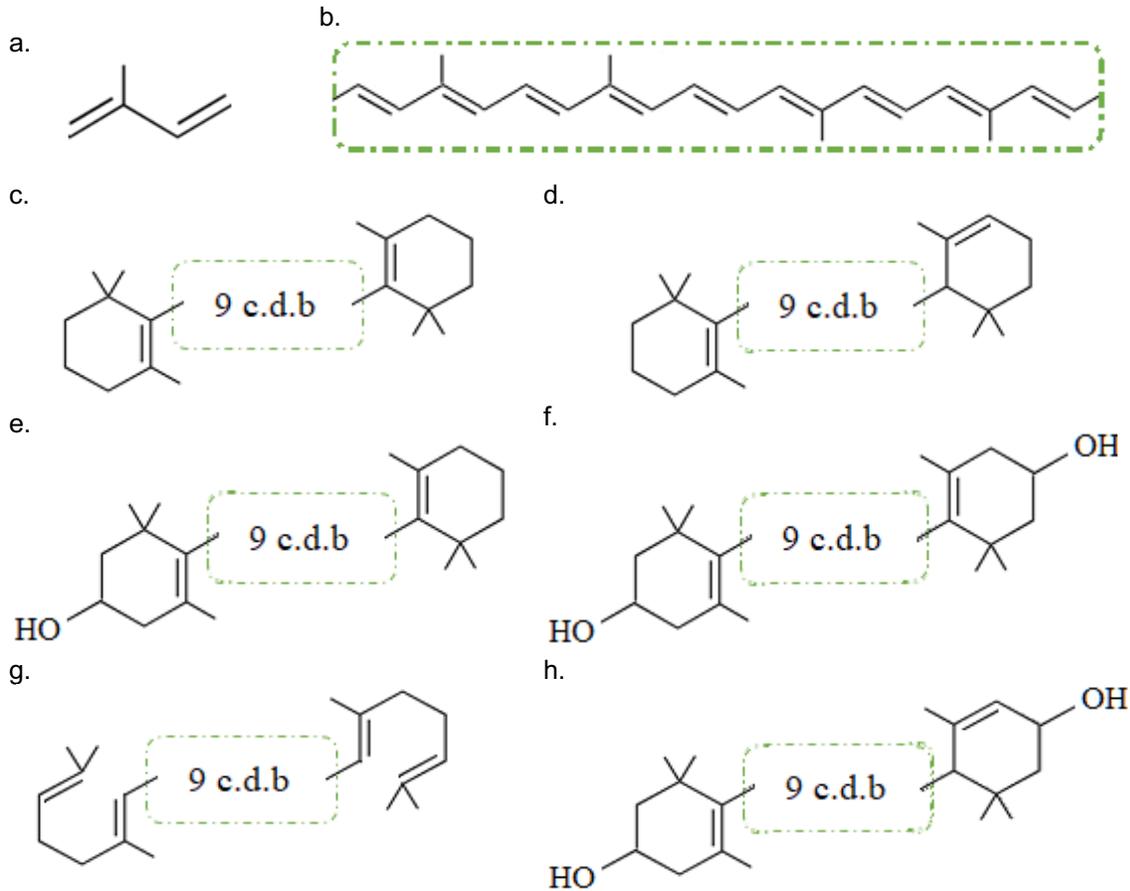
Los fitoesteroles tienen efectos beneficiosos para la salud como anticancerígenos, inmunomoduladores, antiinflamatorios, antihipercolesterolémicos, antidiabéticos y antioxidantes (Choi et al., 2003; Conforti et al., 2009; Luo, Su, & Zhang, 2015). En el polen apícola, el  $\beta$ -sitosterol, el campesterol y el estigmasterol ejercen una función antioxidante como secuestradores modestos de radicales libres, reducen la peroxidación lipídica inducida por los radicales peroxilo y han demostrado la capacidad de suprimir la oxidación y el consumo de  $\alpha$ -tocoferol en las membranas liposomales y físicamente como estabilizadores de membrana (Yoshida & Niki, 2003).

Estructuralmente, el colesterol se parece al  $\beta$ -sitosterol, que se ha demostrado que inhibe la absorción intestinal de colesterol y eleva los antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, lo que lo convierte en un eficaz agente hipolipidémico, neuroprotector y quimiopreventivo antidiabético (Babu & Jayaraman, 2020), el  $\beta$ -sistosterol es uno de los esterolees más abundantes en el polen apícola, tiene un efecto que mejora la actividad de las enzimas antioxidantes que previenen el estrés oxidativo inducido por dietas ricas en grasas (Saravanan et al., 2020) y tiene efectos preventivos sobre el desarrollo de enfermedades debido a la capacidad de revertir el deterioro en glutatión/glutatión oxidado en ratas, lo que planteó que el fitosterol podría ser un posible eliminador de ROS (Conforti et al., 2009; Babu & Jayaraman, 2020).

El tratamiento con  $\beta$ -sitosterol aumentó significativamente el antioxidante pancreático, lo que mejora las complicaciones diabéticas y previene el desarrollo de diabetes (Babu & Jayaraman, 2020). Los efectos antioxidantes de los fitoesteroles pueden deberse en parte a sus propiedades antiinflamatorias (Valerio & Awad, 2011).

### 1.3.4 Carotenoides

Los carotenoides son tetra terpenos, moléculas formadas por ocho unidades de isopreno (Figura 1-55 a.), que se clasifican en carotenos y xantofilas dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno en su molécula (Meléndez-Martínez et al., 2019). Los carotenos, solo contienen carbono e hidrógeno mientras que las xantofilas, contienen oxígeno en forma de grupos sustituyentes (Ötles, 2011).



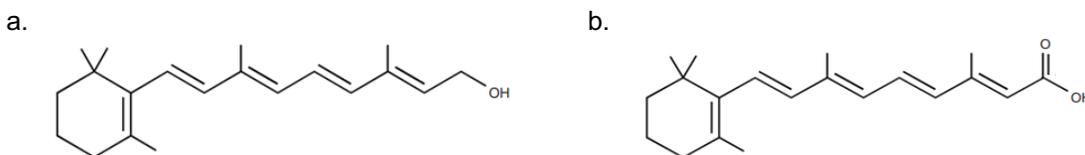
**Figura 1-5:** Estructura de diferentes carotenoides.

a. unidad de isopreno b. esqueleto hidrocarbonado con 9 dobles enlaces conjugados y los carotenoides más comunes encontrados en la sangre humana c.  $\beta$ -caroteno, d.  $\alpha$ -caroteno, e.  $\beta$ -criptoxantina, f. zeaxantina, g. licopeno. y h. luteína.

El esqueleto hidrocarbonado cuenta con dobles enlaces conjugados (c.d.b.) que pueden variar entre 3-13, el cual constituye el cromóforo que absorbe la luz y les da a los carotenoides su color atractivo (amarillos a rojos). Son necesarios al menos 7 c.d.b para que los carotenoides presenten coloración (Kaczor et al., 2016).

### ▪ Provitamina A

La provitamina A, se refiere a los carotenoides que contienen uno o dos anillos de  $\beta$ -ionona al final de su estructura (Nagarajan et al., 2017). El  $\beta$ -caroteno es el único carotenoide con un 100% de actividad provitamina A, otros con menor capacidad son:  $\alpha$ -caroteno (50-54%),  $\beta$ -Zeacaroteno (20-40%),  $\gamma$ -caroteno (50-52%),  $\beta$ -criptoxantina (50-60%) y  $\beta$ apo-8'-carotenal (72%) (Carranco et al., 2011), son los principales precursores en la biosíntesis de la vitamina A (retinol) y su derivado ácido retinoico (Zhu, 2019) (Figura 1-6; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



**Figura 1-6:** estructura química de a. Retinol y b. ácido retinoico

### ▪ Carotenoides en el polen apícola

En el polen apícola se puede encontrar una composición variada de carotenoides como:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, astaxantina, isocriptoxantina, isozeaxantina, lactucaxantina, neurosporeno, licopeno, violaxantina,  $\gamma$ -caroteno,  $\xi$ -caroteno,  $\epsilon$ -caroteno (Abd-Alla & Salem, 2020), neoxantina, anteraxantina (Conte et al., 2017). Que varían de concentración acorde con el origen, en muestras colombianas, la zeaxantina se ha reportado como el carotenoide primario (Gardana et al., 2018).

Actualmente, no existe una cantidad diaria recomendada (RDA) de carotenoides. Sin embargo, la Sociedad de Nutrición de China dio recomendaciones para una ingesta diaria de 2 mg de zeaxantina (Eggersdorfer & Wyss, 2018). Además, la FDA sugirió un valor diario de vitamina A de 900  $\mu$ g de equivalentes de actividad de retinol (RAE) para adultos y 1  $\mu$ g de RAE = 12  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno para niños mayores de 4 años. De acuerdo con esta información y contrastándola con los contenidos reportados en la Tabla 5, una porción diaria de 25 g de polen apícola colombiano y egipcio podría suplir las necesidades de zeaxantina (Abd-Alla & Salem, 2020; Gardana et al., 2018). En cambio, el polen apícola de otros países solo aporta entre el 7,84 y el 57,37% de la ingesta diaria recomendada. En cuanto a la provitamina A, se necesitan los contenidos de todos los carotenoides de provitamina para estimar la contribución real. Si solo se considera el contenido de  $\beta$ -

caroteno, la contribución estaría subestimada. En el caso de Colombia, este valor sería solo el 0,5% de la ingesta diaria.

**Tabla 1-5:** Contenido de carotenoides totales en pólenes de diferentes países

Polen apícola	$\mu\text{g } \beta\text{-c/g DM}$	$\mu\text{g Zea/g DM}$	Fuente
Colombia	-	207,0 – 221,0	(Gardana et al., 2018)
	0,7 - 3,6	12,9 - 256,5	(Salazar González et al., 2020)
Italia	1,6 - 9,6	3,2 - 11,5	(Conte et al., 2017)
	-	21,3 - 24,7	(Gardana et al., 2018)
España	-	51,3 - 56,9	(Gardana et al., 2018)
Egipto	60,9 - 152,9	48,8 - 312,4	(Abd Alla & Salem, 2020)
Turquía	8,4 $\pm$ 0,2	7,0 $\pm$ 0,1	(Şahin & Karkar, 2019)
Romania	0,2 - 17,2	-	(Mărgăoan et al., 2014)
Brasil	17,7 $\pm$ 1,3	-	(Sattler et al., 2015)
	3,1 - 77,9	-	(Pereira De Melo & De Almeida-Muradian, 2010)
Tailandia	15,30	-	(Chantarudee et al., 2012)
Chile	2,8 - 50,2	-	(Velásquez et al., 2017)
Portugal	6,4 - 84,8	-	(Estevinho et al., 2018)
Eslovaquia	261,3 $\pm$ 1,4*	-	(Fatrcová-Šramková et al., 2016)

$\beta\text{-c}$ =  $\beta$ -caroteno, DM=Materia seca, Zea= zeaxantina

\*carotenoides totales expresados como  $\beta$ -caroteno

#### ▪ Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los carotenoides se debe a su capacidad para capturar radicales libres, extinguir especies activas de oxígeno, neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) y reducir el estrés oxidativo en el cuerpo (Bouayed & Boh, 2012; Maestro-Durán & Borja-Padilla, 1993; Nagarajan et al., 2017).

La astaxantina es el principal eliminador de radicales libres que se encuentra en el polen apícola (Abd-Alla & Salem, 2020). Su beneficio se debe a su distribución dentro de la membrana celular, lo que le otorga una actividad antioxidante aproximadamente diez veces mayor que otros carotenoides presentes como la zeaxantina, la luteína, la cantaxantina y el  $\beta$ -caroteno (Kaczor et al., 2016; Li et al., 2015).

Se ha demostrado que la zeaxantina reduce la oxidación de proteínas, la peroxidación de lípidos y el daño del ADN (Gao et al., 2011), lo que, a su vez, ha permitido mostrar efectos beneficiosos para la salud, como la disminución del riesgo de cataratas (Chous et al., 2016) y degeneración macular relacionada con la edad, la luz y la radiación (Sahin et al., 2019), así como la prevención, tratamiento y mejora de la diabetes y sus complicaciones (Roohbakhsh et al., 2017).

El  $\beta$ -caroteno es un inhibidor eficaz del oxígeno singlete y de los radicales peroxilo, protege las membranas celulares y las lipoproteínas del daño oxidativo y tiene un efecto sinérgico con otros antioxidantes como la vitamina C y E, lo que le ha permitido mostrar efectos beneficiosos como la disminución del riesgo de aterosclerosis e incidencia de enfermedad cardiovascular (ECV) (Buijsse et al., 2008; Nishino et al., 2017).

## **2. Caracterización fisicoquímica del polen apícola de Cundinamarca**

En este capítulo se realizará una descripción de las zonas de muestreo, así como las etapas de acondicionamiento de las muestras de polen apícola necesarias para asegurar su inocuidad y calidad, dichas etapas fueron: ciclonado, secado, tamizado y envasado al vacío. Adicionalmente, se describen las metodologías del análisis palinológico y las características fisicoquímicas realizadas a las muestras de polen apícola. Las propiedades medidas fueron: el contenido de humedad, la actividad de agua, el contenido de proteínas, grasa, fibra dietaria, cenizas, contenido de carotenoides totales, fenoles totales, perfil de ácidos grasos y vitamina E. La actividad biológica se midió en los extractos etanólicos mediante la actividad antioxidante (TEAC y FRAP).

### **2.1 Materiales y métodos**

#### **2.1.1 Muestras de polen apícola**

Se evaluaron muestras de polen apícola proveniente de tres zonas de Cundinamarca: Nororiente, Occidente y Suroriente (Tabla 2- 1, Figura 2- 1) en dos épocas del año: durante la temporada seca comprendida entre los meses de diciembre y marzo del 2020 y durante la temporada de lluvia comprendida entre los meses de agosto y noviembre del 2020. De esta manera se obtuvo un total de 6 muestras de polen apícola, las cuales se tomaron en los apiarios cuyas condiciones ambientales se muestran en la Figura 2-2.

Tabla 2- 1: Muestras de polen apícola

Muestras	Nororiente	Occidente	Suroriente
<b>Coordenadas</b>	Latitud 4°40'39" norte Longitud 73°58'19" oeste	Latitud 4°39'44" norte Longitud 74°13'28" oeste	Latitud 4°27'2" norte Longitud 74°7'43" oeste
<b>Localización del Apiaro</b>	Municipio: Guatavita Vereda: El salitre	Municipio: Mosquera, Vereda: San José	Ciudad: Bogotá Localidad: Usme vereda: Olarte
<b>Temperatura</b>	Mínima: 11 °C Máxima: 18 °C Promedio: 14 °C	Mínima: 4,6°C Máxima: 19,7°C Promedio: 13,2°C	Mínima: 6°C Máxima: 15°C Promedio: 12°C
<b>Altura</b>	Mínima: 2680 m.s.n.m Máxima: 3.400 m.s.n.m.	Promedio: 2516 m.s.n.m.	Mínima: 2.650 m.s.n.m. Máxima: 3.750 m.s.n.m.
<b>Pluviosidad</b>	731.7 mm al año	631 mm por año	1216 mm por año
<b>Referencias</b>	(Alcaldía Municipal de Nororiente, 2017; Barrios & Andrés, 2015).	(CAR, 2019; Alcaldía Municipal de Occidente, 2021).	(Alcaldía Mayor de Bogotá D.C., 2017).

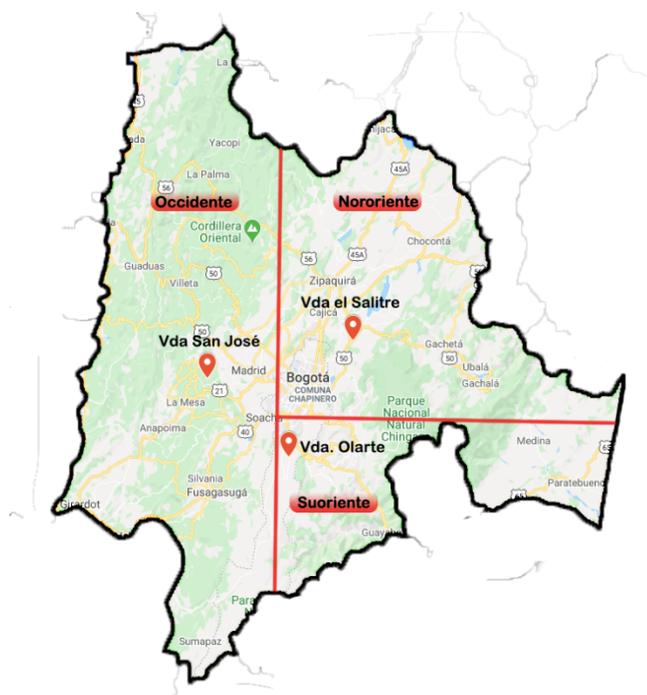


Figura 2- 1: Distribución geográfica de los apiarios muestreados

- **Acondicionamiento y almacenamiento de las muestras de polen apícola**

Las muestras fueron limpiadas, eliminando impurezas como: restos vegetales e insectos, esta operación se hizo mediante el uso de un ciclón. Las impurezas fueron removidas con el uso de una corriente de aire aspirante, con velocidades que pueden variar entre 15 a 27 m/s, este proceso se realizó en pequeños lotes y se repitió tres veces en cada uno para asegurar las mejores condiciones de limpieza del producto.

Posteriormente las muestras fueron procesadas de acuerdo con la metodología propuesta por Salazar-González et al., (2018) de secado y separación para el polen apícola. Las muestras se secaron a 60°C por 4 horas. Posteriormente, el polen se separó de acuerdo con su granulometría con tamices estándar Tyler mediante agitación mecánica en una zaranda, para esto se usaron los tamices N° 8, N° 10, N° 12, N° 16, N° 18 y N° 20, con tamaños de apertura de 2,38; 2,00; 1,68; 1,19; 1,00; 0,84 mm, respectivamente (Figura 2-2).



**Figura 2- 2:** Tamices usados para la separación del polen apícola

Finalmente, el polen se almacenó en bolsas con empaque al vacío que ofrecen una barrera contra gases, humedad e insectos a temperatura ambiente ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ).

---

## 2.1.2 Actividad de agua

La actividad de agua fue medida instrumentalmente, utilizando un medidor de la actividad de agua (Hygrolab C1-Rotronic) y expresada de manera adimensional. El método fue basado el A.O.A.C. 32.004-32.009. Las muestras (aproximadamente 1 g de polen) se colocaron en cápsulas de medición que posteriormente se introdujeron dentro de la sonda de medición de actividad de agua.

## 2.1.3 Análisis palinológico

Para conocer el origen botánico de las muestras de polen apícola se llevó a cabo su estudio melisopalinológico. Las muestras de polen apícola fueron procesadas mediante la técnica de acetólisis de Erdtman (1969) con adaptaciones según Fonnegra (1989). El polen se homogenizó y maceró suavemente, se pesaron 100 mg en un tubo falcon, se le adiciono ácido acético glacial hasta completar 5 mL, se agitó y se dejó reposar durante 36 horas, pasado este tiempo, la muestra se agitó nuevamente con vórtex y centrifugó. Se tomó una submuestra y se depositó en un tubo Eppendorf de 2,5 mL, se le adicionó 1 mL al vial, se llevó a baño María (90°C) durante 15 minutos. Se centrifugó inmediatamente, con la muestra aún caliente, se descartó el sobrenadante y se adicionó agua destilada hasta llegar a la marca de 2,5 mL. Se agitó con vórtex y se centrifugó a 1000 rpm durante 3 minutos. Se adicionaron 10-15 gotas de glicerina. Los viales se mantuvieron destapados durante 24 horas (esto con el fin de permitir la evaporación del agua restante). Se montaron láminas permanentes: alícuota de 10 µl con gelatina glicerizada selladas con parafina. La muestra correctamente sellada fue etiquetada y observada al microscopio. Cada muestra montada en lámina se observó en 400 aumentos. Los palinomorfos observados se fotografiaron. En cada lámina se realizaron conteos de 30 campos, hasta que no se encontraron nuevos tipos por lámina o hasta alcanzar una abundancia total de al menos 300 granos de polen. Esta técnica la realizó la empresa Blue Note Data Analysis SAS, especialista en análisis palinológico de muestras de productos apícolas.

## 2.1.1 Carotenoides totales

El contenido de carotenoides totales (CT) del polen seco y pulverizado, se determinó siguiendo la metodología descrita por Salazar et al., (2013). Se pesaron 50 mg de polen

en un tubo falcon de 50 mL. Se agregaron 3 mL de acetona (99,5%, Panreac, Alemania), se homogenizó mediante agitación en un vórtex durante 1 min y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min, se recuperó el sobrenadante filtrándolo a través de un filtro de papel Whatman N° 4 y se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 25 mL. Se repitió este procedimiento hasta la desaparición de color en el solvente. En seguida, se llevó a volumen el matraz con acetona y se midió la absorbancia a 450 nm, usando acetona como blanco en un espectrofotómetro JASCO Modelo V-730 UV / VIS, con el software Spectra Manager (Jasco, Italia) en una celda de cuarzo de 1 cm. Se preparó una curva de calibración usando  $\beta$ -caroteno estándar  $\geq 97\%$  (UV) (Sigma Aldrich, USA) en un rango de concentración desde 0,50 hasta 4,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , obteniéndose la siguiente ecuación de la curva de calibración:

$$y = 0,1887x + 0,0105, R^2 = 0,9906 \quad \text{Ecuación 2-1}$$

Donde:

y: absorbancia (adimensional, unidades de absorbancia)

x: es concentración ( $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno mL}^{-1}$ ).

Los CT se calcularon en miligramos equivalentes de  $\beta$ -caroteno por kilogramo de polen seco, tal como se muestra a continuación:

$$\text{CT } (\mu\text{g } \beta\text{caroteno /g polen}) = \frac{\mu\text{g } \beta\text{-caroteno}}{\text{mL}} * \frac{\text{volumen extracto (mL)}}{\text{masa muestra (g)}} * \text{FD} \quad \text{Ecuación 2-2}$$

Donde,

Volumen extracto: 25 mL

Masa muestra: masa en gramos

FD: Factor de dilución (si lo hay)

### 2.1.2 Capacidad antioxidante y fenoles totales

Se utilizaron metodologías espectrofotométricas para la determinación de la actividad antioxidante (FRAP y TEAC) y fenoles totales de los extractos etanólicos de las muestras, de acuerdo con las siguientes metodologías:

### ▪ Preparación de extractos etanólicos

Para la determinación de la actividad antioxidante por FRAP y TEAC se prepararon extractos etanólicos de las muestras de polen apícola. El extracto etanólico se realizó mezclando 1g de polen previamente molido en un matraz con 100 mL de etanol al 96 % en un vaso de precipitado, se dejó en oscuridad durante 24 horas, se filtró y almacenó en un frasco ámbar a -20°C hasta los próximos análisis.

### ▪ Actividad antioxidante por FRAP

Para la determinación de la actividad antioxidante por FRAP se mezclaron 450 µL de la solución FRAP (una mezcla de buffer acetato y ácido acético pH 3.6, TPTZ y FeCl<sub>3</sub> 20mM), 735 µL de agua destilada y 20 µL de extracto, en ese orden respectivamente. Esta solución se agitó y se mantuvo en oscuridad durante 30 min. La absorbancia fue medida a 593 nm con un espectrofotómetro JASCO Modelo V-730 UV / VIS, con el software Spectra Manager (Jasco, Italia).

La curva de calibración se elabora preparando soluciones de concentración de 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 mM de Trolox en etanol al 96% y relacionándolas con las absorbancias medidas siguiendo el procedimiento explicado inicialmente. Con la absorbancia medida de cada uno de los extractos evaluados se determina la concentración de Trolox (mM) interpolándolas en la ecuación de la curva de calibración:

$$y = 0,7296x + 0,0042, \quad R^2 = 0,9985 \quad \text{Ecuación 2-3}$$

Donde:

y: absorbancia (adimensional, unidades de absorbancia)

x: es concentración (Trolox (mM)).

Para expresar el resultado de las concentraciones como mmol de Trolox/g muestra se usa la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{milimoles Trolox}}{\text{gramo de polen}} = mM * \frac{1 L}{1000 mL} * \frac{\text{volumen del extracto (mL)}}{\text{peso polen (g)}} * FD \quad \text{Ecuación 2- 4}$$

### ▪ Actividad antioxidante por TEAC

Para la determinación de la actividad antioxidante por TEAC se calculó la diferencia de la absorbancia inicial de la solución de trabajo del radical ABTS<sup>+</sup> y después de 6 minutos de reacción con la muestra. Después de leer la absorbancia de 1mL de la solución de trabajo del radical ABTS<sup>+</sup> (mezcla de la sal de diamonio ABTS con 6.63mg de solución de persulfato de potasio, diluida en etanol al 96% hasta obtener una absorbancia de 0,7 nm aproximadamente) se adicionaron 10 µL de la muestra a evaluar, se agito y se mantuvo protegido de la luz por 6 minutos, después de los cuales se mide nuevamente la absorbancia. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro JASCO Modelo V-730 UV / VIS, con el software Spectra Manager (Jasco, Italia).

La curva de calibración se elabora midiendo la diferencia de absorbancia de la misma manera que se explicó con anterioridad a soluciones con concentraciones conocidas de 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mM de Trolox y graficando en el eje Y la diferencia de las absorbancias y en el eje X las concentraciones.

$$y = 0,3667x - 0,0099, \quad R^2 = 0,9971 \quad \text{Ecuación 2-5}$$

Donde:

y:

x:

La diferencia de las absorbancias se interpola en la ecuación obtenida de la curva de calibración anterior. El valor de la concentración de la actividad antioxidante se expresó como mM de Trolox (*milimoles Troloxgramo depolen*) =  $mM * \frac{1L}{1000 mL} * \frac{\text{volumen del extracto (mL)}}{\text{peso polen (g)}} * FD$ .

### ▪ Contenido de fenoles totales

Para la determinación de Fenoles Totales se mezclaron 1.5 mL de muestra, 500 µL solución Folin-Ciocalteu y 2 mL de carbonato de sodio (10 %) en un balón aforado de 50mL, se agito, se llevó a volumen con agua desionizada y se almaceno en la oscuridad por 2 horas. A la mezcla se le midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro JASCO Modelo V-730 UV / VIS, con el software Spectra Manager (Jasco, Italia).

La curva de calibración se elaboró preparando soluciones de ácido gálico con concentraciones conocidas de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL. En el eje Y de la curva de calibración se grafica la absorbancia y en el eje X la concentración de ácido gálico (mg/mL).

$$y = 0,7083x + 0,085, \quad R^2 = 0,9953 \quad \text{Ecuación 2 - 6}$$

Donde:

y: absorbancia (adimensional, unidades de absorbancia)

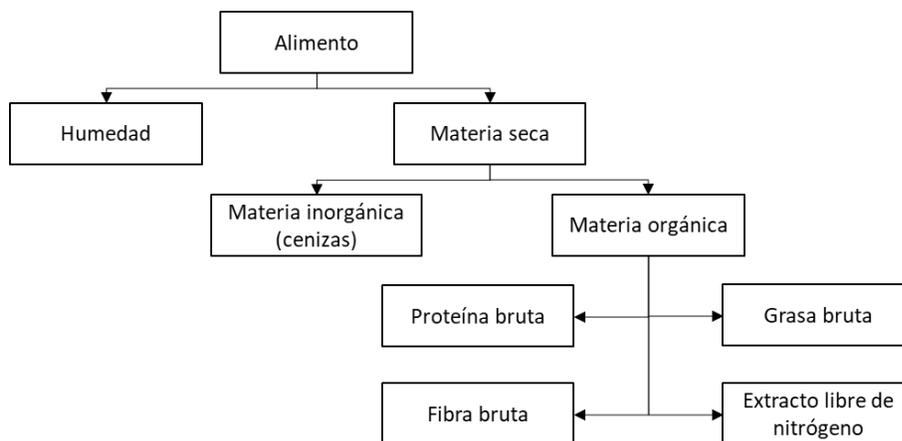
x: concentración (mg Ác. Gálico/mL).

Las absorbancias obtenidas de las muestras se interpolan en la ecuación de la recta de calibración del reactivo Folin-Ciocalteu para obtener el valor de la concentración de fenoles totales como mg de ácido gálico/mL. Para expresar el resultado como mg ácido gálico/g de polen se usa la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mg Ác. gálico}}{\text{gramo de polen}} = \frac{\text{mg Ác. gálico}}{\text{mL}} * \frac{\text{volumen del extracto (mL)}}{\text{peso polen (g)}} * FD \quad \text{Ecuación 2-7}$$

### 2.1.3 Análisis proximal

El análisis proximal comprende la determinación de los porcentajes de humedad, grasa, fibra, cenizas, carbohidratos solubles y proteína en los alimentos. Con estos resultados se podrá calificar su valor nutricional como una primera aproximación (Figura 2- 3).



**Figura 2- 3:** Composición proximal de los alimentos

- **Determinación de humedad**

La determinación de la cantidad de agua presente en el polen apícola se llevó a cabo por gravimetría, se pesó 5 g de muestra en una cápsula previamente tarada. La muestra se llevó a la estufa a 70 °C, siguiendo el método oficial 934.06 propuesto por la A.O.A.C. (1996). El contenido de humedad se expresó como gramos de agua por gramos de materia seca.

- **Determinación de cenizas y minerales**

La determinación de cenizas es referida como el análisis de residuos inorgánicos que quedan después de la ignición u oxidación completa de la materia orgánica de un alimento. La cantidad de cenizas se determinó gravimétricamente por calcinación a unos 550 °C en un horno, siguiendo el método oficial de la A.O.A.C. 900.02 (1995).

Las cenizas se disolvieron en ácido nítrico diluido y los minerales: Calcio, Potasio, Sodio, Hierro y Zinc, se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) según lo descrito por el método oficial AOAC 985.35 (2005).

- **Determinación de grasa**

Para la determinación de la grasa en las muestras de polen seco se pesó 2 g de la muestra y se colocó en un dedal de celulosa. Se adicionó 150 mL de hexano, se montó el equipo de Soxhlet, conectando el sifón al balón y al condensador. Se aplicó calentamiento sobre los 60 °C para favorecer el reflujo, manteniéndose el sistema por 5 horas. Se empleó el método oficial 920.177 de la A.O.A.C (2005).

- **Determinación de contenido de proteína (N total)**

La proteína se determinó por el método Kjeldahl según el método oficial 920.176 de la A.O.A.C. (2005), la cual consiste en tres etapas. Inicialmente, se realizó una digestión ácida que permite mineralizar toda la materia orgánica existente en el polen apícola. Posteriormente, se realizó una destilación, en donde el nitrógeno mineralizado; en pH ácido como sulfato de amonio, se desplaza como amoníaco por el proceso de adición de hidróxido de sodio concentrado más calentamiento, posteriormente destilado en forma de vapor y recolectado en una solución ácida. Finalmente, se realiza la titulación del amoníaco

destilado “titulado” con una solución patrón de ácido sulfúrico. Se utilizó un factor de corrección de 6,25.

- **Determinación de fibra dietaria total**

La determinación de la fibra dietaria total se realizó con un método enzimático-gravimétrico, donde los extractos secos y desengrasados se someten a digestión enzimática por parte de  $\alpha$ -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa con el fin de remover el almidón y proteína presente en las muestras. Después de la digestión se filtra y se determina siguiendo el método oficial 985.29 de la A.O.A.C (1988).

### **2.1.4 Perfil de ácidos grasos**

El perfil de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases. Para esto se realizaron extractos de polen apícola con éter de petróleo al vacío a temperatura de 40°C. Se pesaron 0,10 g, previamente se eliminaron los excesos de solvente por medio de corriente de nitrógeno, posteriormente se sometido a derivatización con metóxido de sodio y calentado en baño maría (45 °C) entre 20 y 30 minutos hasta que se obtuvo una sola fase. Los ésteres metílicos de ácidos son diluidos con hexano, posteriormente se les adicionan 5 mL de una solución saturada de NaCl y se agita en vórtex, permitiendo la separación de las fases; la fase superior se hace pasar por un filtro de sulfato de sodio anhidro y deposita en un nuevo vial, se realiza un nuevo lavado con hexano, se separan nuevamente las fases y se reúne con la fracción orgánica. Finalmente se realiza una dilución 1:4 para inyectar en el cromatógrafo. La identificación de los ácidos grasos se realizó por comparación de los tiempos de retención con patrones.

### **2.1.5 Contenido de vitamina E**

Se pesaron aproximadamente, 0,03 g de muestra en un tubo falcón de 50 mL. Se añadieron 10  $\mu$ l de etanol al 96% y 0,7 mL de KOH al 50 %. Se mezcló bien y se procedió a la incubación de las muestras a 80 °C en agitación durante 20 minutos. A continuación, se dejaron enfriar las muestras y la vitamina E se extrajo con hexano tras la agitación en vortex y centrifugación durante 10 minutos a 45000 rpm. El hexano se evaporó en un rota-evaporador a temperatura máxima de 40 °C y finalmente la muestra se diluyó en 200  $\mu$ l de isopropanol antes de ser inyectada en el cromatógrafo.

Para el análisis cromatográfico la muestra se inyectó en un cromatógrafo líquido marca Jasco, (Tokyo, Japón) equipado con una bomba cuaternaria y una columna Betasil C<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm, 5 µm). La fase móvil empleada fue metanol: acetonitrilo (60:40) a un flujo de 0,7 ml/min. La detección de  $\alpha$ -tocoferol se realizó mediante un detector de fluorescencia. La identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención con el correspondiente patrón. La cuantificación se realizó a partir de una cantidad conocida de patrón externo y se expresó en forma de µg/g de muestra.

## 2.2 Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre las características finales de las muestras de polen apícola provenientes de diferentes regiones y épocas se evaluaron mediante un análisis estadístico de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias (Tukey), con un nivel de significancia de 0.05 (95 % de confianza). Estas pruebas se realizaron mediante el uso del paquete estadístico Real Statistics para Excel.

## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Muestras de polen apícola

El procesamiento de las muestras se resume en la

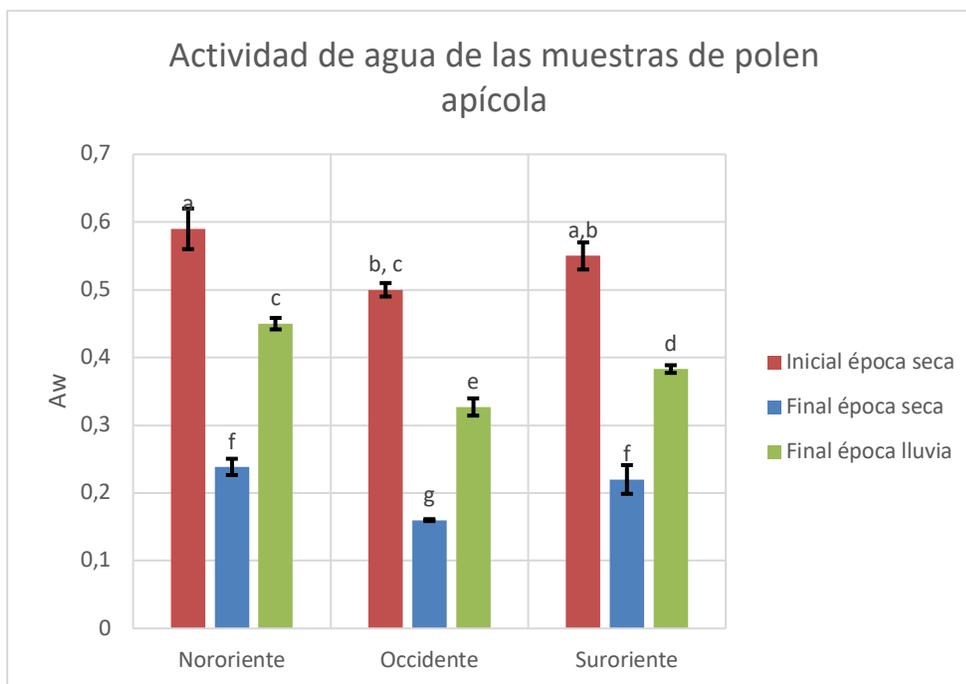
Figura 2- 4, después de ciclonadas las muestras para eliminar las impurezas, se secaron en un horno a una temperatura de 60 °C hasta peso constante, se tamizó y almaceno al vacío.



**Figura 2- 4:** Ciclonado, secado, tamizado y almacenamiento de polen apícola

Una manera rápida para determinar si las muestras de polen contaban con las condiciones adecuadas para detener el secado y el almacenamiento fue medir la actividad de agua antes y después del secado (Figura 2- 5). En el caso de las muestras de la época de lluvia se consideró que debido a su actividad de agua (confirmado posteriormente con la medición del contenido de agua) que no era necesario el proceso de secado.

El control de la actividad de agua es decisivo para asegurar la vida útil del polen apícola, este parámetro es un estimativo del agua que se encuentra disponible para el crecimiento microbiano, Campos et al., (2008) establece que este parámetro debe ser inferior a 0,6 para evitar el desarrollo y el posible avance de procesos fermentativos en el polen apícola. Por tal motivo, se estableció que las muestras con actividad de agua de  $0,6 \pm 0,1$  debían ser sometidas a un proceso de secado para garantizar su inocuidad durante el almacenamiento. Las muestras que fueron empacadas al vacío tenían una actividad de agua que varía entre 0,16 a 0,45.



**Figura 2- 5:** Actividad del agua de las muestras secas de cada zona de la época seca. Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre las diferentes zonas o épocas.

Las muestras fueron conservadas a temperatura ambiente ( $20 \pm 5$  °C) hasta su procesamiento. Antes de los análisis, el polen se homogenizó en un molino hasta un tamaño de partícula menor a 1mm (Tabla 2- 2).

**Tabla 2- 2** Muestras de polen apícola homogenizado

Región	Época seca (diciembre-marzo)	Época de lluvia (agosto-noviembre)
<b>Nororient</b>		
<b>Occidente</b>		
<b>Surorient</b>		

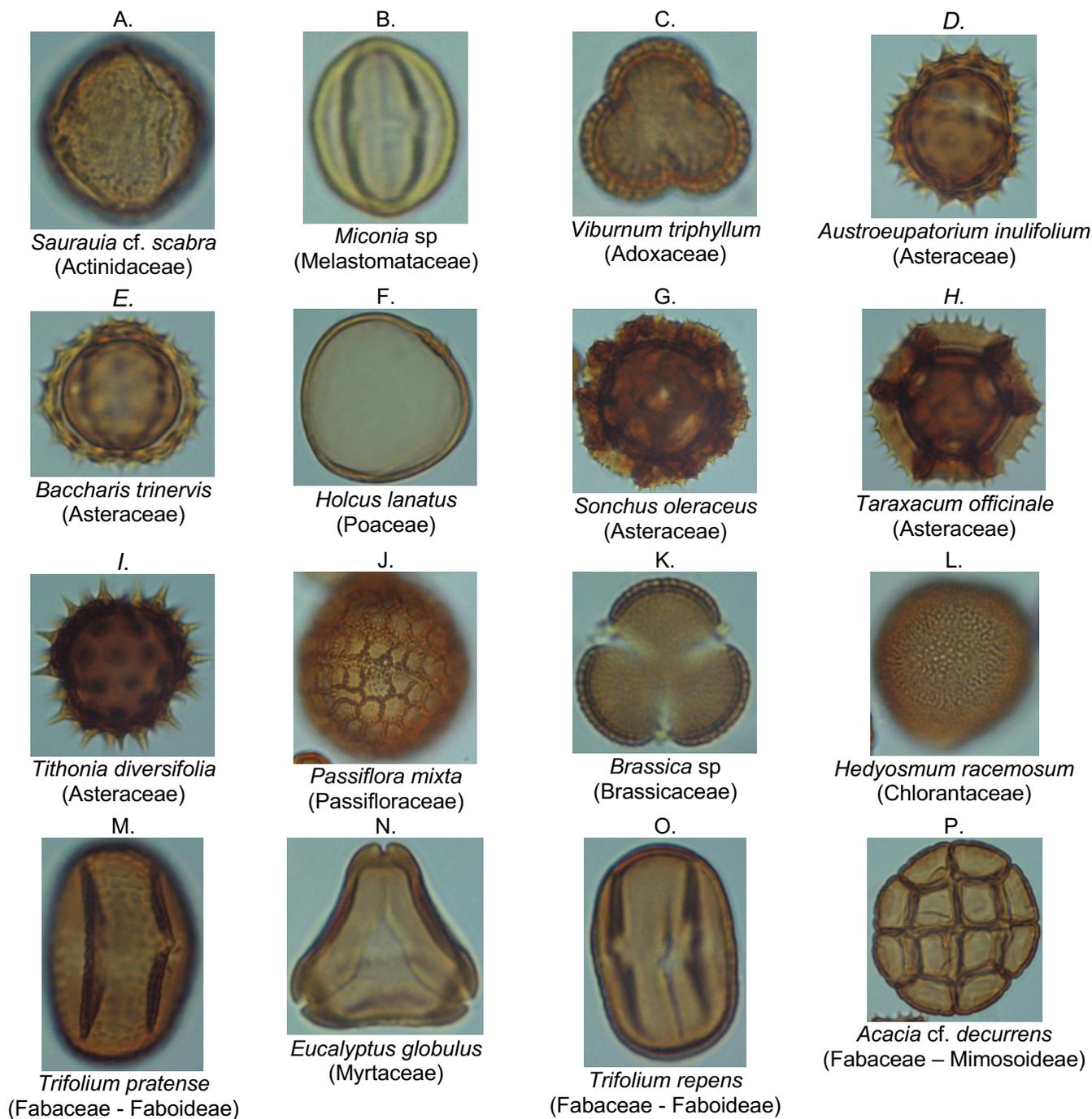
### 2.3.2 Análisis palinológico

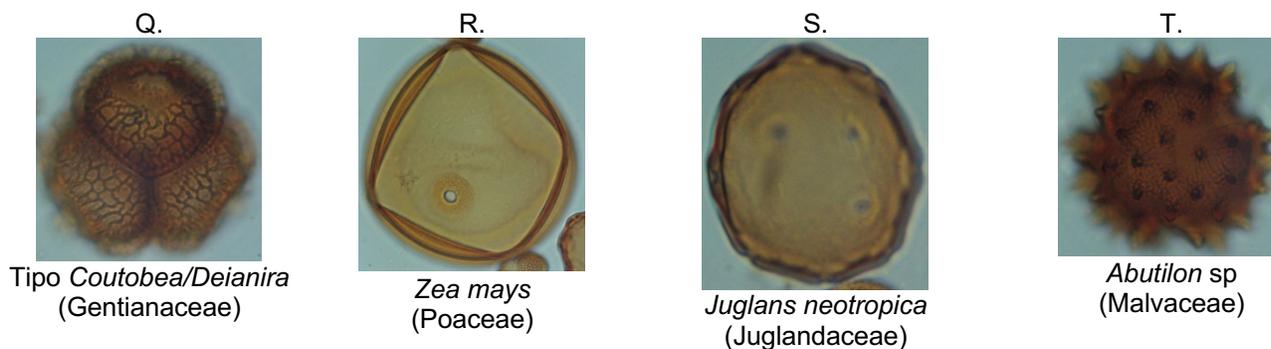
El análisis palinológico permite vincular el polen apícola con las especies botánicas visitadas por las abejas. La identificación de los palinomorfos se hizo con base en la colección de referencia de Blue Note Data Analysis SAS y se consultaron los catálogos de polen de Roubik & Moreno (1991), Palacios et al. (1991), Colinvaux et al. (1999), Velásquez (1999), Bogotá (2002), Giraldo et al. (2011) y Montoya-P et al. (2014).

Los tipos polínicos presentes se muestran en la Tabla 2- 3 y en la Figura 2- 6.

**Tabla 2- 3:** Abundancia y riqueza de los tipos polínicos presentes en las muestras de polen seco

Familia	Especie	Época / Tipo / Localidad						No. de muestras
		Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	
		Polen	Polen	Polen	Polen	Polen	Polen	
		Nororiente	Nororiente	Occidente	Occidente	Suroriente	Suroriente	
Actinidaceae	<i>Saurauia cf. scabra</i>		4 (1,1)				2 (0,6)	2
Adoxaceae	<i>Viburnum triphyllum</i>	2 (0,6)	11 (3,1)	13 (3,4)	14 (4)	23 (4,4)	42 (12,7)	6
Arecaceae	Arecaceae sp 1			11 (2,9)	4 (1,1)			2
Asteraceae	<i>Austroeupatorium inulifolium</i>	5 (1,4)	2 (0,6)				9 (2,7)	3
Asteraceae	<i>Baccharis trinervis</i>			7 (1,9)			5 (1,5)	2
Asteraceae	<i>Sonchus oleraceus</i>		4 (1,1)	7 (1,9)				2
Asteraceae	<i>Taraxacum officinale</i>	59 (16,3)	38 (10,7)	8 (2,1)	15 (4,3)	14 (2,7)	47 (14,2)	6
Asteraceae	<i>Tithonia diversifolia</i>	2 (0,6)	5 (1,4)					2
Asteraceae	Asteraceae sp 1	5 (1,4)	4 (1,1)					2
Brassicaceae	<i>Brassica sp</i>	103 (28,4)	235 (66,2)	162 (42,9)	198 (56,3)	281 (54,1)	155 (46,7)	6
Chloranthaceae	<i>Hedyosmum racemosum</i>	4 (1,1)						1
Ericaceae	Ericaceae sp 1					2 (0,4)		1
Euphorbiaceae	<i>Croton sp</i>			1 (0,3)				1
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia cf. pulcherrima</i>			3 (0,8)				1
Fabaceae (F)	<i>Trifolium pratense</i>	68 (18,7)	7 (2)	9 (2,4)	5 (1,4)	3 (0,6)	14 (4,2)	6
Fabaceae (F)	<i>Trifolium repens</i>	43 (11,8)	13 (3,7)		2 (0,6)	7 (1,3)	12 (3,6)	5
Fabaceae (M)	<i>Acacia cf. decurrens</i>	7 (1,9)	2 (0,6)					2
Gentianaceae	Tipo <i>Coutoubea/Deianira</i>		5 (1,4)					1
Juglandaceae	<i>Junglans neotropica</i>				4 (1,1)			1
Malvaceae	<i>Abutilon sp</i>			4 (1,1)	2 (0,6)			2
Malvaceae	Tipo <i>Malachra</i>				2 (0,6)			1
Melastomataceae	<i>Miconia sp</i>	2 (0,6)				39 (7,5)		2
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i>	20 (5,5)	4 (1,1)	139 (36,8)	104 (29,5)	52 (10)	13 (3,9)	6
Passifloraceae	<i>Passiflora mixta</i>	2 (0,6)				4 (0,8)		2
Poaceae	<i>Holcus lanatus</i>					2 (0,4)		1
Poaceae	<i>Zea mays</i>			3 (0,8)	2 (0,6)			2
-	Indeterminado 2		21 (5,9)	7 (1,9)		13 (2,5)	5 (1,5)	4
-	Indeterminado 3	41 (11,3)		2 (0,5)		79 (15,2)	28 (8,4)	4
-	Indeterminado 4			2 (0,5)				1
<b>Abundancia</b>		363 (100)	355 (100)	378 (100)	352 (100)	519 (100)	332 (100)	<b>87</b>
<b>Riqueza</b>		<b>14</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	





**Figura 2- 6:** Vista microscópica de los tipos polínicos presentes en polen de Cundinamarca

Se puede observar que las 6 muestras de polen estudiadas son poliflorales, en ellas se identificaron 26 tipos polínicos pertenecientes a 15 familias botánicas (Tabla 2- 3), de las cuales Asteraceae y Fabaceae fueron las familias mejor representadas con siete y tres tipos polínicos, respectivamente. De los 26 tipos polínicos identificados, se destaca por su alta frecuencia de aparición *Brassica* sp, tipo Brassicaceae, el cual represento dentro de la riqueza de los pólenes el 28,4; 66,2; 42,9;56,3; 46,7 y 54,1% en Nororiente en época de sequía y de lluvia, en Occidente en época seca y de lluvia y en Suroriente en época de lluvia y sequía, respectivamente. En los análisis se presentaron diferencias en las abundancias y riquezas entre las zonas y no se presentó una tendencia en la riqueza de las épocas analizadas. La mayor riqueza se presentó en Occidente en la época de sequía con 15 tipos polínicos, en esta región se presentó la mayor diferencia en la riqueza entre las épocas ya que durante la época de lluvia se presentó una disminución de 4 tipos.

Las abejas explotan eficientemente unos pocos recursos y recogen pocas cantidades de polen de muchos otros, lo cual les permite conocer la oferta de polen que está disponible en su entorno o porque tienen una preferencia inherente por el polen multifloral. Las especies de la familia Brassicaceae han sido reportadas como recursos poliníferos importantes de *Apis mellifera*. En otros trabajos realizados en la región altoandina, y en regiones frías o estacionales como Chile, Portugal, Escocia y Turquía las familias Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae y Rosaceae también se encuentran dentro del grupo de familias más visitadas por *A. mellifera* (Chamorro et al., 2017; Layek et al., 2020; Montoya, 2011).

La variedad de especies botánicas presentes en las muestras fue menor en la época de lluvias, mientras que durante la época seca aumentó. En otros trabajos se ha verificado que la variedad de especies en las muestras de polen apícola aumenta durante las épocas

de escasez de recursos, ya que las abejas deben visitar un mayor número de especies; en épocas de abundancia, por el contrario, las abejas se concentran en visitar pocas especies (Mattos et al., 2018; Vit et al., 2018). En este trabajo se pudo observar que durante la época de lluvia existe una menor oferta de recursos. Por lo que podríamos considerar que la época de sequía es una época de escasez de alimentos en el campo.

El examen microscópico mostró diferencias notables entre las muestras de polen apícola. En Cundinamarca existe una gran variabilidad respecto a la flora a lo largo del año, por lo que el polen apícola de esta región puede considerarse multifloral y dada la estrecha relación entre el origen botánico y el color, el polen apícola cundiboyacense tendrá una diversidad de colores. La diversidad de colores y tamaños presentes en los recursos botánicos es tan grande que no pareciera que tales características tuvieran mucha importancia en la selección de sus recursos por parte de las abejas, sin embargo, la mayoría de las especies visitadas por las abejas en Cundinamarca tienen flores pequeñas y medianas. También se ha observado que las abejas optan por flores amarillas, cremas y blancas, dichas características visuales juegan un papel muy importante en el proceso de atracción (Montoya, 2011).

### 2.3.3 Carotenoides totales

Los carotenoides son importantes por el aporte de los colores rojos-amarillos característicos del grano de polen apícola y por sus propiedades como antioxidante. El contenido de CT en las muestras de polen apícola se muestran en la Tabla 2- 4.

**Tabla 2- 4:** Contenido de carotenoides totales en muestras de polen de Cundinamarca

$\mu\text{g } \beta\text{-ca/ g de polen}$	Época de sequía	Época de lluvia
<b>Nororient</b>	523,6 $\pm$ 36,0 <sup>a</sup>	1301,9 $\pm$ 69,5 <sup>b</sup>
<b>Occidente</b>	65,4 $\pm$ 10,92 <sup>c</sup>	87,9 $\pm$ 3,3 <sup>d</sup>
<b>Surorient</b>	338,1 $\pm$ 16,0 <sup>e</sup>	505,4 $\pm$ 35,0 <sup>a</sup>

$\mu\text{g } \beta\text{-ca}$ :  $\mu\beta$ -caroteno. Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0,05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre las diferentes zonas o épocas.

A excepción de Occidente, los valores obtenidos son consistentes con los valores reportados en los estudios de Colombia para el altiplano cundiboyacense, los cuales oscilaron entre 170 y 2149 g de  $\mu\beta$ -caroteno/g de polen (base seca) (Pulido et al., 2012; Pulido, 2013; Salazar et al., 2019). Los menores contenidos de CT en el polen se

presentaron en la región de Occidente, los cuales aumentaron un 34,4% en la época de lluvia, estos valores son comparables con lo reportado por Abd-Alla & Salem, (2020), para polen de Egipto.

El mayor contenido se presentó en Nororiente en la época de lluvia con valores superiores a los reportados por Salazar et al., (2019) de  $741 \pm 33,5$ , Pulido, (2013)  $659 \pm 99,8$ , Durán, (2014)  $850 \mu\text{g } \beta\text{-Caroteno/g}$  polen en polen de Colombia y otros países como China  $121,01\text{-}398,63$  (Xu et al., 2011) y Chile  $2,8\text{-}50,2 \mu\text{g/g}$  en base seca (Velásquez et al., 2017). El aumento en carotenoides en esta región puede estar relacionada con la presencia de diferentes especies botánicas que no se encuentran en las otras regiones, tal es el caso de: *Austro eupatorium inulifolium*, *Tithonia diversifolia*, *Asteraceae sp 1*, *Hedyosmum racemosum*, *Trifolium repens* y *Acacia cf. Decurrens*.

Adicionalmente, la evidencia muestra que las plantas de montaña tienen niveles correspondientemente más altos de epoxi-carotenoides y xantofilas con un aumento en la altitud, las cuales son necesarias para la protección del polen contra las condiciones ambientales durante la reproducción de las plantas, especialmente la exposición a los rayos UV (Asbek, 1958, Stanley y Linskens, 1974). Este método eficiente de protección concuerda con los mayores contenidos de carotenoides totales de la región de Nororiente la cual tiene la mayor altura promedio.

Se observó una correlación, entre un mayor contenido de CT y la época del año ya que se presentó un aumento de carotenoides en la época de lluvia de todas las regiones. Al realizar la comparación entre épocas de los tipos polínicos encontramos que se presentó un aumento en las especies *Viburnum triphyllum*, *Taraxacum officinale*, *Brassica sp* las cuales pueden ser las responsables del mayor contenido en esta época.

### 2.3.4 Actividad antioxidante y fenoles totales

El polen apícola posee una buena actividad antioxidante debido a diferentes componentes bioactivos que incluyen carotenoides, vitaminas, ácidos fenólicos, flavonoides, etc.

En la Tabla 2- 5, se puede observar el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de las muestras analizadas de polen apícola ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 2- 5:** Capacidad antioxidante, y contenido de fenoles

Método analítico	Región	Época de sequía	Época de lluvia
FRAP <sup>1</sup>	Nororienté	37,98 ± 2,65 <sup>a, A</sup>	34,46 ± 5,12 <sup>a, A</sup>
	Occidente	69,55 ± 8,19 <sup>a, B</sup>	79,82 ± 1,89 <sup>a, B</sup>
	Surorienté	43,14 ± 4,37 <sup>a, A</sup>	49,28 ± 3,29 <sup>b, C</sup>
TEAC <sup>1</sup>	Nororienté	39,14 ± 2,49 <sup>a, A</sup>	40,11 ± 2,78 <sup>a, A</sup>
	Occidente	91,03 ± 4,89 <sup>a, B</sup>	103,81 ± 4,15 <sup>b, B</sup>
	Surorienté	55,73 ± 3,39 <sup>a, C</sup>	63,15 ± 2,19 <sup>a, C</sup>
Fenoles totales <sup>2</sup>	Nororienté	21,11 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	24,21 ± 2,90 <sup>a, A</sup>
	Occidente	31,85 ± 1,08 <sup>a, B</sup>	36,05 ± 1,18 <sup>b, B</sup>
	Surorienté	24,31 ± 3,83 <sup>a, AB</sup>	23,34 ± 5,11 <sup>a, A</sup>

<sup>1</sup> Actividad antioxidante dada en mmol Trolox/Kg, <sup>2</sup> contenido de fenoles totales dado en mg Acido Gálico/g. Letras minúsculas significa diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dos épocas de la misma región y letras mayúsculas son diferencias significativas entre las diferentes zonas de la misma época.

Se puede observar que la capacidad antioxidante por FRAP no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes épocas de la misma región, mientras que por TEAC se presentaron diferencias estadísticas en las regiones de Occidente y Surorienté. A pesar de lo anterior, si se puede observar mayores contenidos en la época de lluvia.

Las diferencias se presentaron principalmente entre las diferentes regiones de las mismas épocas, es de destacar que en las dos épocas se presentó la misma tendencia, donde la mayor capacidad antioxidante la mostró Occidente en ambos métodos, seguido de Surorienté y por último Nororienté. Las especies botánicas que pueden ser responsables de este contenido son *Arecaceae sp 1*, *Junglans neotropica*, *Abutilon sp*, *Tipo Malachra*, *Eucalyptus globulus* y *Zea mays*, las cuales tienen una mayor abundancia o se encuentran únicamente en la región de Occidente.

La metodología por FRAP sirve para la detección de antioxidantes no enzimáticos que son donadores de hidrógeno, como flavonoides, quercetina, ácido gálico o cafeico, y es insuficientemente sensible al tipo tiol (es decir, -SH que contiene) antioxidantes como el glutatión, por lo tanto, las proteínas son "invisibles" para este método (Apak et al., 2007). En este estudio, se puede resaltar que, la actividad antioxidante por FRAP de las muestras de polen apícola tubo valores más altos que los presentados por Karkar et al., (2020) para polen de castaña ( $1,53 \pm 0,06$  a  $4,75 \pm 0,02$  mmol Trolox/ g) o los reportados por Şahin &

---

Karkar, (2019) para polen de castaña de Turquía y fueron comparables con polen multifloral fresco e hidrolizado de Cundinamarca reportado por Zuluaga-Domínguez et al., (2019) (55.05- 108.97 mmol Trolox/g).

En la metodología por TEAC, el catión radical ABTS reacciona frente a la mayoría de los antioxidantes, incluyendo compuestos fenólicos, tioles y vitamina C. En este estudio los valores de Occidente fueron mayores a los presentados por (Şahin & Karkar, 2019) para pólenes de castaña de Turquía ( $73,09 \pm 1,07$  mmol Trolox/g), por (Belina-Aldemita et al., 2020) para polen multifloral de Filipinas (8,08-62,24 mmol Trolox/g) y pólenes del altiplano Cundiboyacense reportados por (Durán, 2014) y (Zuluaga, 2015) ( $53,73-50,20$ ;  $60,8 \pm 9,9$  mmol Trolox/g).

Comparando entre las dos metodologías usadas se obtuvieron valores más altos en el método de capacidad antioxidante por ABTS, sin embargo, se debe tener en cuenta que los compuestos medidos en estas dos metodologías son diferentes y por lo tanto deben ser tratados de diferentes maneras, en este caso se puede destacar un mayor contenido de compuestos antioxidantes que actúan a través de transferencia de electrones o por enfriamiento de radicales a través de transferencia de átomos de hidrógeno.

Los compuestos fenólicos son los principales responsables del poder antioxidante de los alimentos naturales, otros compuestos como carotenoides, vitaminas, enzimas, etc., en el polen apícola influyen en las propiedades antioxidantes con efectos sinérgicos (Şahin & Karkar, 2019). Dentro de los compuestos fenólicos totales se pueden encontrar compuestos como flavonoides, antocianinas, fenilpropanoides, etc. La actividad antioxidante de los polifenoles se debe principalmente a sus propiedades redox, que pueden jugar un papel importante en la neutralización de los radicales libres, la extinción del oxígeno o la descomposición de los peróxidos. Sin embargo, la actividad antioxidante no está necesariamente correlacionada con altas cantidades de compuestos fenólicos totales, medido por el procedimiento de Folin-Ciocalteu. En este estudio los contenidos de fenoles totales fueron mayores a los reportados por Montenegro et al., (2013) en pólenes monoflorales de Chile (7,12- 18,15 mg Ác. gálico/g) o los reportados por Belina-Aldemita et al., (2020) en polen multifloral de Filipinas (7,95-24,75 mg Ác. gálico/g), fueron comparables con el contenido en polen apícola de castaña reportado por Şahin & Karkar, (2019) ( $32,18 \pm 0,25$  mg Ác. Gálico/g) y mostró menores contenidos que los reportados por Araújo et al., (2017) en pólenes monoflorales y multiflorales de Portugal (33,73 a 75,60 mg

Ác. gálico/g). Los resultados en la mayoría de los estudios muestran grandes variaciones y diferencias significativas en la cantidad y contenido de compuestos fenólicos en el polen de diferentes destinos geográficos y diferentes orígenes botánicos, sirviendo como marcadores quimiotaxonómicos confiables no solo de plantas sino también de polen apícola (Karkar et al., 2021).

Se ha sugerido que las plantas con hojas a diferencia de las plantas áfila como las de la familia Cactaceae presentan mayores concentraciones de compuestos antioxidantes debido a que captan mayor cantidad de radiación solar. El rol que cumplirían estos compuestos, en el polen, no han sido determinados con exactitud. Hay evidencias que sugieren que los flavonoides estarían involucrados en la protección contra el estrés provocado por la radiación UV (G et al., 2013).

### 2.3.5 Análisis proximal

La caracterización fisicoquímica de las muestras del polen apícola se observa en las Tabla 2- 6 y Tabla 2- 7, las diferencias entre las muestras se deben principalmente a dos factores principales: el origen botánico y factores climáticos predominantes durante la recolección y cosecha.

**Tabla 2- 6:** Análisis proximal de las muestras de polen apícola

Región	Época	Humedad (g/100g)	Cenizas (g/100 g)	Grasa total (g/100 g)*	Fibra dietaria total (g/100 g)*	Proteína (g/100 g)*	Carbohidratos totales (g/100 g)*
NO	Sequía	8,1	2,6	4,8	8,1	26,2	58,3
	Lluvia	12,3	2,3	8,6	12,3	26,4	50,4
O	Sequía	7,4	2,9	5,4	7,4	27,8	56,5
	Lluvia	8,5	3,0	6,2	8,5	28,1	54,2
SO	Sequía	10,5	2,7	8,0	10,5	29,4	49,4
	Lluvia	7,5	2,4	7,8	7,5	24,6	57,7

\*calculado en base seca. NO= nororiente, O=occidente y SO=suroriente.

En contenido de humedad de las muestras de polen apícola oscilo entre 7,4 y 12,3%, valores que no cumplen con la normativa francesa, citada por De Arruda et al (2013), que establece un contenido máximo de 6% de humedad, y mucho menos con la argentina y la brasilera que establecen valores máximos de 4%. Durante el proceso de secado también se debe tener en cuenta que un contenido de humedad inferior al 4% puede inducir

reacciones químicas como Maillard y oxidación lipídica, que generan olores poco agradables y rancidez (Campos et al., 2008).

**Tabla 2- 7:** Contenido de minerales en las muestras de polen apícola

Región	Época	Magnesio (mg/100 g)	Calcio (mg/100 g)	Potasio (mg/100 g)	Sodio (mg/100 g)	Hierro (mg/100 g)	Zinc (mg/100 g)
NO	Sequía	153	171	3077	9,8	9,1	0,5
	Lluvia	148	179	2237	7,8	5,3	0,5
O	Sequía	180	183	2812	10,4	12,6	0,9
	Lluvia	177	197	2692	49,0	12,8	0,9
SO	Sequía	190	211	2624	38,8	7,8	0,7
	Lluvia	147	196	2562	57,0	7,6	0,6

El contenido de cenizas vario entre 2,3-3,0 % las cuales están dentro de los límites establecidos por Campos et al., (2008), donde la ceniza debe ser menor o igual a 6%, de igual manera cumple con los máximos permitidos por la regulación brasilera y argentina (máximo 4%). De acuerdo con la resolución 810 del 2021 de Colombia, los requisitos minerales de; Mg: 310 mg/día, Ca: 1000 mg/día, K: 4700 mg/día, Na: 2000 Fe: 20 mg/día y Zn: 11 mg/día para mujeres y hombres mayores a 4 años. La contribución de los minerales del polen apícola a los valores diarios de referencia establecidos por porción (25g de polen) se muestra en Es importante conocer la diversidad y cantidad de minerales en el suelo, la roca, el aire y el agua que son una parte natural de los organismos y sus productos naturales, cualquier deficiencia significativa afecta el contenido elemental de las plantas que crecen en una región, lo que afecta directamente al polen apícola y por ende puede afectar sus propiedades farmacoterapéuticas (Liolios et al., 2019). Dado que algunos de los minerales son esenciales, el contenido elemental de los productos apícolas utilizados como complementos alimenticios debe conocerse en detalle y reportarse para poder identificar las diferencias geográficas (Altunatmaz et al., 2017).

**Tabla 2- 8.** En términos de los valores medios, se podría considerar que el polen apícola es buena fuente de magnesio, potasio y en algunos casos del hierro al proveer del 10 al 19% del valor de referencia.

Es importante conocer la diversidad y cantidad de minerales en el suelo, la roca, el aire y el agua que son una parte natural de los organismos y sus productos naturales, cualquier deficiencia significativa afecta el contenido elemental de las plantas que crecen en una

región, lo que afecta directamente al polen apícola y por ende puede afectar sus propiedades farmacoterapéuticas (Liolios et al., 2019). Dado que algunos de los minerales son esenciales, el contenido elemental de los productos apícolas utilizados como complementos alimenticios debe conocerse en detalle y reportarse para poder identificar las diferencias geográficas (Altunatmaz et al., 2017).

**Tabla 2- 8:** Aporte porcentual de los minerales a los valores diarios de referencia

Región	Época	Magnesio	Calcio	Potasio	Sodio	Hierro	Zinc
NO	Sequía	12,34	4,28	16,37	0,12	11,38	1,14
	Lluvia	11,94	4,48	11,90	0,10	6,63	1,14
O	Sequía	14,52	4,58	14,96	0,13	15,75	2,05
	Lluvia	14,27	4,93	14,32	0,61	16,00	2,05
SO	Sequía	15,32	5,28	13,96	0,49	9,75	1,59
	Lluvia	11,85	4,90	13,63	0,71	9,50	1,36

Los carbohidratos son los principales componentes del polen apícola, en este caso fueron calculados por diferencia y osciló entre 49,4 y 58,3%, esta fracción se compone principalmente por los glúcidos provenientes del néctar mezclado por la abeja, principalmente glucosa y fructosa. Algunos oligosacáridos y polisacáridos como almidón, calosa, pectina, celulosa y lignina también están presentes en el polen (Fuenmayor, 2009).

Las proteínas son macronutrientes de gran interés en la industria alimentaria por su contribución al valor nutricional de los alimentos al proporcionar aminoácidos que son esenciales para el crecimiento y bienestar humano (Mayda et al., 2020). De acuerdo con la resolución 810 del 2021 de Colombia, el valor diario de referencia para las proteínas es de 50 g/día para mujeres y hombres mayores a 4 años. La contribución del polen apícola por porción (25g de polen) varía entre 12,3-14,7 % por lo que se puede destacar que todos los extractos son buena fuente de proteína total (>10 %). Se encontró que el contenido de proteína de las muestras analizadas se encuentra en un rango del 24,6 al 29,4%, cumpliendo con los parámetros establecidos por las normas brasileras, francesas y argentinas (8–41 %) referenciadas por (Soares et al., 2013). Dentro de la fracción proteica del polen se pueden encontrar cantidades notables de enzimas, especialmente amilasa, invertasa, fosfatasas, tranferasas así como factores coenzimáticos, como biotina, glutatión y ciertos nucleótidos (Fuenmayor, 2009).

El contenido de lípidos en el polen apícola varío entre 4,8 y 8,6 %, cumpliendo con el mínimo exigido por la regulación brasilera (1,8 %) y el máximo establecido por la francesa (10 %). Valores por encima de los establecidos son indeseados ya que hacen que el producto sea más susceptible a rancidez por oxidación lipídica (Mesa, 2015). El contenido de lípidos es altamente variable y dependerá de la cantidad de ácidos grasos, pigmentos, ceras, esteroides, vitaminas liposolubles, alcoholes pesados e hidrocarburos (Zuluaga, 2015).

### 2.3.6 Perfil de ácidos grasos

El análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) del polen apícola recolectado en el departamento de Cundinamarca se muestra en la Tabla 2- 9. En este se mostrará el porcentaje relativo de los ácidos grasos saturados (SFAS), ácidos grasos monoinsaturados (MUFAS), polinsaturados (PUFAS), n-3 (Ácidos grasos Omega 3), n-6 (Ácidos grasos Omega 6) y n6/n-3 (Relación omega 3/omega 6).

**Tabla 2- 9: %Perfil de ácidos grasos del polen apícola**

FAMES	Nororiente		Occidente		Suroriente	
	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia
<b>C6:0</b>	0,1	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0
<b>C8:0</b>	0,1	1,6	0,1	0,3	1,8	1,5
<b>C10:0</b>	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,0
<b>C12:0</b>	3,2	3,1	1,1	0,8	4,3	3,3
<b>C14:0</b>	0,4	0,8	0,5	0,8	0,5	0,5
<b>C16:0</b>	22,7	20,9	20,2	19,9	20,2	22,9
<b>C16:1</b>	0,1	0,0	0,1	0,2	0,1	0,0
<b>C17:0</b>	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3
<b>C17:1</b>	0,2	0,5	1,2	1,4	0,6	0,8
<b>C18:0</b>	1,5	2,9	1,9	1,9	2,7	2,2
<b>C18:1n-9c</b>	5,6	5,2	7,5	7,7	5,0	5,3
<b>C18:1n-9T</b>	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
<b>C18:2n-6c</b>	7,0	10,5	8,7	8,3	10,4	5,5
<b>C18:2n-6T</b>	0,3	0,7	0,1	0,2	0,9	1,4
<b>C18:3n-6</b>	0,3	0,1	0,4	0,3	0,0	0,0
<b>C18:3n-3</b>	50,4	43,1	48,2	46,5	42,2	45,8
<b>C20:0</b>	0,5	2,4	0,6	0,9	2,5	2,3
<b>C20:1n-9</b>	2,0	0,8	0,3	0,2	0,3	0,2
<b>C20:2n-6</b>	1,2	0,3	0,3	0,0	0,2	0,2
<b>C20:3n-6</b>	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2
<b>C20:3n-3</b>	0,4	0,2	0,5	0,1	0,2	0,2

<b>C22:0</b>	1,0	1,9	0,8	0,6	2,1	1,8
<b>C22:2</b>	1,1	1,1	3,1	2,7	2,0	1,3
<b>C23:0</b>	0,7	1,7	2,4	4,3	1,7	2,4
<b>C24:0</b>	0,0	0,7	0,4	0,5	0,7	0,5
<b>C24:1n-9</b>	0,0	0,5	0,0	1,2	0,5	0,8
<b>TOTAL</b>	100	100	100	100	100	100
<b>SFAS (%)</b>	30,7	36,5	28,7	30,5	37,1	37,7
<b>MUFAS (%)</b>	8,3	7,2	9,7	11,4	7,0	7,8
<b>PUFAS (%)</b>	61,0	56,3	61,7	58,1	55,9	54,5
<b>n-3 (%)</b>	50,8	43,3	48,8	46,6	42,2	46,0
<b>n-6(%)</b>	9,0	11,9	9,8	8,9	11,7	7,2
<b>n-6/n-3</b>	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2

Los ácidos grasos juegan un papel esencial en la reproducción, desarrollo y crecimiento de las abejas. Dentro de las muestras de polen apícola analizadas se puede destacar que los ácidos grasos dominantes fueron en orden decreciente  $\alpha$ -linolénico [C18:3n3], palmítico [C16:0], linoleico [C18:2n6c], oleico [C18:1n9c], láurico [C12:0], esteárico [C18:0], los cuales se detectaron en todas las muestras en concentraciones individuales diferentes. Lo anterior concuerda con lo reportado por Fuenmayor B. et al., (2014) y Gardana et al., (2018) quienes reportan la abundancia en orden decreciente de ácido  $\alpha$ -linolénico, linoleico y oleico para pólenes de Colombia. En polen apícola monofloral recolectado en las principales regiones productoras de China, se ha reportado que los principales ácidos grasos en orden decreciente son:  $\alpha$ -linolénico, palmítico, oleico, linoleico, behénico y esteárico (K. Yang et al., 2013). Estos autores encontraron que los contenidos de ácido  $\alpha$ -linolénico eran generalmente más altos que los del ácido linoleico, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Feás et al., (2012) analizaron el polen apícola orgánico cosechado en el Parque Natural Internacional del Duero (Portugal) e informaron que el principal ácido graso encontrado fue ácido  $\alpha$ -linolénico, seguido de ácido linoleico, palmítico y oleico. Es de destacar que todas las muestras de polen apícola pueden ser consideradas como excelente fuente de ácidos grasos n-3 de acuerdo con la resolución 810 del 2021 de Colombia ya que aportan más de 0,6 g de ácido  $\alpha$ -linolénico [C18:3n3] por porción de 25 g.

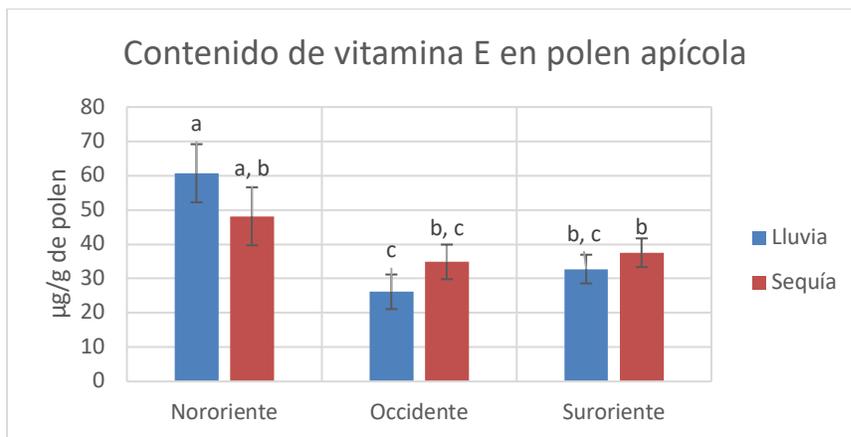
En general, las concentraciones de ácido linoleico y ácido  $\alpha$ -linolénico en el polen apícola analizado fueron mayores en las épocas de lluvia. El predominio de estos ácidos en el polen apícola puede desempeñar un papel mucho más importante en la higiene de la colmena que en su nutrición. Ya que se ha observado su capacidad antibacteriana, en

términos de inhibición de la germinación de esporas y crecimiento vegetativo de microbios y patógenos de abejas melíferas, como *larvas de Paenibacillus* y *Melisococcus pluton* y otros microbios (Manning, 2001).

Las relaciones de ácidos grasos insaturados/saturados fueron mayores de 1,0 como ha sido reportado por diversos autores para pólenes de varios orígenes (Fuenmayor B. et al., 2014; Sagona et al., 2017; Zuluaga, 2015). Las proporciones más altas de insaturados/saturados (UFAS/SFAS) en polen pueden soportar su uso como complemento alimenticio en la dieta para reducir la cantidad total de grasas y colesterol, previniendo algunas enfermedades cardiovasculares (Belina-Aldemita et al., 2019). Las variaciones que se presentaron en la proporción de UFAS/SFAS, se pueden atribuir a los diferentes orígenes botánicos o las condiciones de procesamiento y almacenamiento. Los resultados también fueron consistentes con la idea de que las abejas recolectan polen con un alto nivel de ácidos grasos insaturados (Sagona et al., 2017).

### 2.3.7 Contenido de vitamina E

En la Figura 2- 7 se puede observar el contenido de vitamina E expresada como  $\alpha$ -tocoferol en muestras de polen apícola de tres zonas de Cundinamarca y dos épocas del año, se puede observar que existe una tendencia a la variación entre las muestras analizadas de cada zona; sin embargo, al contrarrestarlo con el análisis de varianza realizado, se observa que estas diferencias no son significativas en las zonas de Occidente (lluvia), Suroriente y Nororiente (Sequía).



**Figura 2- 7:** Contenido de vitamina E en polen apícola

Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre las diferentes regiones o épocas.

Las muestras de polen apícola tienen un contenido aproximado entre 26,13-60,70  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -tocoferol/g polen. Es de destacar que todas las muestras de polen apícola pueden ser consideradas como excelente fuente de vitamina E de acuerdo con la resolución 810 del 2021 de Colombia ya que el aporta más del 30% de los valores recomendados en 100g del producto. Existen diferentes estudios, en cuanto al contenido de vitamina E en el polen. Según Oliveira et al. (2009), el contenido de vitamina E varía entre 13,5 - 42,5  $\mu\text{g}$  /g de polen. Stanley y Linskens (1974) reportan un contenido que varía entre 21-170  $\mu\text{g}$  /g y Según Campos et al. (2010) el contenido varía entre 40– 320  $\mu\text{g}$  /g de polen, de acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo están dentro de los rangos cuantificados por los diferentes autores.

Se ha encontrado una correlación positiva entre el contenido de ácido linoleico y el contenido de tocoferoles lo que indica la presencia de cantidades elevadas de tocoferoles en los aceites insaturados (Kamal y Anderson, 1997). Era de esperarse que en las muestras con mayores contenidos de ácido linoleico (Nororiental época de lluvia) se presentaran los mayores contenidos de  $\alpha$ -tocoferol, por lo cual se puede pensar que esta correlación también es aplicable a muestras de polen apícola.

## 2.4 Conclusiones parciales

Las muestras de polen apícola de Cundinamarca pueden destacarse por ser una excelente fuente de ácidos grasos n-3 (0,6 g de ácido  $\alpha$ -linolénico) y vitamina E (26,13-60,70  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -tocoferol/g polen) de acuerdo con la resolución 810 del 2021 de Colombia.

En las muestras de polen apícola se identificaron 26 tipos polínicos pertenecientes a 15 familias botánicas, de las cuales las familias con una mayor representación fueron Asteraceae y Fabaceae. Adicionalmente, se destacó por su alta frecuencia la aparición de la especie *Brassica* sp, tipo Brassicaceae.

El contenido de carotenoides totales, actividad antioxidante determinada por TEAC y FRAP y el contenido de fenoles totales, de las muestras de polen apícola variaron de 65.4 a 1301,9 mg de  $\beta$ -caroteno/Kg, 34,46 a 79,82 mmol Trolox/kg polen, 39,14 a 103,81 mmol Trolox/kg polen y 21,11 a 36,5 mg Ácido gálico/g polen, respectivamente. Las diferencias

en el contenido de los compuestos bioactivos entre las diferentes regiones estudiadas y respecto a lo reportado por otros autores se deben principalmente al origen geográfico y botánico, los cuales también pueden variar a lo largo año.

### **3.Extracción de los compuestos liposolubles del polen apícola**

En esta sección se describen los diferentes ensayos realizados para la determinación de las condiciones operacionales de la extracción convencional y por ultrasonido. A los extractos oleosos obtenidos por extracción convencional, ultrasonido y supercrítico se le realizaron diferentes análisis que permitieron determinar su nivel de oxidación (peróxidos, p-anisidina y TOTOX), color, contenido de carotenoides totales, perfil de ácidos grasos y contenido vitamina E. Finalmente, gracias a la microscopia electrónica de barrido se pudieron observar los efectos que cada uno de los tipos de extracción tienen sobre la capa externa (exina) de los granos de polen apícola, lo cual ayuda a entender la diferencia que existe entre los diferentes contenidos nutricionales y bioactivos en los extractos oleosos.

#### **3.1 Marco Teórico**

Por su naturaleza hidrófoba, los ácidos grasos, vitamina E, ésteres y carotenoides se extraen de forma convencional utilizando disolventes orgánicos no polares como cloroformo, hexano, acetona, éter de petróleo, etc. El uso de estos solventes dificulta la obtención de un extracto seguro ya que tienen el inconveniente de no poder ser eliminados completamente, razón que impide su uso en la industria alimentaria. Actualmente se está estudiando el concepto de extracción verde que permiten la obtención de componentes nutricionales termosensibles, donde se utilizan temperaturas de procesamiento más bajas

y se reemplazan los solventes orgánicos peligrosos por disolventes GRAS "reconocidos como seguros" (Butnariu, 2016; Saini & Keum, 2018).

Un disolvente prometedor en los métodos tradicionales para la extracción de compuestos apolares son los aceites vegetales, su uso tiene el beneficio de generar una barrera contra el oxígeno que retrasa el tiempo de oxidación y la tasa de degradación del extracto. Además, genera productos libres de componentes tóxicos y es amigable con el medio ambiente (Goula et al., 2017).

Diferentes aceites han sido utilizados en la extracción de compuestos liposolubles y se ha realizado la optimización en diferentes matrices alimentarias. En desechos de camarones se evaluó el contenido de carotenoides extraídos por metodologías tradicionales utilizando diferentes aceites como girasol, cacahuete, sésamo, mostaza, soja, coco y salvado de arroz (Sachindra & Mahendrakar, 2005). En desechos de cangrejos se evaluó el uso de aceite de girasol, soja, sésamo y grano de arroz (Hooshmand et al., 2017) y en cáscaras de granada se comparó la extracción del aceite de girasol con aceite de soya (Goula et al., 2017), en estos estudios se ha destacado el uso de aceite de girasol por presentar los mejores porcentajes de extracción.

Existen diferentes métodos para la extracción de carotenoides de fuentes naturales, sin embargo, la nueva tendencia de procesos de extracción verde se puede destacar: la extracción por agitación a presión atmosférica, la extracción asistida por ultrasonido: EAU, la extracción asistida por microondas: EAM y la extracción con fluidos supercríticos (SFE), que a menudo utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico. Estos métodos difieren en el modo de desintegración celular, el tipo de contacto con el solvente, la cantidad y la fase de estos, la temperatura aplicada, la presión, etc. (Strati & Oreopoulou, 2014).

### **3.1.1 Extracción sólido-líquido**

La extracción sólido-líquido, también conocida como convencional es una técnica de separación donde a partir de una mezcla sólida se pretende separar un componente o grupo de compuestos (soluto(s)) de otro (inerte) mediante su contacto con una fase líquida (disolvente) por transferencia de materia. Las dos fases que se ponen en contacto deben ser inmiscibles entre ellas ya que no se desea disolver todos los compuestos, por lo que

---

el solvente debe disolver selectivamente solo los componentes de interés de la fase sólida (Meléndez-Martínez, 2017).

El principio de la técnica se basa en la solubilidad selectiva de los compuestos, la naturaleza del solvente debe ser similar a la del soluto, para esto se pueden usar mezclas de solventes para mejorar la extracción, el proceso de transferencia de masa también se ve favorecido por la agitación, la disminución del tamaño de partícula y el aumento de la temperatura, sin embargo, el procesamiento en condiciones severas de calor, puede ocasionar cambios químicos y físicos que deterioran las propiedades organolépticas, nutricionales y bioactivas reduciendo el contenido o disminuyendo en algunos casos la biodisponibilidad de algunos nutrientes (Meléndez-Martínez, 2017).

Fenomenológicamente en el proceso de extracción sólido-líquido puede ocurrir la siguiente serie de pasos:

1. Transferencia de disolvente de la mayor parte de la solución a la superficie de la matriz
2. Penetración o difusión del disolvente en los poros de la matriz sólida
3. Disolución del disolvente en el soluto
4. Transporte del soluto a la superficie de la matriz sólida
5. Migración del soluto extraído de la superficie externa del material sólido en la solución
6. Movimiento del extracto con respecto al sólido y matriz sólida

Una vez finalizada esta etapa de transporte de materia, se procede a la separación de las fases, obteniéndose una mezcla de disolvente y soluto llamada “extracto” y una mezcla de la que se ha extraído el soluto, denominada “refinado”, que estará formada por la fase sólida inerte con una parte de la disolución retenida. Esta separación se puede llevar a cabo con diversas técnicas como filtración, centrifugación, sedimentación, etc. (Treybal R.E, 1988).

Los parámetros que se deben tener en cuenta en esta técnica para mejorar el proceso de extracción son: tiempo y relación solvente: matriz. A mayores tiempos de extracción se obtendrán mayores rendimientos hasta que se logre saturar el solvente y el proceso llegue al equilibrio, por lo que el estudio de la cinética permitiría determinar el tiempo óptimo para obtener el mayor rendimiento. Una manera de disminuir el tiempo de equilibrio es someter la mezcla a una constante agitación, esto permitirá que el solvente saturado circundante a

la matriz sea renovado por aquel que aún no está saturado, lo cual aumentaría la transferencia de masa y disminuiría los tiempos de extracción, además, de evitar la sedimentación y apelmazarían de la matriz. La relación solvente: matriz también juega un papel crucial en los rendimientos ya que entre menos solvente la saturación se llevará a cabo en menor tiempo (Strati & Oreopoulou, 2014). Adicionalmente el contenido de agua en el material sólido puede interferir en el proceso de extracción ya que este puede competir con el disolvente de extracción para la disolución del soluto, afectando a la transferencia de masa. Por lo cual, en la mayoría de los casos, el material se seca en condiciones que no causan degradación de los compuestos (Takeuchi et al. 2009).

#### ▪ Cinética de extracción

En el presente trabajo se consideró que la velocidad de extracción de sólidos solubles es dependiente del gradiente de concentración ( $C_s - C_t$ ), donde  $C_s$  y  $C_t$  fueron las concentraciones de carotenoides ( $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno/ $\text{mg}$  aceite) provenientes del polen apícola en condiciones de equilibrio y a cualquier tiempo “t”, respectivamente. Las constantes cinéticas se determinaron experimentalmente aplicando el modelo de extracción de segundo orden descrito por Ho y col. (2005) y Qiu y col. (2009). Conforme este modelo, la ecuación cinética de segundo orden para la velocidad de extracción se describe por la Ecuación 3-1.

$$\frac{dC_t}{dt} = k_2(C_s - C_t)^2 \quad \text{Ecuación 3-1}$$

Donde  $k_2$  ( $\text{mg}$  aceite/ $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno/día) es la constante de velocidad de extracción de segundo orden. Separando las variables e integrando la ecuación aplicando las condiciones fronteras  $C_t = 0$  cuando  $t = 0$  y  $C_t = C_t$  para  $t = t$  se obtiene la Ecuación 3-2.

$$C_t = \frac{C_s^2 k_2 t}{(1 + C_s k_2 t)} \quad \text{Ecuación 3-2}$$

Esta ecuación corresponde a la expresión de velocidad integrada para reacciones de extracción de segundo orden y puede expresarse en su forma lineal conforme a la Ecuación 3-3.

$$\frac{t}{C_t} = (k_2 C_s^2)^{-1} + \frac{t}{C_s} \quad \text{Ecuación 3-3}$$

La velocidad de extracción ( $C_t/t$ ) puede ser obtenida mediante el inverso de la ecuación anterior y la velocidad de extracción inicial  $h$  (equivalente a  $C_t/t$  cuando  $t$  se aproxima a 0) puede ser definida como  $h = k_2 C_s^2$  de tal manera que la ecuación anterior puede ser expresada de acuerdo con la Ecuación 3-4.

$$\frac{t}{C_t} = \frac{1}{h} + \frac{t}{C_s} \quad \text{Ecuación 3-4}$$

De esta forma, la velocidad de extracción inicial  $h$ , la capacidad de extracción  $C_s$  y la constante de velocidad de extracción de segundo orden pueden ser determinadas experimentalmente a partir de la pendiente y el intercepto al origen graficando  $t/C_t$  contra  $t$ .

### 3.1.2 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido es una mejora a la extracción sólido-líquido con solventes, se basa en el uso de ondas mecánicas a una frecuencia superior al umbral de la audición humana ( $> 16$  kHz). Estas ondas viajan a través de un material o en su superficie a una velocidad que es característica del material a través del cual se propaga. Esta técnica se puede dividir de acuerdo con los rangos de frecuencia usados en el ultrasonido. En calidad se suele usar análisis no destructivo donde se usan alta frecuencia (100 kHz – 1 MHz) de baja potencia (típicamente  $<1$  W cm<sup>-2</sup>). El ultrasonido de baja intensidad se aplica más comúnmente como una técnica analítica para proporcionar información sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos, como la firmeza, la madurez, el contenido de azúcar, la acidez, etc. (Soria & Villamiel, 2010), por último está el uso de bajas frecuencia (16–100 kHz) (típicamente en el rango de 10–1000 W cm<sup>-2</sup>) que se utiliza para alterar, física o químicamente, las propiedades de los alimentos y se puede usar para la extracción de componentes / sustancias como flavonoides hidrófilos (antocianinas, taninos) y carotenoides hidrófobos (licopeno,  $\beta$ -caroteno, capsaicina y luteína) de productos hortícolas como zanahoria, jengibre, tomate, uvas, aceitunas, orujo de oliva y pimienta y de sus residuos de procesamiento (Strati & Oreopoulou, 2014).

La eficiencia de esta técnica de extracción se basa principalmente en el fenómeno de cavitación. Cuando el ultrasonido se propaga en el medio usa una serie de ondas de compresión y rarefacción, cuando la rarefacción excede las fuerzas de atracción de las moléculas líquidas se forman burbujas de cavitación a partir de los núcleos de gas

distribuidas dentro del fluido. Estas burbujas se ven obligadas a oscilar sobre su radio de equilibrio, cuando las burbujas alcanzan el rango de tamaño de resonancia, crecen a un tamaño máximo dentro de un ciclo acústico y se colapsan violentamente (Bruno et al., 2019). La implosión de las burbujas conduce a la acumulación de energía en los puntos calientes, generando temperaturas extremas (5000 K) y presiones (1000 atm), que producen, ondas de energía de corte muy altas y turbulentas en la zona de cavitación (Goula et al., 2017). Esta energía puede provocar cambios en los enlaces químicos, lo cual puede aumentar la liberación de compuestos bioactivos al medio (Rodríguez et al., 2015).

Cuando las burbujas de cavitación implosionan en la superficie de los sólidos (como partículas, células vegetales, tejidos, etc.), los microchorros y la colisión interparticular generan efectos como la descamación de la superficie, la erosión, la descomposición de las partículas, la sonoporación (la perforación de las paredes y membranas celulares) y la disrupción celular permitiendo un mayor contacto entre el solvente y la matriz alimentaria, mejorando la transferencia de masa del soluto al solvente (Hooshmand et al., 2017). Debido al colapso de las burbujas se genera un aumento de la temperatura que puede provocar la degradación de los compuestos liposolubles y disminuye el rendimiento de extracción, por lo que la selección de la intensidad del ultrasonido es un factor fundamental. Al realizar una selección adecuada de este parámetro se puede asegurar que el aumento de temperatura se pueda disipar fácilmente en el medio y no dañe significativamente el soluto (Saini & Keum, 2018).

Este método de extracción se puede aplicar de dos maneras: directa o indirectamente a la muestra. En la primera la sonda se sumerge en la solución y la segunda se realiza a través de las paredes a través de un baño que disminuye hasta 100 veces la potencia suministrada por el método directo. Ambos sistemas se basan en un transductor como fuente de energía de ultrasonido. El baño ultrasónico es el tipo de dispositivo ultrasónico más comúnmente conocido que generalmente consiste en un tanque de acero inoxidable con uno o más transductores ultrasónicos (Goula et al., 2017).

Los baños ultrasónicos generalmente operan a una frecuencia de alrededor de 40 kHz. Las sondas ultrasónicas de alta potencia son generalmente preferidas para aplicaciones de extracción. El sistema de sonda es más potente debido a una intensidad ultrasónica suministrada a través de una superficie más pequeña (solo la punta de la sonda), en comparación con el baño ultrasónico. Generalmente funcionan a alrededor de 20 kHz y

---

usan un transductor unido a la sonda que se sumerge en el reactor, lo que resulta en un suministro directo de ultrasonido en los medios de extracción (Chemat et al., 2017).

Este método de extracción se ha convertido en una alternativa más llamativa industrialmente, ya que es eficiente, rápida, limpia y reproducible. Los beneficios de esta técnica en la industria alimenticia son (Strati & Oreopoulou, 2014)

- Mejora general del rendimiento de extracción
- La oportunidad de utilizar disolventes alternativos (GRAS), por ejemplo, el aceite de girasol
- La reducción del tiempo de procesamiento

La especificidad del método se puede mejorar por medio de la variación y optimización de los parámetros como: frecuencia de ultrasonido, ciclo de propagación (continuo o discontinuo), potencia nominal del dispositivo, amplitud, tipo y geometría del sistema (Bruno et al., 2019).

### **3.1.3 Extracción con fluidos supercríticos**

Los diagramas de fases (representación gráfica de condiciones termodinámicas de equilibrio) de las sustancias permite conocer el estado de agregación de estas a cualquier valor de temperatura y presión. Los diagramas se encuentran definidos por tres líneas, de sublimación, de fusión y de vaporización. Esta última se caracteriza por desaparecer en un punto denominado, punto crítico, en el cual la presión y la temperatura reciben el nombre de presión y temperatura críticas. Cuando una sustancia está por encima de sus valores críticos, dicha sustancia recibe el nombre de fluido supercrítico, condición en la cual la sustancia no puede ser considerada ni como un gas, ni como un líquido ya que solo existe una fase (Román et al., 2016).

El proceso de extracción con fluidos supercríticos se lleva a cabo en recipientes (extractores) donde el fluido supercrítico entra en contacto con el alimento. Los solutos de interés se encuentran dentro de las células o en estructuras específicas del alimento, estas se pueden romper para mejorar el proceso de extracción, utilizando un tipo específico de pretratamiento; en general, se utiliza molienda y deshidratación. El fenómeno de extracción se puede describir de la siguiente manera: primero, el sustrato sólido absorbe el solvente supercrítico, promoviendo la dilatación de las estructuras celulares. Este paso facilita el

flujo de solvente al disminuir la resistencia de transferencia de masa; simultáneamente, los compuestos solubles se disuelven por el disolvente y finalmente, los compuestos disueltos se transfieren por difusión a la superficie del sólido (Pereira & Meireles, 2010).

Este proceso es similar al proceso convencional, pero su diferencia radica en el uso de fluidos supercríticos como agente extractor. El poder de solvatación está relacionado con la densidad, la cual varía con la presión y la densidad. La densidad de los fluidos supercríticos es similar a la de los líquidos, lo que le permite tener un gran poder solvatante y al tiempo posee la viscosidad de un gas favoreciendo su capacidad de penetración en los poros de las muestras (Román et al., 2016). Las condiciones supercríticas de algunos compuestos se muestran en la Tabla 3- 1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Como se puede observar la temperatura crítica del dióxido de carbono es tan solo de 30,9°C por lo que este puede ser usado como un solvente de extracción eficiente para compuestos termolábiles como la vitamina E y carotenoides presentes en muestras de polen apícola.

**Tabla 3- 1:** Condiciones supercríticas de algunos compuestos (Román et al., 2016)

<b>Solvente</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Presión (MPa)</b>	<b>Densidad (Kg/m<sup>3</sup>)</b>
<b>Dióxido de carbono</b>	30,9	7,4	468
<b>Agua</b>	373,9	22,1	322
<b>Metanol</b>	239,4	8,1	272

Los residuos de disolvente en los extractos despiertan el temor de los consumidores por lo que esta técnica ha sido propuesta debido a que al realizarse la despresurización el solvente se convierte en gas y no genera residuos en el producto final. El uso de CO<sub>2</sub> permite una rápida penetración en los poros de matrices complejas, mejorando así las eficiencias de extracción, debido al mayor coeficiente de difusión y la menor viscosidad. El dióxido de carbono es considerado seguro debido a que no es corrosivo, es inerte, no es inflamable, no tiene olor, no tiene sabor y es amigable con el medio ambiente (Saini & Keum, 2018).

---

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Polen apícola**

En todos los ensayos se empleó polen apícola seco proveniente del departamento de Cundinamarca, que fue previamente caracterizado en el capítulo 2 de este trabajo. El polen fue molido hasta un máximo de diámetro de partícula 1,00 mm antes de cada ensayo.

### **3.2.2 Determinación de las variables de extracción convencional**

Para la determinación de las condiciones de extracción convencional se evaluó el contenido de carotenoides totales de los extractos en diferentes días de extracción, se utilizó un método con agitación (2000 rpm) a temperatura ambiente ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ). Inicialmente se creó y homogeneizó por 6 minutos una solución madre con una relación 60:40 (w/w) de polen apícola: aceite de girasol; esta relación se basó en los resultados de Salazar et al., (2019); quien determinó que esta relación permite obtener los extractos oleosos con el mayor contenido de carotenoides totales. Para cada extracción, se pesaron 70 g de la mezcla en un vaso de precipitado y se agitaron por tiempos de 1, 5, 8, 12 y 14 días. Una vez terminado el tiempo de extracción, la mezcla se transfirió a tubos falcon de 50 mL, los cuales se centrifugaron para recuperar el aceite enriquecido con carotenoides.

### **3.2.3 Determinación de las variables de extracción asistida por ultrasonido**

Se usó la metodología de superficie de respuesta (MSR), la cual se basa en el análisis estadístico de regresión de un modelo óptimo minimizando la variación de los residuales. Por lo tanto, con la finalidad de ver los efectos de los distintos parámetros seleccionados en la extracción asistida por ultrasonido de los carotenoides totales, se empleó un diseño experimental central compuesto conformado con una factorial de  $2^2$  con 2 puntos centrales y una serie de corridas axiales. En el análisis se evaluaron los porcentajes de amplitud de 10 %, 30% y 50 %; se emplearon tiempos de 10, 15, 20 minutos. Las variables independientes o variables de estudio y sus niveles de variación se muestran en la Tabla 3- 2.

**Tabla 3- 2:** Diseño experimental, variables independientes y sus niveles de variación

Variables	Codificación	-1.41	-1	0	1	1.41
Amplitud (%)	X1	2	10	30	50	58
Tiempo (minutos)	X2	7,95	10	15	20	22

Todos los experimentos se realizaron de manera aleatoria y los datos se analizaron mediante la MSR para obtener los modelos matemáticos que describen las interacciones entre las variables independientes y las variables respuesta. La significancia de los modelos ( $p < 0.05$ ) se determinó mediante el ANOVA (prueba de F) y la influencia de los factores de estudio sobre las variables respuesta se observó a través de los gráficos de superficie de respuesta.

Se aplicó ultrasonido a una mezcla polen apícola: aceite (60:40 w/w) en un equipo de ultrasonido (Fisherbrand Model 705 Sonic Dismembrator) mediante un proceso discontinuo en el tiempo (10s on:7s off) para evitar el sobrecalentamiento. La sonda de ultrasonido se colocó dentro de una caja de reducción de sonido cuyas paredes interiores estaban recubiertas con espuma acústica resistente al agua (Figura 3- 1). Se utilizó una sonda de aleación de titanio de 13 mm con diámetro y geometría cilíndrica, que permite el tratamiento máximo de 250 mL de muestra y una amplitud al 100% de 126 $\mu$ m. En cada tratamiento, se pesaron 70 g de la mezcla en un vaso de precipitado y se realizaron los ensayos por triplicado. La concentración de los carotenoides totales fue determinada espectrofotométricamente y se expresó como  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno/mg de polen apícola.

**Figura 3- 1:** Ultrasonido

### 3.2.4 Extracción con fluidos supercríticos

El polen apícola se cargó dentro de la cámara de extracción de un equipo de fluidos supercríticos de 12 L. Una vez listo se hace pasar el fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>) dentro de la cámara de extracción mediante una bomba, presurizándose hasta alcanzar una presión de 450 bares y temperatura de 50 °C. Aquí el disolvente entra en contacto con los componentes del polen a un flujo de 4,5 Kg/hora, solubilizando y arrastrando los componentes apolares por un tiempo de 3 horas. El fluido, cargado de analito, fluye al restrictor, donde se produce la descompresión del fluido cambiando éste de fase y separándose de los componentes disueltos para poder ser recuperados. El CO<sub>2</sub> usado es reciclado y se usa varias veces antes de su liberación al medio ambiente.

### 3.2.5 Pruebas de oxidación de los extractos oleosos

Se realizaron dos tipos de análisis de la oxidación; como oxidación primaria índice de peróxidos; y como oxidación secundaria índice de p-anisidina e índice de Totox, verificados bajo las normas del Codex Alimentarios.

- **Índice de peróxidos (PV)**

Para la determinación del índice de peróxidos se le añadió a las muestras de aceite una mezcla de los reactivos diclorometano-metanol en proporción 70:30 (v/v, volumen/volumen, grado analítico) y una solución de tiocianato de amonio (30% m/v, masa/volumen al 30%, grado analítico), se mezcló y se midió la absorbancia de 500nm contra un blanco de la mezcla de diclorometano: metanol en proporción 70:30. Se adiciono cloruro ferroso (0,35% m/v, masa/volumen, que contiene 2% de HCl 10N, reactivos grado analítico). Se mezcló y después de exactamente 5 minutos se midió la absorbancia de nuevo a 500nm, simultáneamente se efectúa una determinación en blanco de reactivos. La curva de calibración se realizó con una solución patrón de cloruro férrico y se graficó la absorbancia contra concentración de hierro en µg. obteniéndose la siguiente ecuación:

$$y = 0,0278x + 3E - 05, \quad R^2 = 0,9985 \quad \text{Ecuación 3-5}$$

Para los cálculos se utiliza la siguiente fórmula:

$$m = E_2 - E_1 - E_0 \quad \text{Ecuación 3-6}$$

$$PV \left[ \frac{mEq}{Kg} \right] = \frac{m}{55,84} * W \quad \text{Ecuación 3-7}$$

Donde:

m = número de µg de Fe

W = peso de la muestra en gramos

(E<sub>0</sub>) = valor de la primera lectura de absorbancia

(E<sub>2</sub>) = valor de la segunda lectura de absorbancia

(E<sub>1</sub>) = valor de la lectura de absorbancia del blanco de reactivos

mEq/Kg= miliequivalentes por Kilogramo

Peso atómico del Hierro= 55,84

#### ▪ Índice de p-anisidina (AV)

Para la determinación de este índice se pesaron 1,5 gramos de muestra en un matraz volumétrico de 25 mL y se diluyó a volumen con iso octano. Se midió la Absorbancia de la solución a 350 nm, en una cubeta, con el espectrofotómetro, donde se usó de referencia la cubeta llena de solvente como blanco. Se pipeteó exactamente 5 mL de la solución aceitosa en un tubo de ensayo y exactamente 5 mL del solvente en un segundo tubo de ensayo. Luego se adicionó 1 mL del reactivo p-anisidina (solución) para cada tubo y se agitó. Luego de exactamente 10 min se midió la absorbancia del solvente en el primer tubo de ensayo en una cubeta a 350 nm, usando la solución del segundo tubo de ensayo como blanco en la cubeta de referencia. El índice de p-anisidina viene dado por la siguiente expresión:

$$\text{Índice de } p - \text{anisidina} = \frac{25 \cdot (1,2 \cdot A_s - A_b)}{m} \quad \text{Ecuación 3-8}$$

Donde:

As: Absorbancia de la disolución de materia grasa después de reaccionar con la p-anisidina

Ab: Absorbancia de la disolución de la materia grasa

M: Masa, en gramos, de la muestra pesada

- Valor TOTOX

El valor de p-anisidina (AV) a veces se mide junto con el valor de peróxido para determinar el valor TOTOX (TV), donde  $TV = 2PV + AV$ .

### 3.2.1 Color

Para determinar las características espectrales de los extractos oleosos del polen apícola se utilizó un medidor de colorimetría CR-400 konica Minolta Sensing. Inicialmente se midió un estándar (blanco). Para ello, se colocó la sonda sobre el estándar, se selecciona CALIBRAR y se acciona la tecla ENTER. La calibración requiere aproximadamente 6 segundos. Al finalizar correctamente aparecerá una confirmación. Posteriormente, se realiza la medición de las muestras, las cuales se ubican dentro celdas de medición. La sonda del equipo se ubica sobre las celdas de tal manera que cubra toda la superficie de medición. Se presiono la tecla ENTER y la medición se iniciará inmediatamente. La información se obtuvo en las coordenadas CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ).

- La calibración de referencia deberá realizarse con las mismas condiciones ambientales que la medición de las muestras correspondiente.
- La calibración de referencia deberá realizarse antes de comenzar a trabajar o después de una interrupción del trabajo.

### 3.2.2 Carotenoides totales

El contenido de carotenoides totales (CT) de los extractos oleosos se determinó, siguiendo la metodología descrita por (Salazar et al., 2013). Se pesaron de 50-100mg de extracto oleoso en un balón a florado de 25mL. En seguida, se llevó a volumen con acetona y se midió la absorbancia a 450 nm, usando acetona como blanco en un espectrofotómetro JASCO Modelo V-730 UV / VIS, con el software Spectra Manager (Jasco, Italia) en una celda de cuarzo de 1 cm. Se preparó una curva de calibración usando  $\beta$ -caroteno estándar  $\geq 97\%$  (UV) (Sigma Aldrich, USA) en un rango de concentración desde 0,50 hasta 4,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , obteniéndose la ecuación ( $y = 0,2016x + 0,0598$ ,  $R^2=0,9983$ ), donde y es absorbancia (adimensional, unidades de absorbancia) y x es concentración ( $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno mL}^{-1}$ ). Los CT se calcularon en mg equivalentes de  $\beta$ -caroteno por kilogramo de extracto oleoso (Salazar González, 2014).

### 3.2.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las muestras previamente deshidratadas fueron montadas en talones de SEM, se usó recubrimiento metálico de oro y de evaporación de carbono para observación de muestras no conductoras y un secador de punto crítico para tratamiento de muestras biológicas. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido QUANTA 200 marca FEI con detectores de electrones secundarios y electrones retro dispersados y una sonda EDAX (Figura 3- 2). Diferentes imágenes fueron tomadas a magnitudes de 2000X y 4000X.

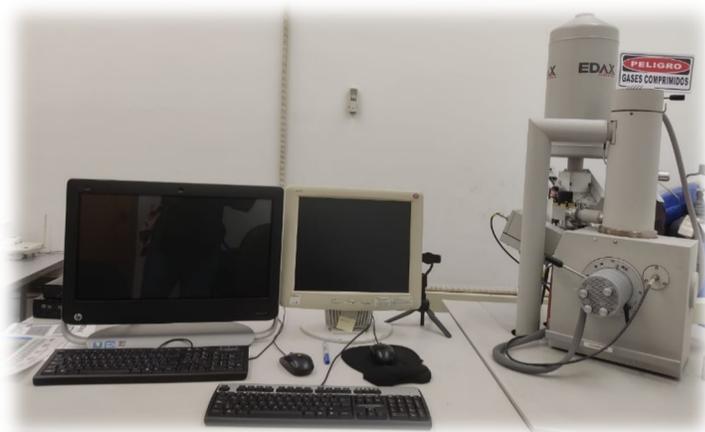


Figura 3- 2: Microscopio electrónico de barrido

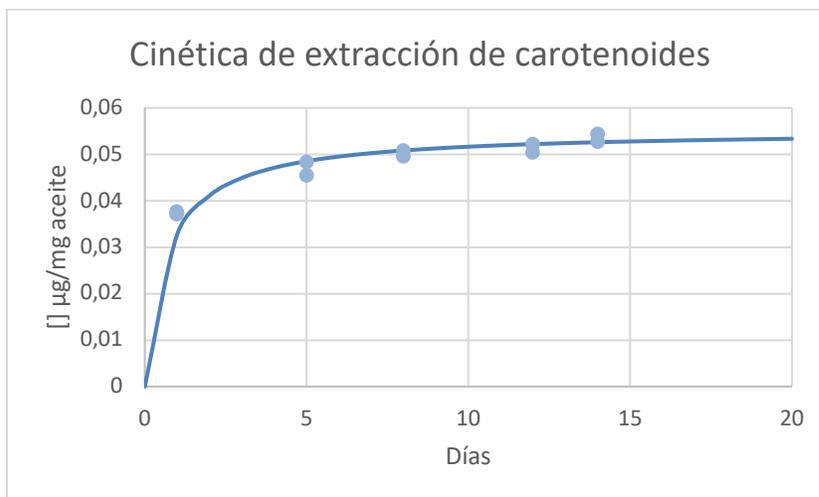
### 3.3 Análisis estadístico

Las bases de datos y los gráficos se elaboraron en Excel. Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico Excel, con el fin de determinar si existían diferencias entre los tiempos y tratamientos de cada una de las muestras. Para identificar las muestras significativamente diferentes se realizó una comparación de medias mediante la prueba Tukey HSD ( $p < 0.05$ ). Dentro del análisis estadístico para los reportes obtenidos del laboratorio, la descripción se hizo utilizando la media y la desviación estándar. La metodología de superficie de respuesta (RSM) permitió analizar simultáneamente los efectos de las variables de amplitud y tiempo en la extracción por ultrasonido de polen apícola. Adicionalmente, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para evaluar de manera global los datos obtenidos de color de los extractos oleosos.

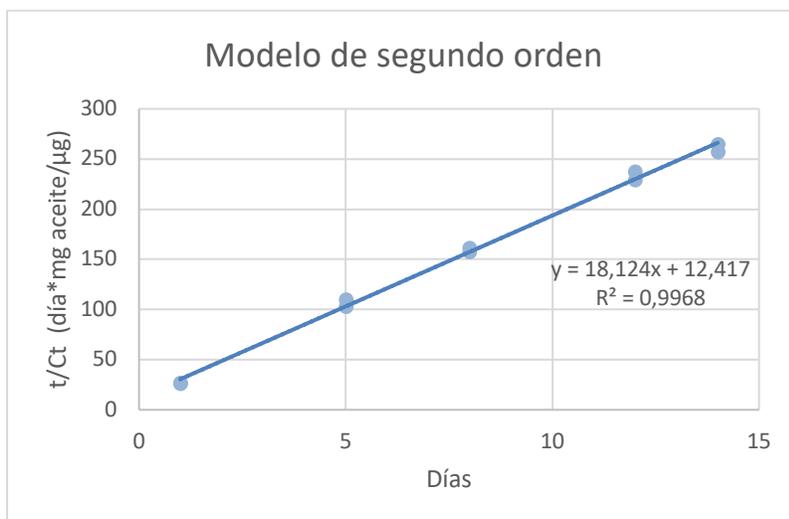
## 3.4 Resultados y discusión

### 3.4.1 Determinación de las variables de extracción

La Figura 3- 3 muestra los resultados de  $t/C_t$  contra el tiempo en su forma lineal (Ecuación 3-4), donde  $C_t$  es la concentración de carotenoides correspondiente a cada tiempo  $t$ . La cinética de extracción de los compuestos liposolubles del polen apícola en aceite mostro un rápido incremento inicial en la concentración de carotenoides en el extracto, produciéndose posteriormente una disminución en la velocidad de acumulación tendiendo hacia a su estabilización con respecto al tiempo (Figura 3- 3). Los datos obtenidos de la extracción se ajustaron a un modelo cinético de segundo orden ( $R^2= 0.9968$ ) (Figura 3- 4). El modelo de segundo orden se ajustó adecuadamente al proceso de extracción experimental lo que nos permite considerar que este modelo puede ser utilizado para expresar adecuadamente el proceso fisicoquímico de extracción.

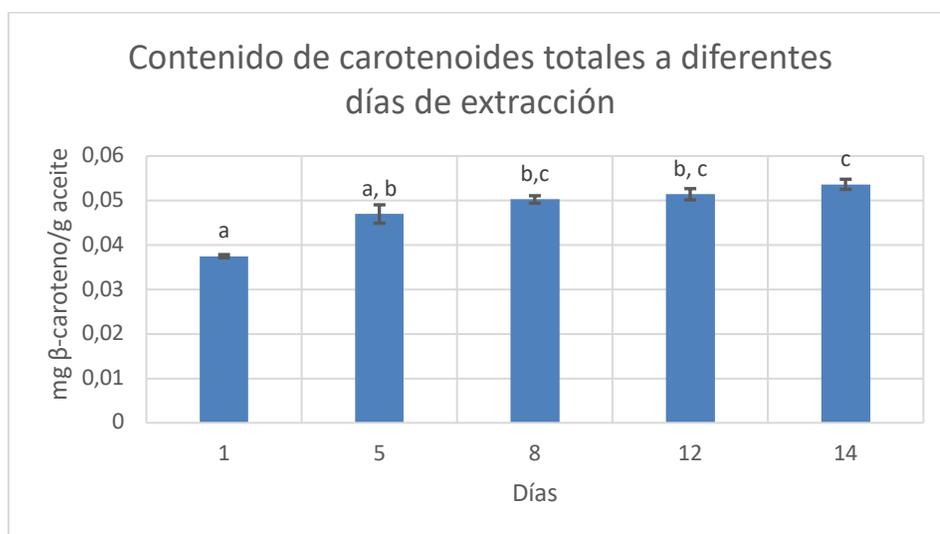


**Figura 3- 3:** Cinética de extracción de carotenoides del polen apícola.



**Figura 3- 4:** Modelo de segundo orden aplicado a la cinética de extracción de carotenoides del polen apícola.

El tiempo óptimo de extracción se calculó considerando como tiempo optimo a aquel que nos permita obtener el 95 % del rendimiento máximo esperado ( $C_s$ ), siendo estos 13 días. Sin embargo, este día no se encontraba dentro de los días analizado y se aproximó al día 14.



**Figura 3- 5:** Promedio y desviación estándar del contenido de carotenoides en diferentes días de extracción.

Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre los diferentes días de extracción.

Finalmente se realizó una prueba de Tukey para determinar qué día no presentaba diferencias significativas en el contenido de carotenoides (Figura 3- 5). El tiempo óptimo de extracción según la cinética de extracción fue 14 días sin embargo al observar los resultados de la Figura 3- 5 encontramos que el contenido de carotenoides totales del día 8 no presenta diferencias significativas, con el tiempo óptimo de la cinética.

En polen apícola se han realizado pocas extracciones por agitación continua para la obtención de extractos ricos en carotenoides, sin embargo con este método Salazar et al., (2019) mostro que una relación en peso de polen apícola: proporción de aceite de 60% y 12 días de extracción permite obtener extractos ricos en carotenoides, en ese trabajo se evaluaron diferentes relaciones polen: aceite y se determinó que a mayores relaciones matriz-disolvente es posible obtener extractos con mejores rendimientos de extracción. Comparando con este estudio la inclusión de la homogenización con un Blixer permite disminuir el tiempo de extracción a 8 días. Esta disminución puede deberse a la acción que ejercen las cuchillas sobre el tamaño y estructura de los granos de polen. La pared exterior del polen apícola se conoce como exina y es muy flexible, elástica, fuerte y firme; está hecho de esporopolenina, un compuesto que proporciona resistencia química al polen y conserva los compuestos que se encuentran dentro de él (Zuluaga-Domínguez et al., 2019). El estudio realizado por Yang et al., (2019) donde aplica un tratamiento de molienda con bolas al polen apícola de rosa mostro que este disminuye el tamaño de partícula hasta 12,73  $\mu\text{m}$  y rompe parcialmente la exina, produciendo una mayor liberación de los compuestos nutricionales.

Los extractos por agitación han sido usados en la pigmentación de la carne de la trucha arco iris (Torres et al., 2020). En este estudio, el polen se mezcló con aceite vegetal en una proporción de 0,25:1, durante 24 h con agitación constante y en la oscuridad. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que las truchas alimentadas con este extracto presentaban un color rosa pálido en comparación con una dieta sin carotenoides añadidos y se recomendó probar extractos más concentrados.

- **Extracción asistida por ultrasonido**

La Ecuación 3-9; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** representa el modelo matemático para la variable de carotenoides totales (Y). Este modelo presentó un buen ajuste a los datos experimentales con un  $R^2$  de 86,498. La respuesta del contenido

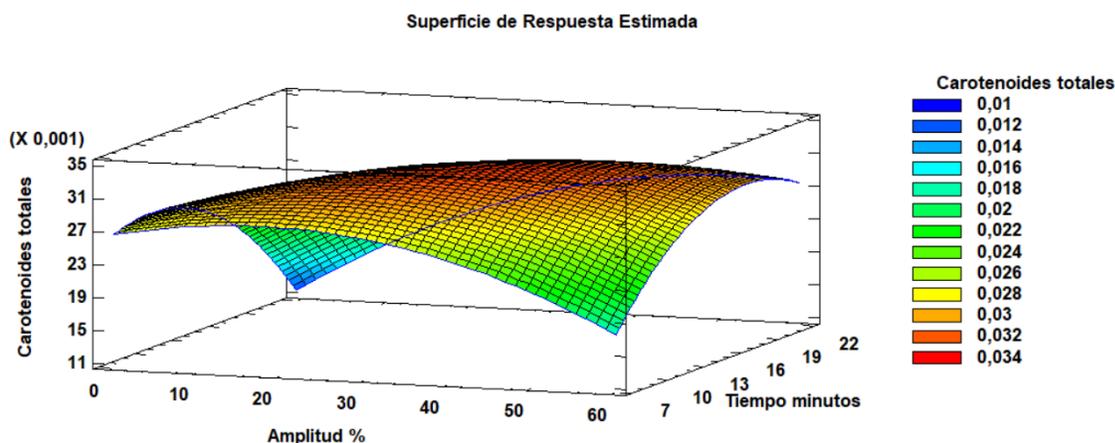
de carotenoides totales mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

$$Y = 0,016459 + 0,000015696*X_1 + 0,0022059*X_2 - 0,000006105*X_1^2 + 0,000028157*X_1*X_2 - 0,00011053*X_2^2$$

Ecuación 3-9

La prueba de falta de ajuste está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si se debería usar un modelo más complicado. La prueba se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones obtenidas en condiciones repetidas de los factores. El valor-P para la falta de ajuste en la tabla ANOVA es mayor que 0,05, el modelo parece ser adecuado para los datos observados al nivel de confianza del 95,0%.

Los resultados obtenidos de todos los experimentos que correspondieron al modelo explicado se procesaron aplicando la metodología de superficie de respuesta con el programa estadístico StatGraphics. De esta forma se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción de los carotenoides totales. Como resultado las condiciones optimizadas para la extracción convencional de carotenoides totales de polen apícola fueron: amplitud 34,4 y tiempo 14,4 minutos.



**Figura 3- 6:** Grafico de superficie de respuesta.

La Figura 3- 6 muestra la gráfica de superficie de respuesta para la determinación de carotenoides totales en función a las variables de amplitud y tiempo. Así mismo, se puede observar que a medida que se incrementó el tiempo de extracción en amplitudes altas hay

un aumento en el contenido de carotenoides totales, mientras que a amplitudes bajas se presenta una disminución.

La extracción asistida por ultrasonido del polen apícola se ha centrado en la fracción hidrosoluble y no se disponen datos de la extracción liposoluble. Dentro de los compuestos extraídos en la extracción hidrosoluble se encuentran polifenoles y flavonoides (Muñoz et al., 2020), polisacáridos (Mi et al., 2020), quercetina y kaempferol (Lv et al., 2015). La especificidad de la extracción asistida por ultrasonido se puede mejorar por medio de la variación y optimización de los parámetros como: frecuencia de ultrasonido, ciclo de propagación (continuo o discontinuo), potencia nominal del dispositivo, amplitud, tipo y geometría del sistema (Bruno et al., 2019). Este método de extracción se puede aplicar de dos maneras: directa o indirectamente a la muestra. En la primera la sonda se sumerge en la solución y la segunda se realiza a través de las paredes utilizando un baño que disminuye hasta 100 veces la potencia suministrada por el método directo (Goula et al., 2017). Los beneficios de esta técnica en la industria alimenticia son la mejora general del rendimiento de extracción, la oportunidad de utilizar disolventes alternativos (GRAS) y la reducción del tiempo de procesamiento (Strati & Oreopoulou, 2014).

Para todos los tipos de extracción se debe tener en cuenta las limitaciones que ejerce la exina sobre la liberación de los compuestos nutricionales y antioxidantes liposolubles, en este caso se está usando una combinación de tratamientos físicos que facilitan la extracción al romper la exina. El estudio realizado por Yang et al., (2019) donde aplica un tratamiento de ultrasonido al polen apícola monofloral muestra que la exina se rompe ampliamente en fragmentos por las aberturas germinales después del tratamiento con ultrasonido. Adicionalmente, indican que este tratamiento podría promover la liberación de algunos componentes nutricionales del polen apícola de rosa. Sin embargo, el tratamiento podría causar pérdidas en vitamina B1 y vitamina C.

### **3.4.2 Extracción con fluidos supercríticos**

Pocas extracciones con fluidos supercríticos se han llevado a cabo en el polen apícola. (Xu et al., 2009) evaluó la extracción de los ácidos grasos de polen apícola mono floral de colza y optimizó las condiciones de presión, la temperatura y el CO<sub>2</sub> y encontró que las mejores condiciones están en un rango de presión 13,2 – 46,8 MPa, temperatura 33,2– 66,8 °C y CO<sub>2</sub> caudal 6,6 - 23,4 L/h mientras que (Wang et al., 2009) determinó que las

condiciones óptimas de SFE son: presión de extracción a 35 MPa, temperatura a 45 °C y tiempo de extracción dinámica a 90 min. Posteriormente (Xu et al., 2011) evaluó la extracción en polen mono floral de loto y obtuvo que la presión y temperatura optima era de 38,2 MPa y 49,7 °C lo cual concuerda con (Xu et al., 2009). Para este estudio se tuvieron en cuenta los rangos de condiciones propuestos por Xu et al., (2009), presión de 45 MPa y temperatura de 50°C, bajo estas condiciones de extracción mencionadas, se obtuvo un extracto oleaginoso, de color naranja intenso, con olor característico. La extracción se realizó por lotes de 2 kg de muestra apícola de cada una de las regiones y épocas, en total de los 12 kg cargados para la extracción se produjeron 372gr en extractos recuperados, lo que significa un rendimiento aproximado del 3 al 3,5 % de todo el proceso de extracción.

El efecto del tratamiento con fluidos supercríticos con CO<sub>2</sub> en la pared celular del polen apícola a través de la extracción fue descrito por Xu et al., (2009), quien ha encontrado que las células de polen apícola se rompen completamente a 45 MPa con hendiduras lineales, este tratamiento permite que el CO<sub>2</sub> permee adecuadamente la pared celular del polen apícola y se extraigan adecuadamente los compuestos de interés.

Los extractos con fluidos supercríticos se han usado en La suplementación con compuestos naturales en piensos para peces, (Messina et al., 2020) mostro que la inclusión del extracto del polen en la dieta del *Sparus aurata* tenían un efecto estimulante sobre inmunidad del suero de los pescados dadas sus altas propiedades antioxidantes.

En el ámbito medicinal, (Yang et al., 2014) estudio el efecto protector del extracto con fluido de CO<sub>2</sub> supercrítico de polen de colza (SFE-CO<sub>2</sub>) en el desarrollo de la hiperplasia prostática benigna (HPB), los resultados mostraron que el tratamiento con SFE-CO<sub>2</sub> inhibe su desarrollo, indicando que puede ser un agente útil en el tratamiento de la HPB.

### **3.4.3 Pruebas de oxidación de los extractos oleosos**

- **Índice de peróxidos**

Los aceites con compuestos insaturados son particularmente susceptibles a la oxidación, desarrollando peróxidos bajo malas condiciones de almacenamiento en frío o congelado. Los peróxidos son los precursores de productos de la descomposición que provocan sabores rancios. La concentración de peróxidos es indicativa de oxidación durante las primeras etapas del deterioro de los lípidos, este índice se vuelve menos confiable durante

la última etapa de deterioro, porque aumenta la degradación del peróxido (Irwin & Hedges, 2004).

**Tabla 3- 3:** Índice de peróxidos de extractos oleosos del polen apícola expresado como mEq de oxígeno/ kg de extracto

Extracción	Occidente		Nororiente		Suroriente	
	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia
<b>C</b>	2,22 ± 0,31 <sup>d</sup>	2,01 ± 0,12 <sup>d</sup>	1,47 ± 0,09 <sup>b, e</sup>	0,72 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,11 <sup>b, d</sup>	1,70 ± 0,08 <sup>e</sup>
<b>U</b>	0,69 ± 0,08 <sup>a, f</sup>	1,20 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,01 <sup>a, b</sup>	1,35 ± 0,03 <sup>b, c</sup>	1,81 ± 0,08 <sup>c, d</sup>	1,66 ± 0,12 <sup>c, d, e</sup>
<b>S</b>	0,62 ± 0,03 <sup>f</sup>	0,61 ± 0,15 <sup>f</sup>	0,06 ± 0,03	ND	0,46 ± 0,18 <sup>f</sup>	0,68±0,12 <sup>f</sup>
<b>Aceite de girasol</b>			1,626±0,07 <sup>c</sup>			

ND: no detectado. C=convencional, U=ultrasonido, S=supercríticos. Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre el contenido de peróxidos de las diferentes metodologías de extracción, región o época.

En base a los resultados obtenidos de los análisis de índice de peróxidos que se presentan en la Tabla 3- 3, se observa que, del total de muestras analizadas, todas cumplieron con el parámetro de calidad establecido por el Codex Alimentarius; este parámetro indica que para que un aceite sea apto para consumo humano el índice de peróxidos de este debe ser menor o igual a 10 mEq de oxígeno/ kg de aceite.

La diferencia entre los valores de índice de peróxido de los diferentes extractos se debe principalmente al tipo de extracción, en la extracción por ultrasonido, se presenta un aumento de la temperatura ( $<50^{\circ}\text{C}$ ), lo cual podría llevar a la formación de compuestos de oxidación primaria incrementando el índice de peróxidos, sin embargo, se debe tener en cuenta que los hidroperóxidos se descomponen fácilmente a temperaturas elevadas, por lo que en esta extracción se podría incurrir en pérdidas (Irwin & Hedges, 2004). Por otra parte, se puede observar que los mayores valores corresponden a la extracción convencional, lo cual puede deberse a la prolongada exposición de los extractos al oxígeno de la atmósfera.

Estos resultados son de gran importancia ya que los peróxidos pueden ocasionar daños a la salud al degradarse y formar radicales, capaces de formar monómeros oxidados, dímeros, polímeros y benzopirenos, los cuales son altamente tóxicos en el aceite, podrían generar consecuencias en la salud, ya que estas moléculas son perjudiciales y pueden

provocar el desarrollo de una enfermedad crónica no transmisible siendo la más letal, el cáncer (FAO, 2008).

#### ▪ Índice de p-anisidina

El principio de este índice radica en la reacción entre los compuestos aldehídicos y la p-anisidina (p-metoxianilina). La intensidad del color de los productos amarillentos formados en la reacción depende no solamente de la cantidad de compuestos aldehídicos presentes sino también de su estructura: un doble enlace en la cadena carbonada, conjugado con el doble enlace del carbonilo, aumenta la absorbancia molar en 4 o 5 veces. Esto significa que los 2-alquenes contribuyen prioritariamente al valor determinado (Irwin & Hedges, 2004).

**Tabla 3- 4:** Índice de p-anisidina de extractos de polen apícola expresado como mEq de oxígeno / kg de extracto

Extracción	Occidente		Nororiente		Suroriente	
	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia
<b>C</b>	0,91 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,04 <sup>b, f</sup>	0,47 ± 0,01 <sup>b, d</sup>	0,51 ± 0,04 <sup>b, d</sup>	0,90 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>U</b>	1,09 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,57 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,27 ± 0,07 <sup>e</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>e, f</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>e</sup>
<b>S</b>	0,06 ± 0,01 <sup>g</sup>	0,07 ± 0,05 <sup>g</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>g</sup>	0,06 ± 0,04 <sup>g</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>g</sup>	0,09 ± 0,06 <sup>g</sup>
<b>Aceite de girasol</b>			0,349±0,006			

C=convencional, U=ultrasonido, S=supercríticos. Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre las diferentes metodologías de extracción, región o época.

En base a los resultados que se presentan en la Tabla 3- 4 no se encontraron referencias de valores de índice de p-anisidina en aceites enriquecidos de polen apícola o para los extractos supercríticos, sin embargo, teniendo en cuenta lo establecido por el Codex Alimentarius podemos observar que todos los extractos cumplen la normativa de ser menor o igual a 20 meq de oxígeno/ kg de aceite. Debido a que este es un análisis secundario de oxidación, indica al igual que el índice de peróxidos, el grado de oxidación de la muestra, sin embargo, este tipo de análisis tiene una mayor precisión y adecuación, y permite identificar los subproductos de la degradación de los peróxidos y las sustancias formadas de los mismos que se producen durante todo el proceso de fritura (Grompone, 1991).

### ▪ Índice TOTOX

En el cálculo del índice TOTOX se tiene en cuenta los cambios en los valores de peróxido y *p*-anisidina propios del aceite de girasol más los producidos durante los procesos de extracción de compuestos oleosos del polen apícola y durante el almacenamiento. Durante la fase inicial de oxidación de lípidos, los hidroperóxidos pueden aumentar constantemente hasta un máximo y luego comenzar a disminuir. Al mismo tiempo, a medida que los hidroperóxidos reaccionan más, comienzan a formarse aldehídos que afectan la calidad de las grasas y mide el grado de rancidez de los aceites (Irwin & Hedges, 2004).

El valor de oxidación total (TOTOX) es la combinación entre el valor de los índices de peróxido y la *p*-anisidina. El índice de peróxidos representa el potencial de degradación de la calidad sensorial y la *p*-anisidina, muestra el estado de deterioro efectivo y permite tener en cuenta tanto el historial oxidativo del aceite como el potencial de un mayor deterioro (Irwin & Hedges, 2004).

**Tabla 3- 5:** Índice TOTOX de extractos ricos en carotenoides

Región / Época	Occidente		Nororiente		Suroriente	
	Sequía	llovía	Sequía	llovía	Sequía	llovía
<b>C</b>	5,36 ± 0,58 <sup>g, i</sup>	4,89 ± 0,24 <sup>g, h</sup>	3,38 ± 0,14 <sup>c, d</sup>	1,91 ± 0,07 <sup>b</sup>	3,71 ± 0,18 <sup>e, f, i</sup>	4,29 ± 0,17 <sup>f, h</sup>
<b>U</b>	2,47 ± 0,14 <sup>a, b</sup>	2,96 ± 0,12 <sup>a, c</sup>	2,21 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,05 ± 0,07 <sup>a, b, e</sup>	3,93 ± 0,15 <sup>d, f</sup>	3,62 ± 0,24 <sup>c, d, e</sup>
<b>S</b>	1,30 ± 0,07 <sup>i</sup>	1,29 ± 0,26 <sup>i</sup>	0,190 ± 0,068 <sup>j</sup>	0,06 ± 0,04 <sup>k</sup>	1,07 ± 0,36 <sup>i</sup>	1,46 ± 0,18 <sup>i</sup>
<b>Aceite de girasol</b>			0,732 ± 0,025			

Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre las diferentes metodologías de extracción, región o época.

El valor TOTOX osciló entre 0,190 y 5,355 en los extractos analizados (Tabla 3- 5). En general los aceites extraídos por la metodología convencional presentaron los valores más altos, lo que indica un alto grado de oxidación, lo anterior puede deberse a la influencia del oxígeno atmosférico en el desarrollo de la rancidez, en la producción de olores desagradables y en la polimerización de los aceites. Los valores bajos de oxidación total significan un mejor valor nutricional del aceite, que en este caso están representados por los extractos supercríticos con valores que oscilan entre 0,06 y 1,46. A diferencia de los valores de peróxido y *p*-anisidina el valor TOTOX no cuenta con una normatividad específica, sin embargo, valores por debajo de 10 es una característica de los aceites

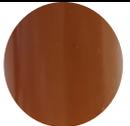
frescos de alta calidad, característica que podría emplearse para todos los extractos analizados.

### 3.4.1 Color

Se obtuvieron las coordenadas CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) de forma automatizada a través de un colorímetro Konica Minolta CR400, el promedio y desviación estándar de los diferentes extractos se muestran en la

Tabla 3- 7.

**Tabla 3- 6:** Color de los diferentes extractos del polen apícola

Región	Occidente		Nororienté		Surorienté	
Época	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia
Convencional						
Ultrasonido						
Supercríticos						

**Tabla 3- 7:** Coordenadas CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) de los extractos oleosos

Región	Occidente		Nororienté		Surorienté		
Época	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	
C	$L^*$	$26,3 \pm 1,7^{a,c}$	$24,9 \pm 0,3^c$	$36,2 \pm 0,2^d$	$36,2 \pm 2,2^d$	$41,9 \pm 2,6$	$33,4 \pm 0,7^{d,f}$
	$a^*$	$5,5 \pm 0,1^{a,b}$	$14,2 \pm 0,6^h$	$24,4 \pm 0,1^{d,e}$	$7,9 \pm 0,7^b$	$25,3 \pm 0,7^e$	$29,5 \pm 1,2^c$
	$b^*$	$17,5 \pm 1,0^{a,e}$	$11,4 \pm 0,3$	$30,3 \pm 0,2^f$	$25,7 \pm 3,2^{b,c}$	$40,2 \pm 6,9^f$	$24,7 \pm 1,4^c$
U	$L^*$	$29,0 \pm 0,9^{a,b}$	$32,1 \pm 1,9^{b,e,f}$	$34,8 \pm 1,6^{d,f}$	$28,3 \pm 1,4^{a,b,c}$	$32,7 \pm 0,1^{b,d}$	$36,2 \pm 0,2^d$
	$a^*$	$4,7 \pm 0,2^a$	$19,5 \pm 1,8^{c,i}$	$21,7 \pm 2,1^{c,f}$	$5,3 \pm 0,4^{a,c}$	$21,9 \pm 0,4^{c,g}$	$32,3 \pm 0,4$
	$b^*$	$19,7 \pm 0,9^{a,b,c}$	$22,8 \pm 2,9^c$	$28,7 \pm 4,0^f$	$16,2 \pm 1,7^{a,d}$	$24,2 \pm 0,6^c$	$30,9 \pm 0,5^f$
S	$L^*$	$47,2 \pm 0,8^g$	$28,7 \pm 0,2^{a,b,c}$	$26,2 \pm 1,7^{a,c}$	$46,0 \pm 1,2^g$	$25,4 \pm 0,1^{a,c}$	$27,8 \pm 0,6^a$
	$a^*$	$23,7 \pm 1,1^d$	$23,2 \pm 0,2^d$	$12,2 \pm 0,6^h$	$22,7 \pm 0,2^{d,e}$	$19,5 \pm 0,1^{f,g,i}$	$20,4 \pm 0,1^{f,g}$
	$b^*$	$47,1 \pm 3,5^f$	$20,3 \pm 0,6^{c,d}$	$19,1 \pm 3,0^{a,c,d}$	$47,6 \pm 1,13^f$	$14,0 \pm 0,3^{d,e}$	$20,4 \pm 0,2^{a,c,d}$

---

Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre cada variable de color y las diferentes regiones y épocas.

La primera impresión que se tiene de los alimentos generalmente es visual y su aceptación depende en mayor o menor medida de su color. La apreciación de esta cualidad puede dar lugar a ideas preconcebidas acerca de otros factores de calidad como son el sabor y el aroma. Al igual que el polen se espera que los extractos oleosos muestren una gama de colores muy diferentes, que pueden ir desde el blanco o amarillo pálido al rojo oscuro o incluso negro (Mateo et al., 1992; Terrab et al., 2004c). El color del polen está relacionado con el origen botánico, el contenido mineral, los métodos utilizados en el procesado industrial y la temperatura y/o tiempo de almacenamiento, de igual manera, estos parámetros afectaron el color en los extractos obtenidos.

El espacio de color CIELAB ( $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ) es ideal porque permite la separación de información cromática y acromática. Además, es un espacio de color uniforme, similar a la percepción visual humana, y también uno de los más utilizados para la alimentación (Salazar-González et al., 2018). En general, todos los extractos presentan diferentes coordenadas de cromaticidad, aunque todos ellos se encuentran en el primer cuadrante, correspondiente a valores de  $a^*$  y  $b^*$  positivos y  $L^*$  superiores a 24, encontrándose las principales diferencias en la coordenada  $L^*$ , el extracto más oscuro se presentó en el extracto convencional en la época e lluvia de occidente, con un  $L^*$  igual a 24,9, mientras que la más luminosa con un  $L^*$  igual a 46,0 fue el extracto por supercríticos en la época de lluvia de Nororiente. Dado que el polen apícola tiene coordenadas colorimétricas en el rango amarillo-naranja, se esperaba que el color en sus extractos oleosos variase de igual manera, se puede observar que todos los valores de  $a^*$  están relacionados con la luminosidad hacia el rojo y análogamente las coordenadas  $b^*$  de las muestras oleosas muestra la desviación hacia el amarillo. Hay que destacar que el valor medio de  $b^*$  es mayor al de  $a^*$ , lo que significa que predomina el componente amarillo sobre el rojo.

Los valores  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  indican que todos los extractos oleosos del polen son amarillos-rojos y ligeramente opacos. No se encontraron valores de color de extractos oleosos de polen apícola, sin embargo, al compararlo con muestras de polen, Navarro Montero (2014) reportó un color de polen similares en valores  $L^*$  menores a 50, pero menos amarillos y ligeramente menos rojos que los encontrados. No obstante, ningún polen ni aceite puede coincidir por completo con las 6 características de color descritas debido a que provienen

de diferentes especies vegetales por lo que varía de un lugar a otro. No existe una correlación entre las metodologías de extracción, las épocas ni las regiones de los extractos oleosos.

A partir de los parámetros colorimétricos  $a^*$  y  $b^*$  se determinaron los parámetros psicométricos, croma ( $C^*_{ab}$ ), tono ( $H^*_{ab}$ ) (Tabla 3- 8).  $C^*_{ab}$  permite fijar para cada tono su grado de diferencia en comparación con un color gris de la misma luminosidad y se relaciona con el atributo cuantitativo de tono.  $H^*_{ab}$  es el atributo por el cual los colores han sido tradicionalmente definidos como rojizos, verdosos, etc. (Meléndez-Martínez, 2017).

**Tabla 3- 8:** Croma y Tono de los extractos oleosos de polen

Región		Occidente		Nororiente		Suroriente	
Época		Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia
C	$C^*_{ab}$	18,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	26,9 ± 3,3 <sup>b</sup>	47,6 ± 5,7 <sup>d</sup>	38,5 ± 1,8 <sup>c,e</sup>	18,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	38,9 ± 0,2 <sup>c,e</sup>
	$H^*_{ab}$	72,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	72,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	57,5 ± 4,5 <sup>d</sup>	40,0 ± 0,5 <sup>c</sup>	38,9 ± 0,5 <sup>c</sup>	51,2 ± 0,1 <sup>b</sup>
U	$C^*_{ab}$	20,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	17,1 ± 1,7 <sup>a</sup>	32,7 ± 0,6 <sup>b,c</sup>	44,7 ± 0,6 <sup>d,e</sup>	30,0 ± 3,3 <sup>b,c</sup>	36,0 ± 4,4 <sup>c</sup>
	$H^*_{ab}$	76,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	72,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	47,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	43,7 ± 0,2 <sup>e</sup>	49,4 ± 1,0 <sup>b</sup>	52,9 ± 1,2 <sup>b</sup>
S	$C^*_{ab}$	52,8 ± 2,7 <sup>d</sup>	52,7 ± 1,1 <sup>d</sup>	24,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	28,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	30,8 ± 0,5 <sup>b,c</sup>	22,7 ± 2,2 <sup>a</sup>
	$H^*_{ab}$	63,2 ± 2,8 <sup>f</sup>	64,5 ± 0,4 <sup>f</sup>	35,7 ± 0,8 <sup>c</sup>	45,0 ± 0,3 <sup>e</sup>	41,2 ± 0,6 <sup>e</sup>	57,1 ± 5,3 <sup>d</sup>

C=convencional, U=ultrasonido, S=supercríticos. Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre cada variable de color y las diferentes regiones y épocas.

Los valores de  $C^*_{ab}$  y  $H^*_{ab}$  del extracto por ultrasonido en la época de lluvia del Nororiente indican que posee el color del más naranja entre los extractos. los mayores valores en el tono ( $H^*_{ab}$ ) lo tienen todos los extractos del Occidente, por lo que muestra que estos tienen coloración amarilla. Los extractos supercríticos de Occidente son los tienen el mayor valor de  $C^*_{ab}$ , por lo que son los extractos con el color más vivo de todos los amarillos. En general, se detectó una gran dispersión en los valores, debido a la gran variación de color presentada por las muestras iniciales de polen apícola, encontrando extractos claros (ángulo de tono elevado) y otros más oscuros (ángulo de tono bajo).

La medida instrumental del color de los alimentos es importante ya que representan características interesantes tanto para el control de calidad, como para la estimación del contenido de pigmentos. Por ejemplo, para determinar el contenido de carotenoides de una muestra por medio del análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

requiere al menos dos horas de trabajo, ya que estos deben pasar por procesos de extracción, saponificación y análisis. Además, cada una de estas operaciones pueden acarrear la degradación de los carotenoides (Meléndez-Martínez, 2017). Por el contrario, al realizar medidas de color se podría obtener una estimación, aunque menos precisa, pero de forma casi inmediata del contenido de carotenoides de una muestra, por tal motivo se evaluó la correlación entre los componentes principales de los parámetros de color y el contenido de carotenoides totales de las muestras de los extractos oleosas del polen apícola, a través de los coeficientes de correlación y los correspondientes valores  $p$ .

Antes de verificar las correlaciones se ejecutó un análisis de componentes principales. El propósito del análisis fue obtener un número reducido de combinaciones lineales de las 5 variables de color que expliquen la mayor variabilidad en los datos. En este caso, 2 componentes se han extraído puesto que 2 componentes tuvieron eigenvalores mayores o iguales que 1,0. En conjunto ellos explican 98,5693% de la variabilidad en los datos originales.

Con los valores de los componentes principales de cada muestra se realizó la evaluación de la correlación con el contenido de carotenoides totales. En la Tabla 3- 9 se muestran las correlaciones momento producto de Pearson, entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. El segundo número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas.

**Tabla 3- 9:** Correlaciones entre los componentes principales del color y los carotenoides totales de las muestras oleosas del polen

	PCOMP_1	PCOMP_2	Carotenoides totales
PCOMP_1		0,0000	0,0125
		1,0000	0,9283
PCOMP_2	0,0000		-0,4111
	1,0000		0,0020
Carotenoides totales	0,0125	-0,4111	
	0,9283	0,0020	

Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. En este caso el par de variables que tienen valores-P por debajo de 0,05 fueron PCOMP\_2 y el contenido de carotenoides totales. Lo anterior

concuera por lo reportado por Salazar-González et al., (2020) quien desarrolló una metodología para la estimación de carotenoides a partir de parámetros de color de imágenes digitales en muestras de polen apícola. Esta metodología permite la identificación rápida de carotenoides en muestras de polen apícola; sin embargo, podrían usarse otras técnicas ópticas, como espectros infrarrojos y regiones de recolección, para mejorar la correlación en más compuestos.

### 3.4.2 Carotenoides totales

A los extractos oleosos de polen apícola obtenidos por extracción convencional, ultrasonido y supercríticos se les determino el contenido de carotenoides totales por espectrofotometría y se muestran a continuación:

**Tabla 3- 10:** Carotenoides totales en los extractos oleosos de polen apícola expresado como mg  $\beta$ -caroteno/ kg aceite

Extracción	NO		O		SO	
	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia
<b>C</b>	423,7 $\pm$ 6,8 <sup>b</sup>	853,9 $\pm$ 2,4 <sup>d, e</sup>	117,1 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	128,6 $\pm$ 4,8 <sup>a</sup>	480,0 $\pm$ 1,2 <sup>b, c</sup>	578,8 $\pm$ 9,6 <sup>b, c, d</sup>
<b>U</b>	429,7 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>	1089,8 $\pm$ 7,1 <sup>e</sup>	126,3 $\pm$ 21,2 <sup>a</sup>	112,2 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	517,2 $\pm$ 10,8 <sup>b, c</sup>	659,9 $\pm$ 12,3 <sup>c, d</sup>
<b>S</b>	5406,0 $\pm$ 21,5 <sup>f</sup>	9362,2 $\pm$ 98,0 <sup>g</sup>	3749,5 $\pm$ 21,1 <sup>h</sup>	2668,6 $\pm$ 31,4 <sup>i</sup>	6259,0 $\pm$ 56,8 <sup>j</sup>	6990,1 $\pm$ 63,6 <sup>k</sup>

Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre las concentraciones de las diferentes regiones y épocas.

Como era de esperar, a mayores contenidos de carotenoides en el polen mayor concentración de carotenoides en los extractos. Los mayores contenidos de carotenoides se presentaron en la extracción con supercríticos, seguido por ultrasonido y por último la extracción convencional. El contenido de carotenoides en los extractos supercríticos reportados en este trabajo variaron de 2,7-9,4 g/kg de aceite, los cuales concuerdan con lo reportado por Xu et al., (2011) quienes estudiaron el extracto supercrítico de polen apícola monofloral de loto (6,0-8,7 g/kg aceite). Comparado con el contenido de carotenoides de los extractos supercríticos, el contenido es alrededor de 10 veces más que el extracto convencional. La tendencia que se había observado de mayores contenidos en la época de lluvia en el polen apícola y en los extractos convencionales no se mantuvo, en este caso la muestra de Occidente presento un mayor contenido en la época seca, tanto en la extracción supercrítica como en la de ultrasonido, aunque en este último no se

presentaron diferencias significativas entre las épocas ni con la extracción convencional. En las muestras Nororiente y Suroriente si se mantuvo la tendencia de mayores contenidos en la época de lluvia en todas las extracciones.

Los mayores contenidos presentes en la metodología de extracción por ultrasonido respecto a la convencional pueden deberse a que los lípidos que se encuentran principalmente en las paredes del polen (Zuluaga, 2015) pueden liberarse después de la ruptura de la pared. Un estudio realizado por Wu et al., (2019) mostro que el ultrasonido puede aplastar eficazmente las paredes de polen (capa de polen, exina, intina y citoplasma). Después de que las muestras de polen apícola se trataron con ultrasonido, la exina y la intina de las paredes del polen se rompieron por completo en fragmentos con tamaños de partícula más pequeños y valores de superficie específica más altos que los de la muestra de polen sin tratar. Los hallazgos de este estudio parecen confirmar que la pared de polen impide la liberación y absorción de los nutrientes del polen.

En el estudio realizado por (Salazar et al., 2019) el contenido obtenido para pólenes del altiplano cundiboyacense por extracción convencional fue de  $968,8 \pm 4,2$  mg  $\beta$ -caroteno/kg aceite, valor comparable con los obtenidos en la muestra Nororiente en la época de lluvia por los dos métodos de extracción, las diferencias se deben principalmente a los contenidos de carotenoides iniciales de cada uno de los pólenes.

### **3.4.3 Perfil de ácidos grasos**

El perfil de ácidos grasos fue analizado para los extractos oleosos del polen con el mayor contenido de carotenoides totales, en este caso fue la muestra NO en época de lluvia, los resultados se muestran en la Tabla 3- 11.

Se encontró que en la extracción convencional y por ultrasonido el ácido linoleico [C18:2n-6c] fue el ácido graso más importante, seguido por el ácido oleico [C18:1n9c], palmítico [C16:0] y esteárico [C18:0]. En la extracción por supercríticos el ácido graso más abundante fue el  $\alpha$ -linolénico [C18:3n-3] seguido por el ácido linoleico [C18:2n-6c], estos ácidos grasos esenciales ofrecen importantes beneficios para la salud y la nutrición, como la protección contra enfermedades cardiovasculares (Guillén et al., 2003); en la prevención de la artritis, cáncer, enfermedades coronarias, diabetes, entre otros (Gogus y Smith, 2010; Hanssen et al., 2011). El alto contenido de  $\alpha$ -linolénico encontrado en el extracto

supercrítico es un aspecto relevante desde el punto de vista nutricional, debido a la escasez de fuentes alimentarias del mismo. Sin embargo, se debe tener precaución con el calentamiento y almacenamiento del extracto para conservar la configuración cis del  $\alpha$ -linolénico (Barajas Gómez et al., 2016).

**Tabla 3- 11:** Perfil de ácidos grasos de los extractos convencionales, ultrasonido y supercríticos de la muestra NO en la época de lluvia.

<b>% Ácidos Grasos Polen Apícola</b>			
<b>FAMES</b>	<b>Nororiente (lluvia)</b>		
	<b>C</b>	<b>U</b>	<b>S</b>
<b>C6:0</b>	0,0	0,0	0,4
<b>C8:0</b>	0,0	0,0	0,7
<b>C10:0</b>	0,0	0,0	0,0
<b>C12:0</b>	0,1	0,1	1,5
<b>C14:0</b>	0,1	0,1	0,6
<b>C16:0</b>	5,8	5,7	13,7
<b>C16:1</b>	0,1	0,1	0,1
<b>C17:0</b>	0,0	0,0	1,1
<b>C17:1</b>	0,0	0,0	0,9
<b>C18:0</b>	4,1	3,8	1,5
<b>C18:1n-9c</b>	32,2	34,3	11,2
<b>C18:1n-9T</b>	0,5	0,5	1,3
<b>C18:2n-6c</b>	54,6	52,7	24,0
<b>C18:2n-6T</b>	0,2	0,2	0,6
<b>C18:3n-6</b>	0,0	0,0	0,7
<b>C18:3n-3</b>	1,5	1,0	30,7
<b>C20:0</b>	0,3	0,3	0,8
<b>C20:1n-9</b>	0,1	0,1	0,4
<b>C20:2n-6</b>	0,0	0,0	0,4
<b>C20:3n-6</b>	0,0	0,0	0,6
<b>C20:3n-3</b>	0,0	0,0	0,4
<b>C22:0</b>	0,1	0,7	1,2
<b>C22:2</b>	0,0	0,0	5,5
<b>C23:0</b>	0,1	0,1	0,6
<b>C24:0</b>	0,2	0,2	0,9
<b>C24:1n-9</b>	0,0	0,0	0,0
<b>TOTAL</b>	100	100	100
<b>SFAS (%)</b>	10,9	11,0	23,7
<b>MUFAS (%)</b>	32,9	35,0	14,3
<b>PUFAS (%)</b>	56,3	54,0	64,6
<b>n-3 (%)</b>	1,5	1,0	31,9

<b>n-6(%)</b>	54,8	52,9	27,0
<b>n-6/n-3</b>	36,2	50,8	0,8

C=convencional, U=ultrasonido, S=supercrítico. PUFAS: Ácidos grasos poliinsaturados, MUFAS: Ácidos grasos monoinsaturados, SFAS: Ácidos grasos saturados, n-3: Ácidos grasos Omega 3, n-6: Ácidos grasos Omega 6, n6/n-3: Relación omega3 – omega6.

El aceite de girasol usado en la extracción convencional y por ultrasonido se caracteriza por tener más del 60% de ácidos grasos monoinsaturados, cerca de 30% de ácidos grasos poliinsaturados y aproximadamente el 10% de ácidos grasos saturados. El ácido graso saturado presente en mayor proporción es el palmítico [C16:0] seguido del esteárico [C18:0], los demás ácidos grasos saturados están ausentes en el girasol o máximo llegan a representar el 1%. En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados, el mayor representante es el ácido oleico [C18:1n9c] el cual es el más abundante dentro de los aceites vegetales. El mayor aporte de ácidos grasos polinsaturados del aceite de girasol proviene del ácido linoleico [C18:2n6c] (Ramírez Botero et al., 2014). De lo anterior, podemos observar que los mayores contenidos del ácido linoleico [C18:2n6c] en la extracción convencional y por ultrasonido se pueden deber principalmente a los aportes del aceite de girasol usado como solvente; ya que como se puede observar, este ácido graso no es el más abundante ni en el polen apícola ni en el extracto supercrítico.

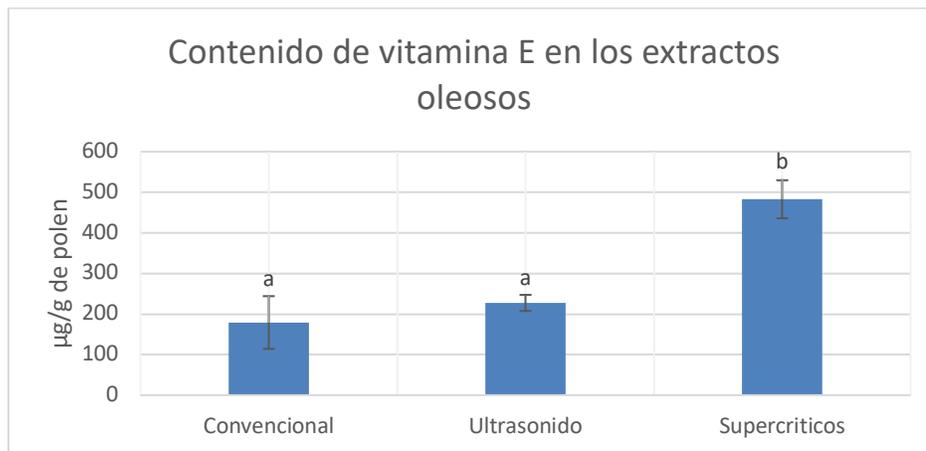
También se puede observar que se presentó la degradación del ácido  $\alpha$ -linolénico [C18:3n-3] durante el proceso de extracción. Se sabe que durante el calentamiento y exposición al oxígeno los ácidos grasos más insaturados son los primeros en sufrir cambios, lo cual conlleva a la modificación de su perfil de ácidos grasos, a temperaturas de 30°C Barajas Gómez et al., (2016), reportaron que se presentan pérdidas de aproximadamente la mitad del ácido linoleico [C18:2n6c] y ácido oleico [C18:1n9c]; lo anterior explicaría los bajos contenidos del ácido  $\alpha$ -linolénico [C18:3n-3] en el extracto convencional y por ultrasonido.

El equilibrio entre los ácidos grasos n-6 y n-3 es una consideración importante que influye entre otras cosas en la salud cardiovascular, como se puede observar estas relaciones en el extracto convencional y por ultrasonido están muy por encima de la proporción original 1:1 que tenían los seres humanos en el pasado (Simopoulos, 2010). Actualmente, no hay evidencia de que los ácidos grasos n-6 afecten negativamente la salud. Por el contrario, parecen estar directamente asociados con estados antiinflamatorios, al igual que los

ácidos grasos n-3 (Djuricic & Calder, 2021; FAO, 2010; Gómez Candela et al., 2011; Stanley et al., 2007).

### 3.4.4 Contenido de vitamina E

El contenido de  $\alpha$ -tocoferol se determinó en los extractos oleosos con los mayores contenidos de carotenoides, en cada tipo de extracción se seleccionó la zona de Nororienté en la época de lluvia, los resultados se muestran en la Figura 3- 7.



**Figura 3- 7:** Contenido de vitamina E en los extractos oleosos

Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre las concentraciones de las diferentes metodologías de extracción.

La determinación del contenido de vitamina E en los aceites es necesario, dado que estos constituyen una de las principales fuentes de aporte de vitamina E a través de la dieta. La literatura reporta que el aceite de girasol comercializado en Colombia puede contener alrededor de 134-562 ppm de  $\alpha$ -tocoferol (Ramírez Botero et al., 2014), por lo que en la extracción convencional y por ultrasonido se podría pensar que la extracción no fue exitosa, o la exposición a factores como la luz, el oxígeno y la temperatura fueron responsables de su degradación. Adicionalmente, también se debe tener en cuenta que algunos estudios han demostrado que el almacenamiento de aceite de cocina que se empaca en botellas transparente de PET y expuestas a la luz fluorescente y almacenamiento a 22 ° C durante dos meses pueden perder aproximadamente el 60% de los tocoferoles (Pignitter M, 2014), por lo cual no se podría afirmar el origen del  $\alpha$ -tocoferol

en estos extractos. A pesar de ello los extractos se pueden seguir considerando como ricos en vitamina E.

### 3.4.5 Microscopía electrónica de barrido

La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se utiliza para la observación tridimensional de imágenes de alta resolución, análisis de superficie a altas magnificaciones de materiales orgánicos e inorgánicos suministrando una amplia información de relieve, micro-textura, tamaño y forma de grano.

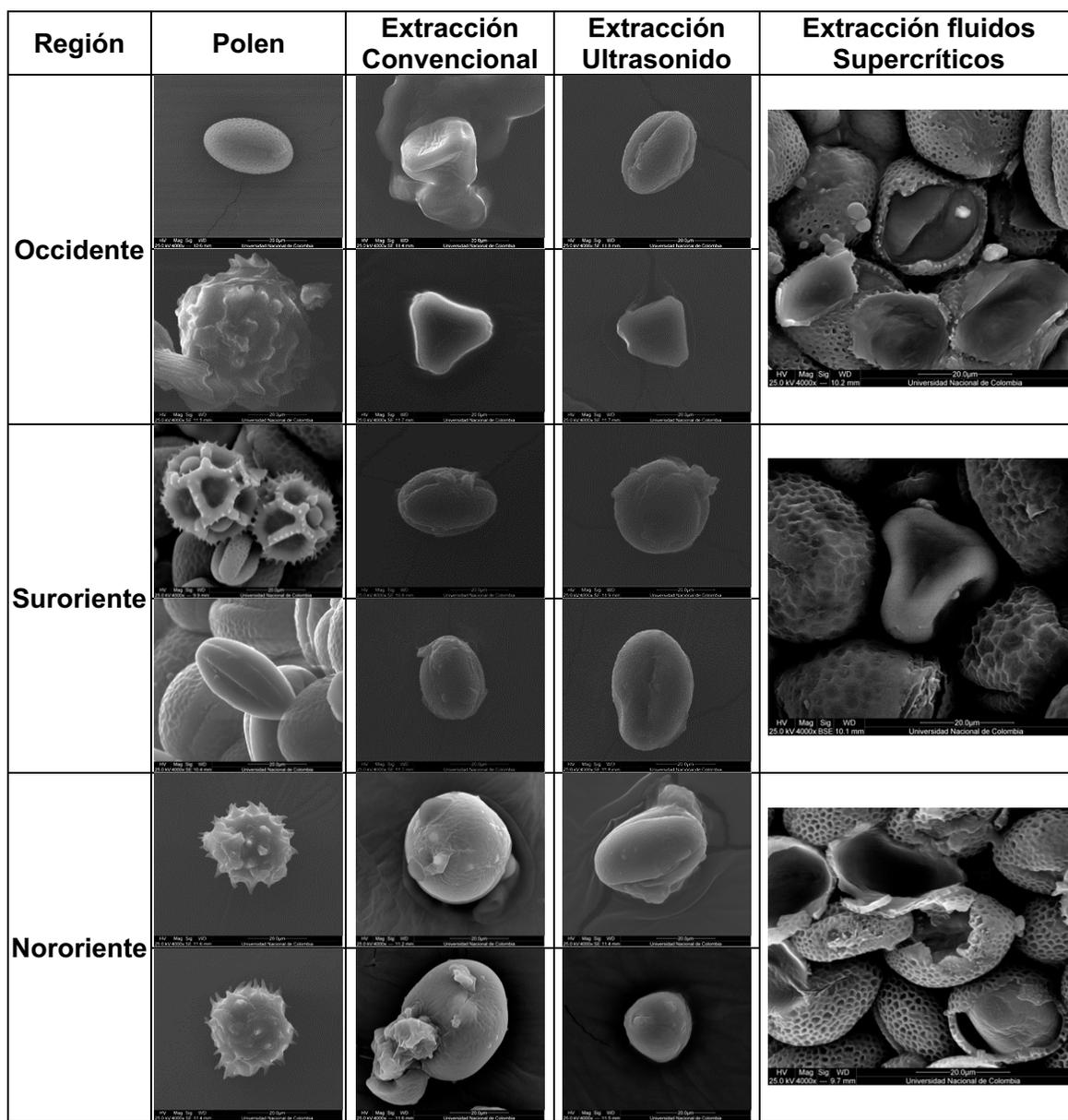


Figura 3- 8: Microscopía electrónica de barrido.

En la Figura 3- 8 (aumento x 4000) se muestra la fotografía con microscopía electrónica de barrido SEM del estado inicial del polen apícola y después de las extracciones. En esta figura se aprecia, que el polen tiene una estructura granular definida, determinada para cada especie botánica, por lo que es posible identificar su origen palinológico a través del microscopio, algunas de estas especies son comunes a las tres zonas, tales como: *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) (forma triangular), *Trifolium repens* (Fabaceae - Faboideae) (forma de “grano de café”), *Taraxacum officinale* (Asteraceae) (forma de “dodecaedro con picos”), *Austroeupatorium inulifolium* (Asteraceae) (forma redonda con picos). Además, se pueden observar las diferencias estructurales; en particular es posible observar cómo en el polen la estructura de los granos está más conservada que después de las extracciones. Sin embargo, en algunos casos se puede llegar a apreciar algunas modificaciones en la superficie del polen apícola inicial, probablemente debido a la difusión del agua del interior al exterior del grano, lo cual se puede presentar por el tratamiento térmico usado durante el secado de las muestras. Luego de las extracciones el polen sufre cambios estructurales notables siendo los más drásticos los efectuados por la extracción por supercríticos, seguidos por ultrasonido y con los menores cambios en la extracción convencional.

En la extracción convencional se puede observar una ligera degradación de la capa externa “exina”. La estructura de los granos de polen después de la extracción es menos definida que en el polen sin extraer y es posible observar cómo una especie de capa, probablemente conformada por azúcares simples (Fuenmayor, 2009), recubre los granos de polen. Por lo anteriormente, se puede confirmar la resistencia de la capa externa del grano de polen reportada en la literatura por diversos autores y explica los menores contenidos de carotenoides en este extracto.

En la extracción por ultrasonido se puede observar la hinchazón de algunos de los granos, en algunos casos se puede observar como el contenido interno del polen es expuesto al exterior, mostrando como este proceso altera la estructura original provocando una pérdida de su forma característica., uno de los principales cambios es la ‘explosión’ de algunos tipos de granos de polen con el rompimiento de la exina, proceso en el cual parece liberarse el contenido interno del grano de polen que es protegido por la intina (Fuenmayor, 2009).

En la extracción por supercríticos se observa que se altera de forma aún más notable la estructura del polen, se forman grietas y orificios, cuyo diámetro es mayor que los formados

---

en la extracción convencional y por ultrasonido, y a través de los cuales queda expuesto el contenido interno del grano de polen. Lo cual es un aspecto positivo ya que facilita la extracción y posterior aprovechamiento de los nutrientes del polen.

### 3.1 Conclusiones parciales

La metodología de superficie de respuesta fue útil para seleccionar la combinación de tiempo y amplitud (14 minutos y 34% de amplitud) que permitiera obtener el mayor contenido de carotenoides totales en los extractos oleosos obtenidos por la metodología de extracción por ultrasonido.

El uso de una cinética de segundo orden de extracción sólido-líquido en la metodología de extracción convencional permitió determinar el tiempo necesario para obtener los extractos con el mayor contenido de carotenoides totales, el cual quedó establecido en 8 días.

Los extractos oleosos obtenidos por las tres metodologías de extracción cumplieron con la normatividad establecida para los valores de peróxido,  $\rho$ -anisidina y TOTOX, indicando que estos son aptos para consumo humano. Comparado con el contenido de carotenoides de los extractos supercríticos, el contenido es alrededor de 10 veces mayor que en el extracto convencional y por ultrasonido, además, este resalta por su contenido en el ácido  $\alpha$ -linolénico [C18:3n-3] y vitamina E. Debido a su alto contenido en compuestos bioactivos, los productos con inclusión del extracto supercrítico del polen serían un ingrediente útil para formular nuevos alimentos con características funcionales.

Las imágenes por microscopía electrónica de barrido realizadas sobre el polen antes y después de las extracciones mostraron una modificación estructural en la capa externa del grano, lo cual podría indicar que las extracciones indujeron cambios que favorecieron la extracción de compuestos nutricionales y bioactivos. Las mayores afectaciones sobre la estructura del polen se presentaron, como era de esperarse, en los extractos supercríticos seguido de la extracción por ultrasonido y en menor medida en la extracción convencional.

## 4. Perfil de carotenoides

Para la determinación del perfil de carotenoides de las muestras de polen apícola y de los extractos oleosos fue necesario adaptar de la literatura una metodología que permitió el tratamiento e inyección de las muestras en el cromatógrafo líquido. Por lo que en esta sección se describirán las etapas para el pretratamiento de muestras, el acondicionamiento del equipo y el resultado del análisis de los cromatogramas obtenidos de los perfiles de carotenoides.

### 4.1 Fundamento teórico

#### 4.1.1 HPLC

La cromatografía líquida de alto desempeño o alta eficacia es una técnica de separación donde por medio de una bomba se hace circular un líquido con los analitos de interés en solución (fase móvil) a través de una columna que contiene la fase estacionaria. La fase móvil debe ser compatible con el método de detección y los analitos deben ser solubles en ella. La separación se debe a la interacción de los diferentes analitos con la fase estacionaria, una mayor interacción provocará mayores tiempos de retención que permitirá la separación. (Hernández, 2005). La identificación y cuantificación de los analitos se realiza gracias al acople del sistema cromatográfico con un sistema de detección adecuado a la naturaleza química de estos. Este sistema de detección debe permitir la medición de una propiedad física o fisicoquímica que indique la presencia de los analitos a medida que eluyen (o salen de la fase estacionaria) y que tenga una proporcionalidad con su concentración de manera que permita su cuantificación.

En la cromatografía en fase reversa se combina una fase móvil polar y una fase estacionaria no polar como hidrocarburos de cadena larga unidos a un soporte de sílice o híbrido. Se considera la técnica de separación más utilizada en los laboratorios, principalmente por tener una fase hidrofóbica aplicable a un amplio rango de moléculas y por la posibilidad de usar agua en la composición de la fase móvil. Dentro de esta modalidad y para el análisis de carotenoides y vitamina E, se utiliza comúnmente columnas C<sub>18</sub> y C<sub>30</sub>, es decir, con hidrocarburos de 18 y 30 carbonos (Davies & Boley, 1984).

---

El procedimiento general para la separación y cuantificación de los carotenoides y vitamina E dependerá del origen de estos, ya que variará en función de la distribución de estos en la matriz, por ejemplo, será distinto si provienen de muestras complejas como granos de polen o de muestras homogéneas, como aceites o extractos oleosos. En general el procedimiento cromatográfico consta de tres etapas:

- Preparación de la muestra
- Separación cromatografía
- Identificación y cuantificación

La preparación de la muestra es el proceso que más tiempo requiere en un análisis cromatográfico, cerca del 61% del tiempo es dedicado a este proceso y es una de las etapas más decisivas en los métodos de análisis cuando se quiere separar microcomponentes. Asimismo, se estima que esta es la etapa que genera una tercera parte de los errores que se producen durante el análisis (ChromNews, 2019). El buen desarrollo de este proceso permite obtener unos resultados cromatográficos fiables ya que retira de la muestra los componentes que puedan causar interferencia en la detección de los analitos y que pueden bloquear la columna, además permite enriquecer los analitos en las muestras y mejorar la detección (ChromNews, 2019). Por otro lado, debido a la gran diversidad de polaridades que presentan los carotenoides, no existe un método estándar para la extracción de estos (Meléndez-Martínez, 2017) y por lo tanto deben adaptarse metodologías en función del perfil de carotenoides esperados en las muestras.

La presencia de contaminantes en la muestra puede provocar que algunos instrumentos internos se obstruyan, lo cual generaría problemas como: aumentos de presión debido a la obstrucción en la cabeza de la columna, filtros internos además de desgaste de la columna cromatográfica. Esto conlleva a largos tiempos de limpieza del sistema cromatográfico, costo en reemplazo de piezas y la columna. Además, se pueden presentar problemas en la detección de analitos, aumentando el ruido de la línea base y reduciendo la sensibilidad lo cual dificultara la identificación de los analitos. La selección de los métodos de preparación de la muestra depende de las características de los analitos y de la matriz en la que se encuentran, algunos factores que pueden afectar son: (Quattrocchi et al., 1992)

- Propiedades físicas y químicas: es necesario conocer la estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedad ácido base (pKa)

- Concentración del analito en la muestra: cuando el analito se encuentra en concentraciones altas, la preparación requerida puede ser tan sencilla como solubilización y filtración, pero los analitos en bajas concentraciones, por el contrario, necesitan operaciones más complejas para aumentar la concentración a rangos aceptables para inyectarse en el cromatógrafo.
- Naturaleza de la matriz: no solo es necesaria la remoción de componentes presentes debido a la posible obstrucción de los instrumentos, sino también, porque estos pueden interferir en la identificación de los analitos, ya que pueden coeluir y generar un aumento en la concentración o evitar la detección de ellos.
- Formas en las que se presenta el analito en la muestra: algunos componentes presentes en la muestra pueden dañar irreversiblemente los instrumentos del equipo y pueden evitar una correcta separación e identificación del analito.
- Compatibilidad de los medios de solubilización con el sistema cromatográfico: en la cromatografía líquida es necesario que la solución a inyectar sea soluble con la fase móvil y de ser posible se recomiendan que sean la misma para así evitar posibles problemas. Si se utilizan solventes fuertes, es posible que al entrar en contacto con la fase acuosa se presente precipitación, causando daños en la columna y disminución en la resolución.

La mayoría de los procesos de extracción de carotenoides constan de tres pasos:

1. Trituración o rotura de las muestras; aumenta la superficie de contacto lo cual facilita la liberación de los carotenoides durante la extracción.
2. Homogeneización en presencia del disolvente de extracción, (homogeneizadores, agitadores mecánicos o mortero y pistilo), debe controlarse que la temperatura para evitar la degradación de los carotenoides.
3. Extracción. En general los procesos de trituración, homogeneización y extracción se hacen de manera simultánea.

La extracción debe realizarse en el menor tiempo posible para evitar la degradación de los carotenoides o transformaciones indeseadas, sin embargo, el tiempo de contacto entre el disolvente y los carotenoides debe ser el suficiente para asegurar la completa extracción. Para evitar las oxidaciones, se suele añadir antioxidantes como pirogalol, ascorbato de sodio, BHT o palmitato de ascorbilo. Además, se pueden añadir bases débiles como

---

carbonato de calcio, carbonato de magnesio o bicarbonato de sodio al medio de extracción para neutralizar los ácidos liberados (Hart y Scott, 1995; Meléndez-Martínez, 2017).

### **4.1.2 Saponificación**

Los carotenoides con grupos oxigenados, es decir las xantofilas, pueden encontrarse en la matriz esterificados con ácidos orgánicos, usualmente ácidos grasos de cadena variable. Por este motivo, después de la extracción de la matriz, los carotenoides pueden o no estar en forma libre o no esterificada. Los carotenoides extraídos pueden haber sido enmascarados por otros componentes de la matriz subextraídos como clorofila, lípidos, ácidos grasos y ésteres. Los cromatogramas de los carotenoides esterificados con lípidos no siempre son fáciles de interpretar ya que los picos cromatográficos son escasamente resueltos. Al saponificar, se gana resolución, pero se pierde información del estado nativo de los carotenoides en la muestra. Antes de saponificar, los  $n$  ésteres de una misma xantofila darían lugar a  $n$  picos cromatográficos, mientras que tras la saponificación sólo darían lugar a uno (Nagarajan et al., 2017).

El proceso de saponificación se puede realizar directamente durante la homogeneización de la muestra antes o incluso después de la extracción. Durante esta etapa, se agrega un solvente como hidróxido de sodio o potasio metanólico y se agita. En esta etapa es recomendable seleccionar el disolvente no polar con más afinidad por los carotenoides que resultan de la saponificación y evitar la formación de emulsiones, difíciles de romper. Cuando la muestra contiene principalmente carotenos, se logran buenas recuperaciones al añadir hexano o éter de petróleo, o bien una mezcla de éter dietílico:hexano (Meléndez-Martínez, 2017).

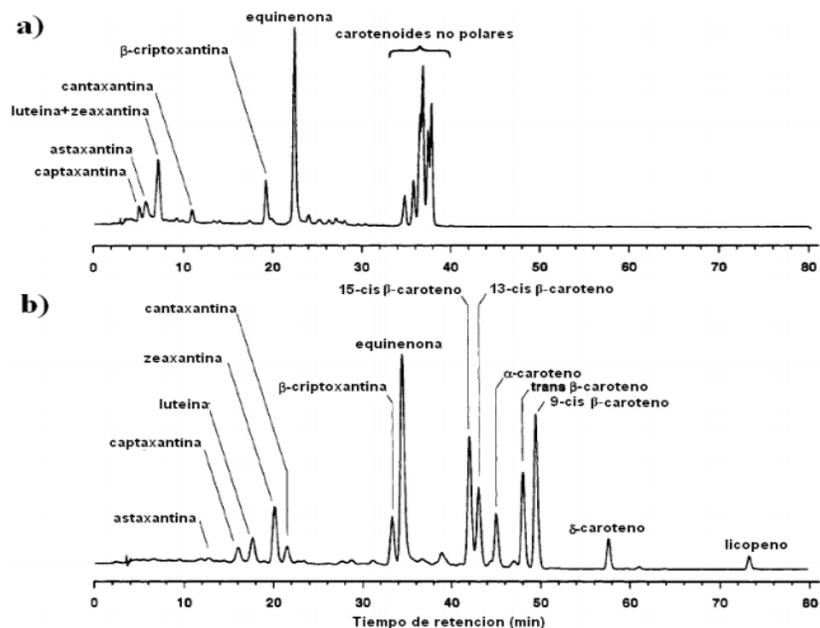
### **4.1.3 Separación cromatográfica**

La columna cromatográfica es el instrumento fundamental en la separación, por lo que una mala elección no permitirá obtener buenos resultados, aunque se cuenten con buenos instrumentos. Las columnas son tubos cilíndricos en el que se encuentra fija la fase estacionaria, estas son partículas rígidas o semirrígidas que suelen ser de sílice, pero se pueden encontrar de polímeros sintéticos. La selección del relleno del sistema cromatográfico depende de la naturaleza de los analitos a analizar, la fase estacionaria se

puede elegir de una gran variedad que dependerá del grupo funcional que se liga químicamente al soporte (Ramkumar, 2005).

En general se puede observar el uso de dos diferentes tipos de columnas en la separación de carotenoides de matrices alimentarias, la  $C_{18}$  y  $C_{30}$ , sin embargo, se han registrado ventajas de la  $C_{30}$ . La  $C_{18}$  no tiene buena separación de los isómeros geométricos (cis-trans) y entre los carotenoides luteína y zeaxantina apolar (Sander, L. C.; Sharpless, K. E.; Craft, N. E.; Wise, 1994). Mientras que la columna  $C_{30}$  (polimérico) tiene la capacidad de separar más isómeros, y es la única columna capaz de separar isómeros de carotenoides no simétricos, tales como 13- cis, 13'- cis, 9- cis y 9'- cis –luteína. (Nunes & Mercadante, 2006). En la Figura 4- 1 se presentan los cromatogramas de una mezcla de patrones de carotenoides donde se observa que en la fase  $C_{30}$  se obtiene una mejor separación y se pueden diferenciar los compuestos de menor polaridad, lo cual no es posible con el uso de una columna  $C_{18}$ . Los dos cromatogramas se realizaron bajo las mismas condiciones, fase móvil: metanol: éter ter-butílmético: agua, gradiente de elución: 81:15:4 hasta 6:90:4 a los 90 minutos, con un flujo de 1 mL/min a 20°C (González Cárdenas, 2010).

El tiempo total de análisis suele ser más largo con columnas  $C_{30}$  en comparación con la  $C_{18}$ . El orden de elución de los carotenoides generalmente aumenta con el aumento de la conjugación de cromóforos y la apolaridad de las partes; además, las unidades terminales también influyen en el orden de elución, por ejemplo, los carotenoides de la misma polaridad que llevan anillos  $\beta$ ,  $\epsilon$ -terminales eluyen antes que los carotenoides  $\beta$ ,  $\beta$  y bicíclicos eluyen antes que los monocíclicos y acíclicos que tienen el mismo cromóforo. Además, los isómeros cissituados centralmente (15-cis-, 13-cis-) eluyen antes de los isómeros all-trans, mientras que los no centrales 9Z-, y 5Z-isómeros eluye después de los all-trans-ones; Curiosamente, se han atribuido diferentes propiedades (como, por ejemplo, la biodisponibilidad) a los isómeros cis en comparación con los trans (Giuffrida et al., 2020).



**Figura 4- 1:** Separación de carotenoides en columna a) C<sub>18</sub> b) C<sub>30</sub>. Fuente: (González Cárdenas, 2010)

Debido a la mejor separación se ha preferido el uso de las columnas C30 y han sido catalogadas como específicas para el análisis de carotenoides, la empresa YMC cuenta con una columna específica para la separación de los isómeros geométricos de carotenoides polares y no polares, con las siguientes especificaciones:

**Tabla 1-6:** Especificaciones de columna YMC carotenoids (Ymc, n.d.)

Columna	YMC carotenoides
Fase	reversa
Empaque	Sílice C30
Tamaño de partícula	5 $\mu\text{m}$
Longitud	250x4.6 mm
Fase móvil	Solventes orgánicos como: acetona, metanol y THF
pH	2.0-7.5
Presión	<25 MPa
Temperatura	20-40°C
Filtración de la muestra	0,2 $\mu\text{m}$

#### 4.1.4 Identificación de carotenoides

En la identificación de carotenoides el detector de matriz de diodos (PAD) y la espectrometría de masas APCI se posicionan como las dos principales y las más usadas en la actualidad (López-Casero, 2019).

- **Detector de matriz de diodos (PDA)**

Una de las características más importante de los carotenoides es el espectro de absorción UV/visible. El cual junto con el comportamiento cromatográfico proporcionan las primeras pistas para la identificación de carotenoides. La mayoría de los carotenoides absorben al máximo en tres longitudes de onda, lo que da como resultado un espectro de tres picos (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

El detector PDA es el más ampliamente usado, se usa para la detección de compuestos con grupos funcionales cromóforos como vitaminas, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, pigmentos de distinta índole, etc. El detector PDA es una variación de los detectores de la región ultravioleta que permite conocer el espectro de UV/Vis en cualquier instante del cromatograma (López-Casero, 2019).

- **Espectrometría de masas acoplada a HPLC**

La espectrometría de masas (MS) acoplados al HPLC, permite conocer la masa, composición y las características estructurales de los carotenoides. Esta técnica de detección requiere la ionización de los analitos, que se separan dependiendo de su masa. En esta unión entre HPLC y espectrometría de masas, surgen distintas modalidades como:

- Ionización química a presión atmosférica (APCI), actualmente es la más adecuada para el estudio de carotenoides liposolubles ya que permite la ionización de compuestos no polares (López-Casero, 2019).

- MALDI-TOF (desorción/ionización por láser) permite el análisis directo de muestras, sin necesidad de preparación de muestras ni cromatografía (López-Casero, 2019).

Sin embargo, el uso de estas metodologías limita el análisis de carotenoides debido a la necesidad de contar con un espectro de masas. Los carotenoides comunes pueden identificarse de manera concluyente mediante el uso combinado de datos cromatográficos

y espectros de absorción obtenidos por un detector PDA, tal y como se realizará en este trabajo.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Muestras

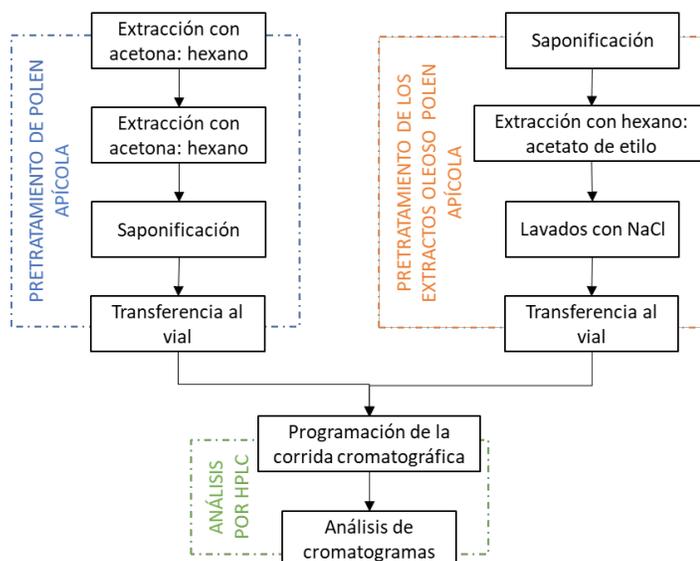
Se utilizó polen apícola previamente seco y molido de 3 regiones (Nororiente, Occidente y Suroriente) en dos épocas del año (Sequía y lluvia) y sus extractos oleosos obtenidos por las tres metodologías de extracciones descritos en la Sección 3 para la determinación del perfil de carotenoides.

### 4.2.2 Reactivos

El hexano, la acetona eran de grado analítico. El metanol y el metil terc-butil éter eran de calidad HPLC de Merck (Darmstadt, Alemania). Los patrones de  $\beta$ -caroteno, luteína y zeaxantina se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

### 4.2.3 Pretratamiento para las muestras

Antes de correr las muestras en la columna cromatográfica se debe realizar el pretratamiento tanto de las muestras de polen apícola como la de los extractos oleosos, todas las etapas que están implicadas en este proceso se esquematizan en la Figura 4- 2 y cada una se explica a continuación.



**Figura 4- 2:** Etapas de los pretratamientos de las muestras de polen apícola y de los extractos oleosos

#### ▪ Pretratamiento para polen apícola

La metodología se realizó acorde a la metodología de (Stinco, Benítez-González, Hernanz, Vicario, & Meléndez-Martínez, 2014) con algunas modificaciones:

**Extracción con hexano: acetona:** Inicialmente se pesaron de 0,8 a 1,5 g de polen apícola molido en un tubo de ensayo de vidrio de 15 mL, la cantidad pesada dependía de la cantidad inicial de carotenoides totales o la coloración del polen, ya que entre más rojas/naranjas sean menos cantidad será necesario. Si el polen tenía más tonalidad amarilla como la imagen A (Figura 4- 3) entonces se pesaron 1,5 g, pero, si tiene más tonalidades rojas/naranja como la imagen B entonces se pesaron 0,8 g.



A. B.  
**Figura 4- 3:** Diferentes tonalidades del polen

Posteriormente, al tubo de ensayo se le adicionaron 4 mL de la mezcla extractiva (hexano: acetona 1:1), la cual se agitó con vórtex durante 30 segundos a 2000 rpm, luego se llevó a ultrasonido por 2 minutos y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C. La fase orgánica (fase superior) en la cual se encuentran los carotenoides se recolectó en un balón esmerilado. Esta extracción se repitió hasta la desaparición del color en el solvente. Las fases orgánicas recolectadas se secaron en un rota-evaporador a una temperatura máxima de 30°C.

**Saponificación:** el extracto seco se disolvió en 500 µL de diclorometano y 500 µL de KOH (20% p/v en metanol), se agitó en un vórtex y se dejó saponificar durante 1 hora en oscuridad y en constante agitación. Acabado el tiempo, se transfirió a un tubo de ensayo de vidrio de 15 mL y se adicionó una solución de NaCl al 5% hasta la máxima capacidad permitida por el tubo, se homogeneizó en un vórtex y se centrifugó nuevamente. La fase acuosa se descartó. Los lavados se repitieron con agua destilada hasta que el pH fuese neutro. La fase orgánica se concentró hasta sequedad en un rota-evaporador a una

temperatura máxima de 30°C. La fase orgánica se concentra hasta sequedad en un rota-evaporador a una temperatura máxima de 30°C.

**Transferencia al vial:** el extracto se disolvió en 1000 µL de acetato de etilo, se filtró en un filtro de jeringa de 0,22 micras, se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL y se concentró en una estufa al vacío a una temperatura máxima de 30°C.

El extracto seco se disolvió en 100 µL de acetato de etilo, se centrifugó y se llevó a un vial con un inserto para el análisis cromatográfico

- **Pretratamiento para el extracto oleoso**

Se realizó acorde a la metodología de (Tiwari, Upadhyay, Singh, Meena, & Arora, 2019) con algunas modificaciones:

**Saponificación:** se pesaron de 0.8 - 1.5 g del extracto oleoso del polen apícola en un tubo Falcon de 50 mL, la cantidad pesada, al igual que con el polen, dependió de la coloración del extracto, ya que entre más rojas/naranjas fueron menos cantidad fue necesaria. Si el extracto presentaba más tonalidad amarilla como la imagen A (Figura 4-4) entonces se pesaron 1,5 g, pero, si tenía más tonalidades rojas/naranja como la imagen B, entonces se pesaron 0,8 g.

Para iniciar la saponificación se adicionaron 15 mL de etanol y 4 mL de KOH (35% p/v en metanol), se homogeneizó en un vórtex y se dejó saponificar por 20 horas en agitación. Para terminar la saponificación, se adicionaron 5 mL de NaCl al 5%.



A.



B.

**Figura 4- 4:** diferentes tonalidades de los extractos

**Extracción con hexano: acetato de etilo:** al extracto saponificado se le adicionaron 15 mL de la mezcla extractiva (hexano: acetato de etilo 85:15), se homogeneizó y centrifugó, la fase orgánica se recolectó en un balón esmerilado de 250 mL. Cuando se presentó un precipitado blanco (jabones), se cambió el tubo en el que se estaba realizando la extracción, simplemente transfiriendo la fase acuosa a un nuevo tubo.

Las fases recolectadas se concentraron hasta sequedad a una temperatura máxima de 30°C en un rota-evaporador. Si la muestra quedaba con un precipitado blanco (jabones) se realizaron lavados de la siguiente manera: se disolvió el extracto con 1 mL de hexano y se agregó 1 mL de NaCl al 5%, se homogeneizó, centrifugó y recolectó la fase orgánica en un balón esmerilado de 25 mL. Se adicionó 1 mL de hexano, se homogeneizó y se centrifugó. Se recolectaron las fases orgánicas y se llevaron hasta sequedad a una temperatura máxima de 30°C en un rota-evaporador.

**Transferencia al vial:** igual que para el polen.

Nota: si las muestras se van a analizar con posterioridad, almacenar el extracto en atmósfera de N<sub>2</sub> y en congelación a -18°C.

#### 4.2.4 Análisis de extractos

La separación de los carotenoides se lleva a cabo en un sistema de cromatografía líquida de alto performance (HPLC), de gradiente cuaternario Jasco LC-2000 plus. Usando una columna C30 (tamaño de partícula de 150 x 4,6 mm DI 3 µm; YMC Europa, tamaño de partícula de 4,0 mm DI 3 µm; YMC Europa, Dinslaken, Alemania) a 25 °C con una precolumna de protección (10 x 4.0 mm I.D. 3 mm particle size; YMC Europe, Dinslaken, Germany).

La fase móvil se bombeó a 1 mL/min y los cromatogramas se controlaron a diferentes longitudes de onda. En el detector de PDA (Jasco, MD-2018Plus) se ajustaron las siguientes longitudes de ondas: 285 nm para fitoeno y tocoferoles, 350 nm para fitoflueno, 410 nm para ζ- caroteno y feofitina A, 472 nm para licopeno y 450 nm para el resto de los carotenoides (α, β- caroteno, β -criptoxantina, capsantina, luteína, violaxantina y zeaxantina).

El volumen de inyección se fijó en 5 µl. la fase móvil consistió en una mezcla de metanol, metil-terbutil éter y agua miliQ y se bombeo en un gradiente de trabajo como se muestra a en la Tabla 4- 1.

**Tabla 4- 1:** Gradiente de trabajo

Tiempo (min)	% Agua	% TBME	%Metanol
0,1	5	5	90
0 - 5	0	5	95
5 - 10	0	11	89
10 - 16	0	25	75
16 - 20	0	60	40
20 - 22,5	0	60	40
22,5 - 25	0	85	15
25 - 28	5	5	90
28 - 30	5	5	90

La identificación de los compuestos individuales se realizó mediante la comparación de las características cromatográficas y espectroscópicas (UV/vis) con las de los patrones, obtenidos de casas comerciales. Las concentraciones de los carotenoides se determinaron mediante una calibración externa con curvas de calibrado construidas con sus correspondientes patrones para  $\beta$ -caroteno, luteína y zeaxantina y los resultados fueron expresados en µg carotenoide/kg polen.

#### 4.2.5 Curvas de calibración

Para la creación de las curvas de calibración se tuvieron en cuenta los rangos de linealidad establecidas por Stinco et al., (2019). Para crear estos puntos de concentración se preparó inicialmente una solución madre a partir de un patrón, a partir de la cual se crearon entre 5 a 7 puntos de concentración diferentes. Estos puntos fueron inyectados en el cromatógrafo bajo las mismas condiciones en las que se inyectaron las muestras.

Para la cuantificación del  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y luteína, se utilizó el método de calibración externa que consistió en comparar la respuesta instrumental de diferentes concentraciones de un estándar o patrón, mediante la construcción de una recta. Se midió a continuación la respuesta del analito en la muestra problema y mediante extrapolación, haciendo uso de la ecuación de regresión lineal de la recta anterior, se determina la concentración del analito.

### 4.2.6 Límite de detección (LOD) Y límite de cuantificación (LOQ)

Empleando los resultados de la curva de calibración, se procedió a determinar la concentración mínima cuantificable (LOQ, ) y la concentración mínima detectable (LOD,  $LOD = a + 3S_{y/x}$ ) en el método, para ello se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$LOD = a + 3S_{y/x} \quad \text{Ecuación 4- 8}$$

$$LOQ = a + 10S_{y/x} \quad \text{Ecuación 4- 9}$$

Donde:

a= Intercepto

$S_{y/x}$ = Error Estándar de estimación del intercepto

## 4.3 Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico Excel. Las variables cuantitativas (media y desviación estándar) fueron analizadas mediante la prueba de Tukey, utilizando un nivel de significancia del 5%.

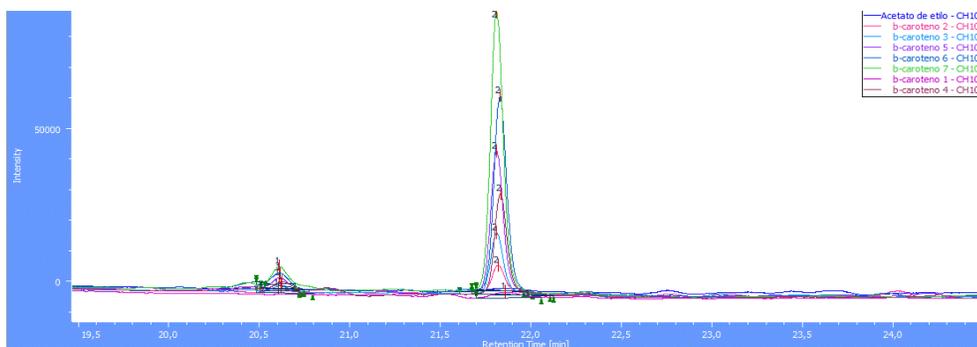
## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Curvas de calibración

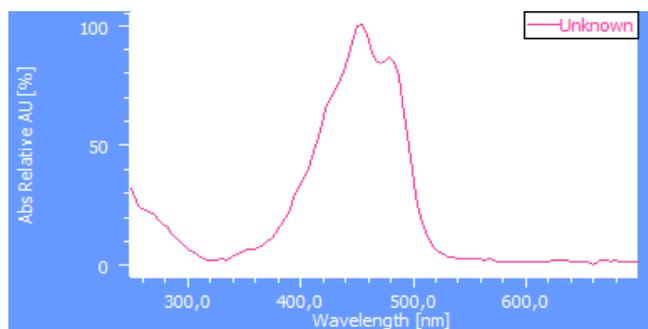
Los analitos problema de interés fueron el  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y luteína dado que han sido previamente identificados en muestras de polen apícola colombiano (Gardana et al., 2018).

- **$\beta$ -caroteno**

De acuerdo con Stinco et al., (2019) el rango de linealidad para  $\beta$ -caroteno está entre 0,002-0,405 mg  $\beta$ -caroteno/mL de sln. Por lo cual se realizaron 5 disoluciones dentro de este rango a partir de una solución madre de concentración 0,5004 mg  $\beta$ -caroteno/mL de sln. De la inyección de los puntos de calibración se obtuvieron el tiempo de retención (TR) y el espectro de absorción.

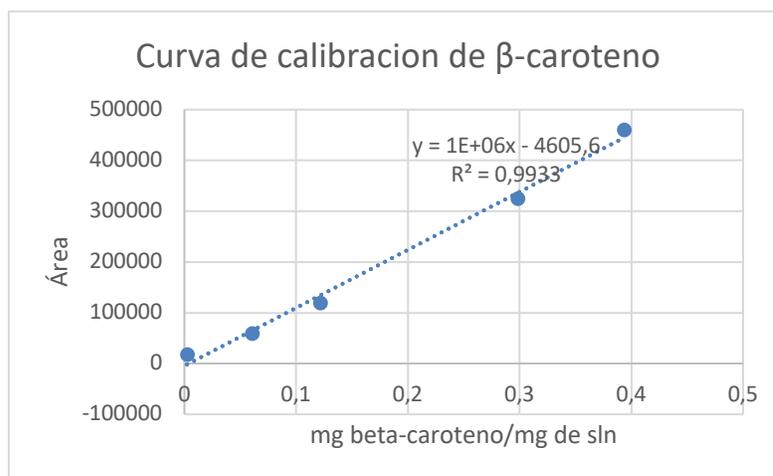


**Figura 4- 5:** Cromatogramas de  $\beta$ -caroteno a diferentes concentraciones



**Figura 4- 6:** Espectro de absorción del  $\beta$ -caroteno

De la Figura 4- 5 se estableció el rango de tiempo en el cual se espera encontrar el  $\beta$ -caroteno en las muestras de polen apícola ( $TR = 21,82 \pm 0,02$ ), adicionalmente la confirmación del compuesto se realizaría al comparar el espectro de las muestras con el obtenido en la Figura 4- 6, que corresponde al estándar.



**Figura 4- 7:** Curva de calibración de  $\beta$ -caroteno

**Tabla 4- 2:** Coeficientes de la curva de calibración de  $\beta$ -caroteno

<i>Parámetro</i>	<i>Mínimos Cuadrados Estimado</i>	<i>Error Estándar (mV)</i>	<i>Estadístico T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-4605,55	12406,7	-0,371215	0,7351
Pendiente	$1,14177*10^6$	54128,9	21,0934	0,0002

En la Figura 4- 7 se observa que la curva de calibración tiene un  $R=0,9933$ , indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Al realizar la prueba para el coeficiente de correlación de esta curva se obtuvo que el P-Valor es menor que el  $\alpha$  ( $\alpha = 0,05$ ) demostrando bajo la evidencia experimental y estadística que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del sistema.

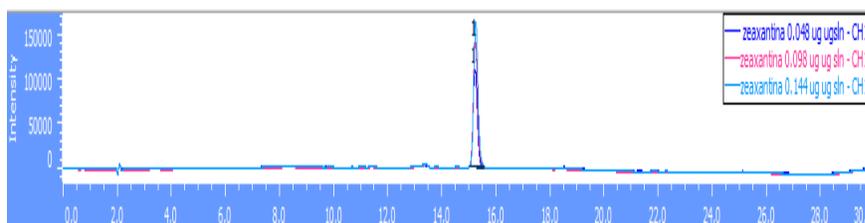
Al realizar la prueba para la pendiente y prueba de convergencia al origen (Tabla 4- 2), se obtuvo que la pendiente es estadísticamente diferente a cero con un valor próximo de  $1,14177*10^6$ , el P-Valor es menor que el  $\alpha$  (0,05) demostrando que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que la pendiente es significativamente diferente a cero.

Por otra parte, se obtuvo que el intercepto tiene un valor próximo de -4605,55 y estadísticamente igual a cero ya que el P-valor es mayor que el  $\alpha$  (0,05). Con esto se demuestra que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que el intercepto converge al origen con una confianza del 95,0%.

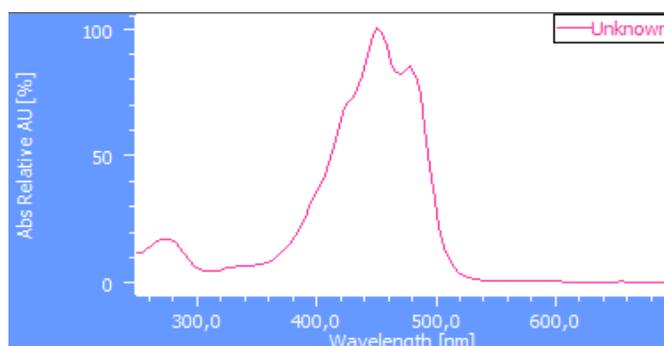
Se realizó la prueba de Normalidad para RESIDUOS con el estadístico W de Shapiro-Wilk, y se obtuvo que el P-Valor es mayor que el  $\alpha$  ( $0,246419 > 0,05$ ) demostrando que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que los datos de la regresión lineal del sistema se distribuyen de manera normal con una confianza del 95,0%. Se comprueba que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del sistema.

- **Zeaxantina**

De acuerdo con Stinco et al., (2019) el rango de linealidad para la zeaxantina está entre 0.005-0.506 mg zeaxantina/mg de sln. Por lo cual se realizaron 4 disoluciones dentro de este rango a partir de una solución madre de concentración 0,613 mg zeaxantina/mg de sln. De la inyección de los puntos de calibración se obtuvieron el tiempo de retención (TR) y el espectro de absorción.

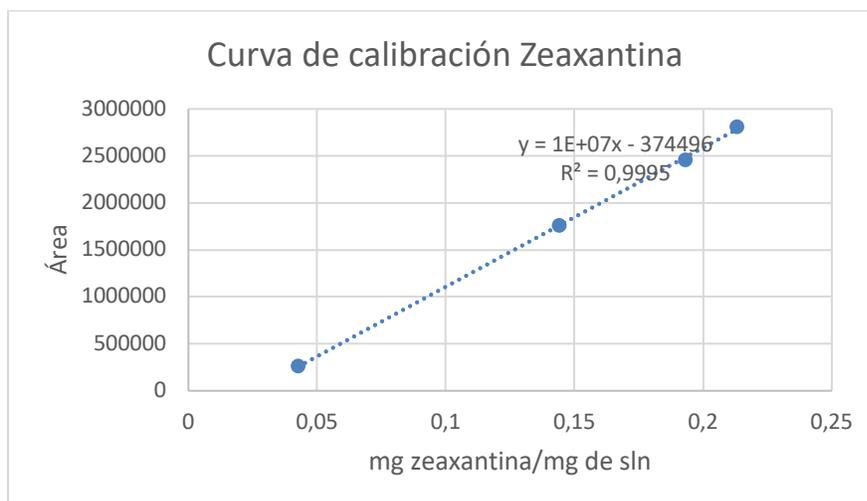


**Figura 4- 8:** Cromatogramas de zeaxantina a diferentes concentraciones



**Figura 4- 9:** Espectro de absorción de la zeaxantina

De la Figura 4- 8 se estableció el rango de tiempo en el cual se espera encontrar la zeaxantina en las muestras de polen apícola (TR= 15,23±0,01), adicionalmente la confirmación del compuesto se realizaría al comparar el espectro de las muestras con el obtenido en la Figura 4- 9 que corresponde al estándar.



**Figura 4- 10:** Curva de calibración de Zeaxantina

**Tabla 4- 3:** Coeficientes de la curva de calibración de zeaxantina

<i>Parámetro</i>	<i>Mínimos Cuadrados Estimado</i>	<i>Error Estándar (mV)</i>	<i>Estadístico T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	87338,5	21832,0	4,00049	0,0572
Pendiente	5,78728*10 <sup>6</sup>	131431,	44,0327	0,0005

En la Figura 4- 10 se observa que la curva de calibración tiene un  $R=0,9995$ , indicando una relación fuerte entre las variables. La prueba para el coeficiente de correlación obtuvo un P-Valor menor que el  $\alpha$  demostrando que el método cumple con el parámetro de linealidad del sistema.

La pendiente y prueba de convergencia al origen (Tabla 4- 3), mostraron que la pendiente es estadísticamente diferente a cero con un valor próximo de  $5,78728*10^6$  y que el P-Valor es menor que el  $\alpha$  por lo que se puede afirmar que la pendiente es significativamente diferente a cero.

El intercepto es estadísticamente igual a cero ya que el P-valor es mayor que el  $\alpha$  (0,05). Con esto se puede afirmar que el intercepto converge al origen con una confianza del 95,0%. La prueba de Normalidad para RESIDUOS con el estadístico W de Shapiro-Wilk, obtuvo un P-Valor mayor que el  $\alpha$  ( $0,246419 > 0,05$ ) demostrando que los datos de la regresión lineal del sistema se distribuyen de manera normal con una confianza del 95,0%. Se comprueba que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del sistema.

#### ▪ Luteína

De acuerdo con (Stinco et al., 2019) el rango de linealidad para la luteína esta entre 0.003-0.256 mg luteína/mg de sln. Por lo cual se realizaron 5 disoluciones dentro de este rango a partir de una solución madre de concentración 0,471 mg luteína /mg de sln. De la inyección de los puntos de calibración se obtuvieron el tiempo de retención (TR) y el espectro de absorción.

De la Figura 4- 11 se estableció el rango de tiempo en el cual se espera encontrar el Luteína en las muestras de polen apícola (TR=  $13,34 \pm 0,01$ ), adicionalmente la confirmación del compuesto se realizaría al comparar el espectro de las muestras con el obtenido en la Figura 4- 12, que corresponde al estándar.

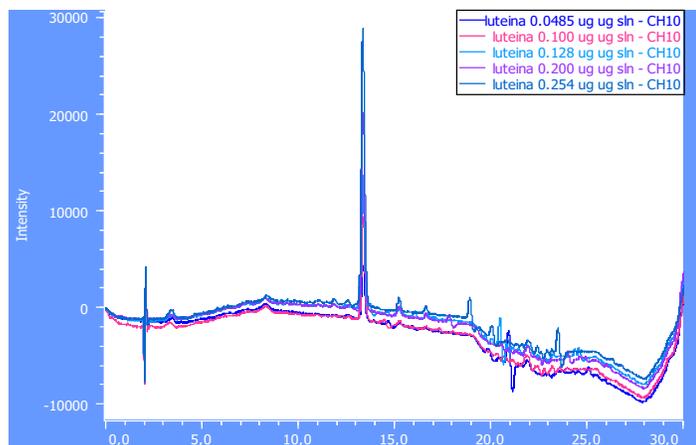


Figura 4- 11: Cromatogramas de Luteína a diferentes concentraciones

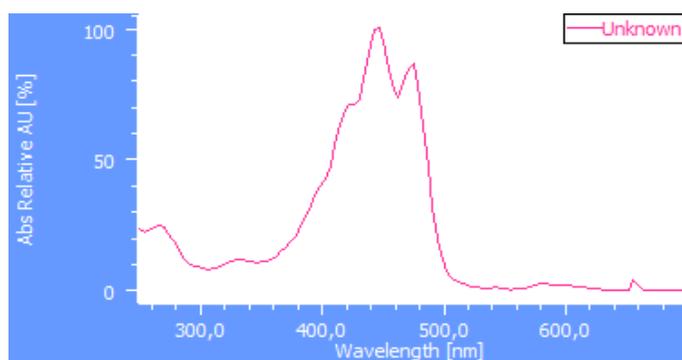


Figura 4- 12: Espectro de absorción de Luteína

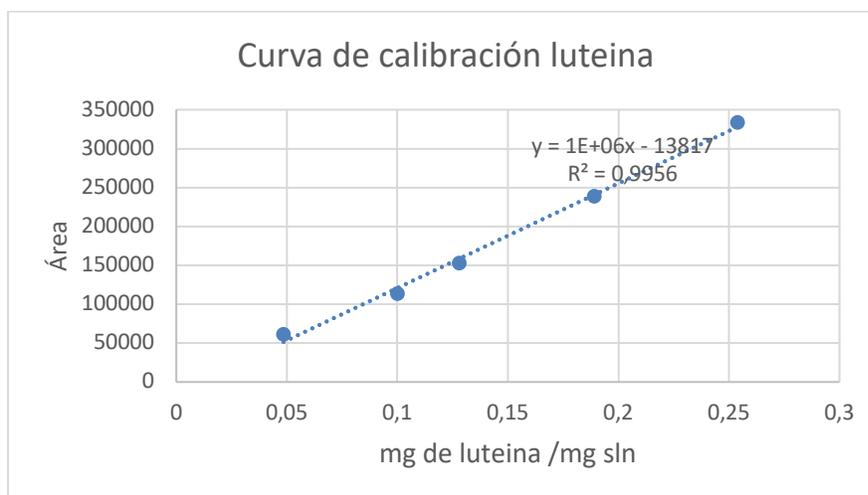


Figura 4- 13: Curva de calibración de Luteína

**Tabla 4- 4:** Coeficientes de la curva de calibración de Luteína

<i>Parámetro</i>	<i>Mínimos Cuadrados Estimado</i>	<i>Error Estándar (mV)</i>	<i>Estadístico T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-13817,5	8248,88	-1,67507	0,1925
Pendiente	$1,3458 \cdot 10^6$	51360,6	26,203	0,0001

En la Figura 4- 13 se observa que la curva de calibración tiene un  $R=0,9999$ , indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El coeficiente de correlación de esta curva tuvo el P-Valor es menor que el  $\alpha$  por lo cual el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del sistema.

Al realizar la prueba para la pendiente y prueba de convergencia al origen (Tabla 4- 4), se obtuvo que la pendiente es estadísticamente diferente a cero y que el P-Valor es menor que el  $\alpha$  (0,05) demostrando que la pendiente es significativamente diferente a cero. Por otra parte, se obtuvo que el intercepto es estadísticamente igual a cero ya que el P-valor es mayor que el  $\alpha$ , por lo que se puede afirmar que el intercepto converge al origen.

La prueba de Normalidad para RESIDUOS con el estadístico W de Shapiro-Wilk, obtuvo que el P-Valor es mayor que el  $\alpha$  ( $0,362321 > 0,05$ ) demostrando que los datos de la regresión lineal del sistema se distribuyen de manera normal con una confianza del 95,0%. Se comprueba que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del sistema.

#### 4.4.2 LOD y LOQ

Empleando los resultados de las curvas de calibración, se determinó LOD y LOQ, para cada una de ellas, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 4- 5.

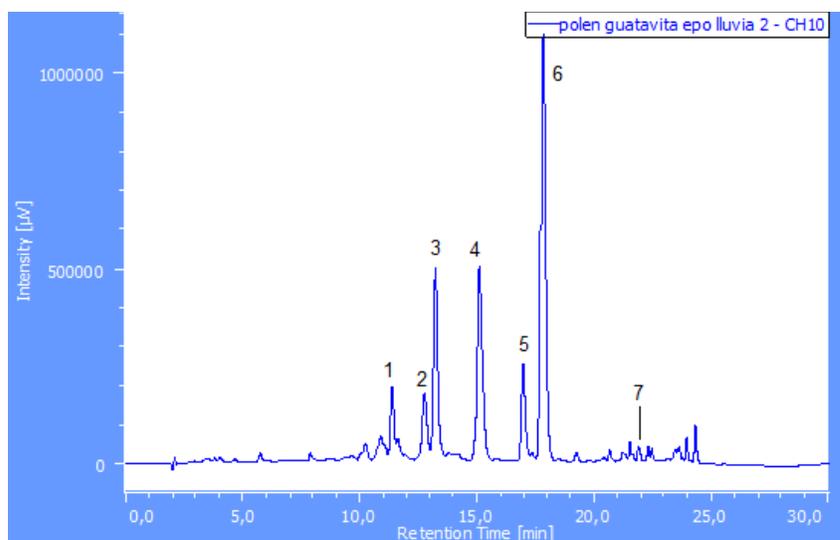
**Tabla 4- 5:** Intercepto (a), pendiente, LOD y LOQ

<b>mg/g de solución</b>	<b>a</b>	<b>Pendiente</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	-27791,1	$1 \cdot 10^6$	$3,29 \cdot 10^{-2}$	$1,10 \cdot 10^{-1}$
<b>Zeaxantina</b>	-375104	$1 \cdot 10^7$	$7,53 \cdot 10^{-3}$	$2,51 \cdot 10^{-2}$
<b>Luteína</b>	-13817,5	$1 \cdot 10^6$	$1,84 \cdot 10^{-2}$	$6,13 \cdot 10^{-2}$

#### 4.4.1 Perfil de carotenoides del polen

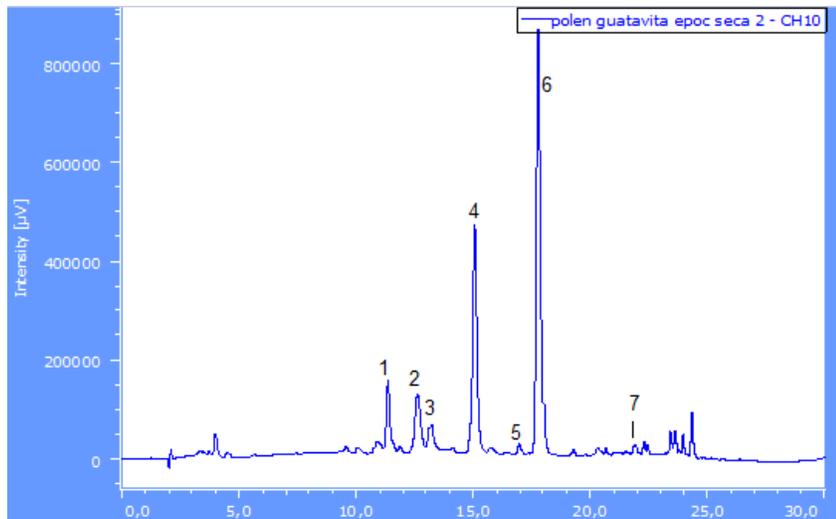
Las muestras de polen apícola en las 3 zonas de Cundinamarca; Nororiente (NO), Occidente (O) y Suroriente (SO) y en las dos épocas del año; lluvia y sequía, fueron preparadas de acuerdo con la metodología expuesta anteriormente. Los cromatogramas característicos se muestran en las Figura 4- 14, Figura 4- 15, Figura 4- 16, Figura 4- 17, Figura 4- 18, Figura 4- 19. Se identificó luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno gracias a la comparación de los espectros de absorción y los tiempos de retención obtenidos durante la elaboración de las curvas de calibración, adicionalmente, se identificó tentativamente 13/13' cis-zeaxantina, zeinoxantina y  $\beta$ -criptoxantina con la ayuda de espectros de absorción reportados en la literatura y los tiempos de retención reportados por Stinco et al., (2019), quienes usaron las mismas condiciones cromatográficas.

##### ▪ Muestra Nororiente



**Figura 4- 14:** Perfil de carotenoides de la muestra NO en época de lluvia.

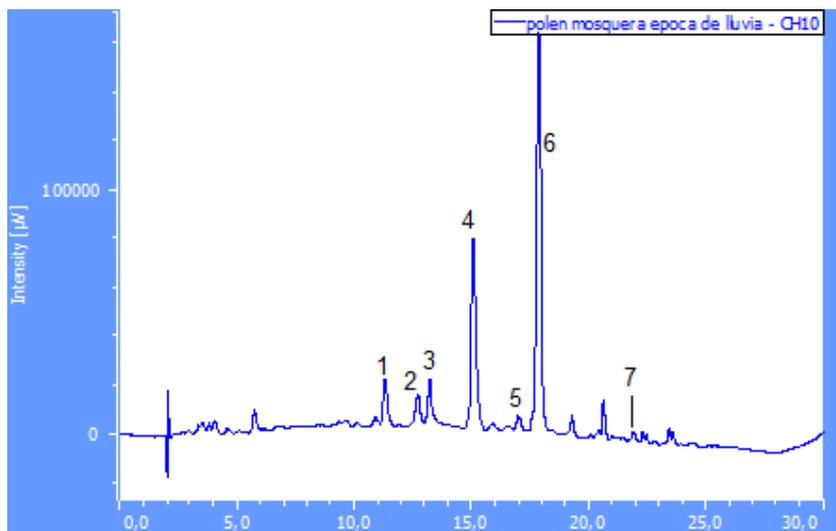
1: 13/13' cis zeaxantina, 2: isómero cis de zeaxantina, 3: luteína, 4: zeaxantina, 5: zeinoxantina, 6:  $\beta$ -criptoxantina, 7:  $\beta$ -caroteno.



**Figura 4- 15:** Perfil de carotenoides de la muestra SO en época de sequía.

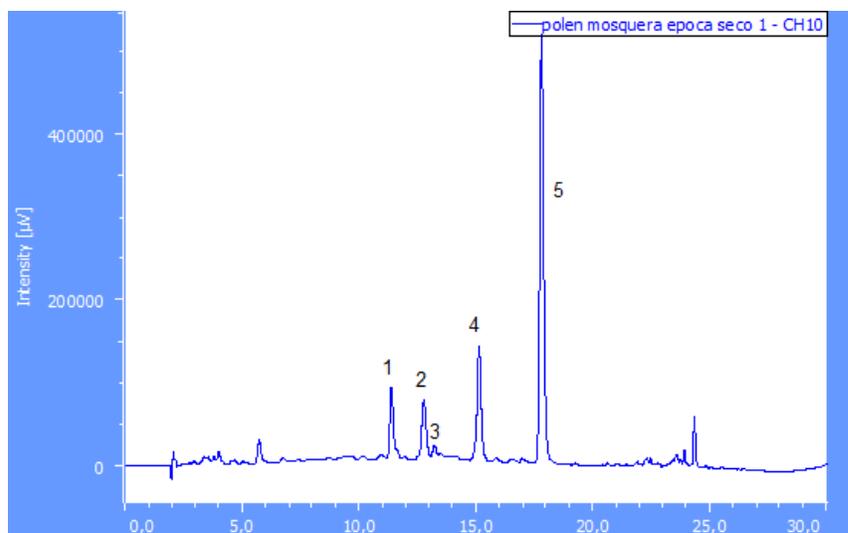
1: 13/13' cis zeaxantina, 2: isómero cis de zeaxantina, 3: luteína, 4: zeaxantina, 5: zeinoxantina, 6:  $\beta$ -criptoxantina, 7:  $\beta$ -caroteno.

▪ **Muestra Occidente**



**Figura 4- 16:** Perfil de carotenoides de la muestra O en época de lluvia.

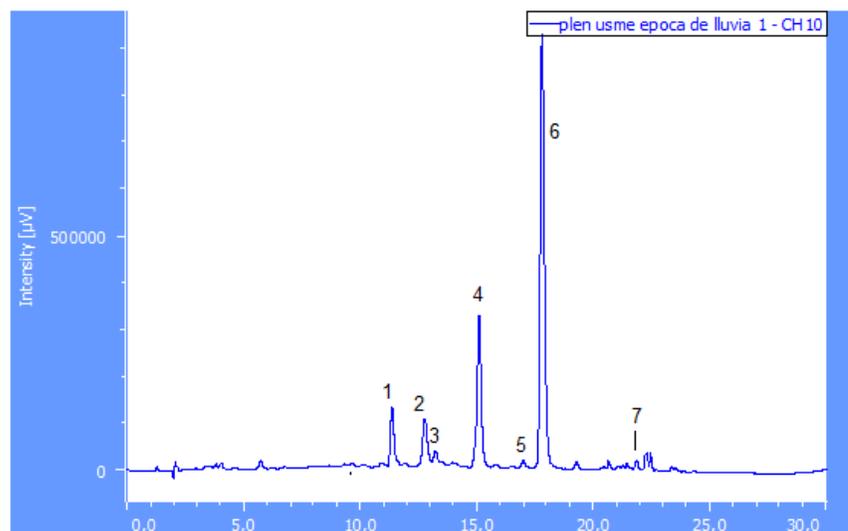
1: 13/13' cis zeaxantina, 2: isómero cis de zeaxantina, 3: luteína, 4: zeaxantina, 5: zeinoxantina, 6:  $\beta$ -criptoxantina, 7:  $\beta$ -caroteno.



**Figura 4- 17:** Perfil de carotenoides de la muestra O en época de sequía.

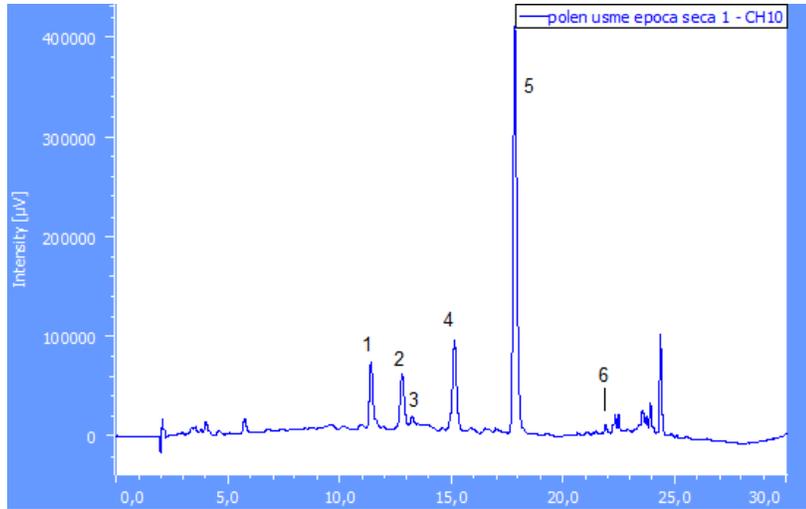
1: 13/13' cis zeaxantina, 2: isómero cis de zeaxantina, 3: luteína, 4: zeaxantina, 5:  $\beta$ -criptoxantina.

▪ **Muestra Suroriente**



**Figura 4- 18:** Perfil de carotenoides de la muestra SO en época de lluvia.

1: 13/13' cis zeaxantina, 2: isómero cis de zeaxantina, 3: luteína, 4: zeaxantina, 5: zeinoxantina, 6:  $\beta$ -criptoxantina, 7:  $\beta$ -caroteno.

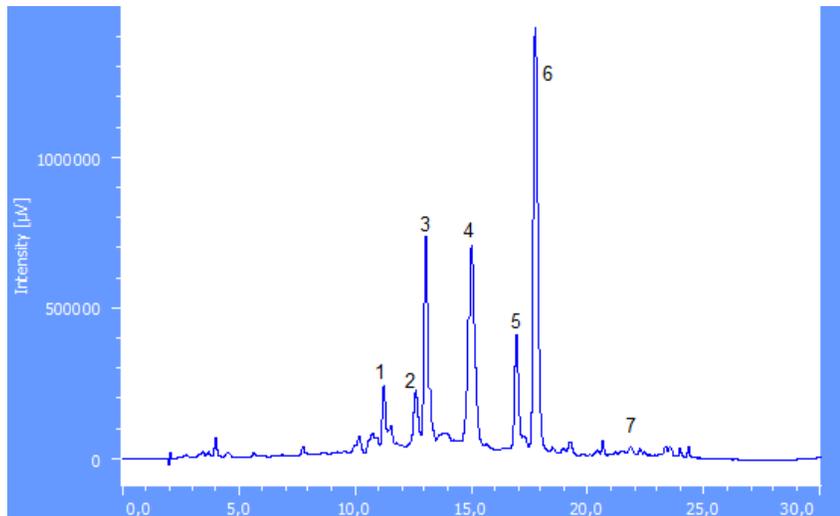


**Figura 4- 19:** Perfil de carotenoides de la muestra SO en época de sequía.

1: 13/13' cis zeaxantina, 2: isómero cis de zeaxantina, 3: luteína, 4: zeaxantina, 5:  $\beta$ -criptoxantina, 6:  $\beta$ -caroteno.

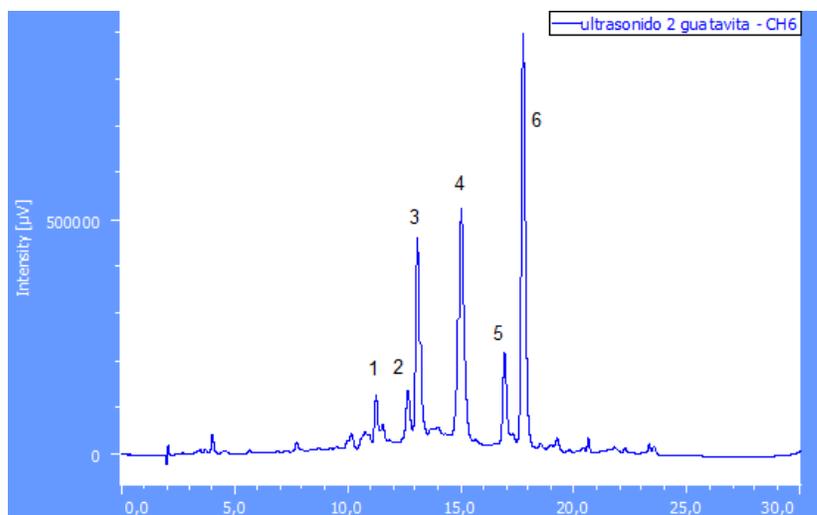
#### 4.4.2 Perfil de carotenoides de los extractos oleosos

Se selecciono el extracto con el mayor contenido de carotenoides en cada una de las extracciones, en todos los casos el mayor contenido se presentó en la zona de Nororient en la época de lluvia, los cromatogramas se muestran en las Figura 4- 20, Figura 4- 211 y Figura 4- 222.



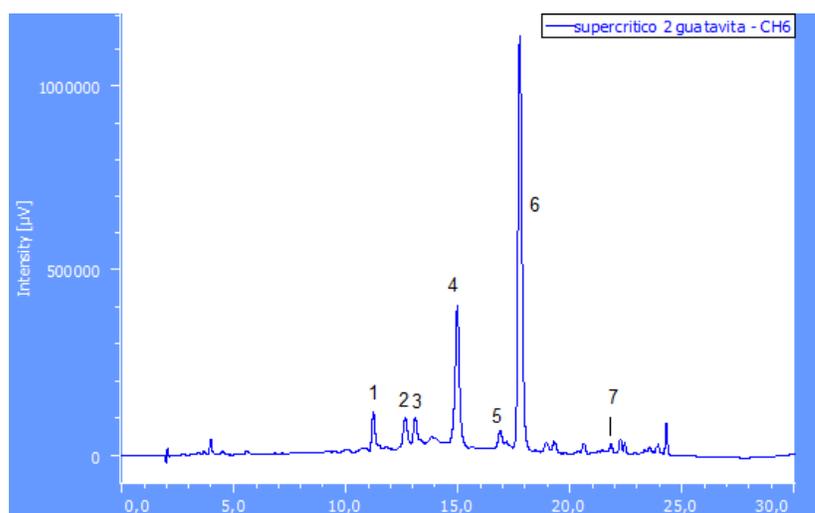
**Figura 4- 20:** Perfil de carotenoides del extracto convencional de la muestra NO en época de lluvia.

1: 13/13' cis zeaxantina, 2: isómero cis de zeaxantina, 3: luteína, 4: zeaxantina, 5: zeinoxantina, 6:  $\beta$ -criptoxantina, 7:  $\beta$ -caroteno.



**Figura 4- 21:** Perfil de carotenoides del extracto por ultrasonido de la muestra NO en época de lluvia.

1: 13/13' cis zeaxantina, 2: isómero cis de zeaxantina, 3: luteína, 4: zeaxantina, 5: zeinoxantina, 6:  $\beta$ -criptoxantina.



**Figura 4- 22:** Perfil de carotenoides del extracto supercrítico de la muestra NO en época de lluvia.

1: 13/13' cis zeaxantina, 2: isómero cis de zeaxantina, 3: luteína, 4: zeaxantina, 5: zeinoxantina, 6:  $\beta$ -criptoxantina, 7:  $\beta$ -caroteno.

La presencia de diferentes especies botánicas en cada una de las muestras permitía asumir que se presentarían diferencias notables en el tipo y contenido de los diferentes carotenoides mostrados en los perfiles. Sin embargo, tales diferencias no son tan evidentes en términos de las especies químicas principales, ya que en los cromatogramas de los

pólenes y en los extractos oleosos se presentaron los mismos picos cromatográficos, aunque sí en proporciones diferentes. En general, el carotenoide con la mayor representación fue la  $\beta$ -criptoxantina, seguido en la mayoría de los casos por la luteína y zeaxantina, es decir, es claro que hay una mayor proporción de xantófilas que de carotenos. De hecho, el  $\beta$ -caroteno se encuentra representado en menor medida o en algunos casos inexistente. Esto coincide con los pocos reportes previos de muestras de polen apícola del Altiplano Cundiboyacense (Gardana et al., 2018; Salazar-González et al., 2020), que, aunque provienen del Departamento de Boyacá, tienen características similares en términos de la disponibilidad de recursos botánicos (Casas Restrepo et al., 2020). Adicionalmente, no se presentó ninguna tendencia que mostrara la relación entre carotenoides, zonas y épocas del año.

#### 4.4.3 Cuantificación de carotenoides

Para la determinación cuantitativa de los carotenoides tanto en las muestras de polen como en los extractos oleosos se utilizaron las curvas de calibración calculadas anteriormente. A continuación, se muestra el contenido de luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno presente en las muestras de polen apícola; de las 3 regiones y en las dos épocas, y en los extractos oleosos obtenidos para la zona Nororiente en época de lluvia.

**Tabla 4- 6:** Cuantificación de luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno en las muestras de polen apícola

Carotenoide $\mu\text{g/g}$ de polen	NO		O		SO	
	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía
<b>Luteína</b>	48,45 $\pm$ 30,80 <sup>f</sup>	26,52 $\pm$ 2,59 <sup>e</sup>	10,95 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	36,51 $\pm$ 34,71 <sup>d</sup>	38,30 $\pm$ 1,02 <sup>d</sup>
<b>Zeaxantina</b>	59,03 $\pm$ 12,80 <sup>g</sup>	35,67 $\pm$ 7,18 <sup>d</sup>	8,02 $\pm$ 1,64 <sup>a, c</sup>	3,18 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	24,76 $\pm$ 5,08 <sup>e</sup>	7,52 $\pm$ 1,56 <sup>c</sup>
<b>B-caroteno</b>	15,04 $\pm$ 3,14 <sup>h</sup>	10,86 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	3,16 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>	ND	8,67 $\pm$ 0,01 <sup>a, c</sup>	ND

ND: carotenoide no detectado. Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0,05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre las concentraciones de las diferentes regiones y épocas.

**Tabla 4- 7:** Cuantificación de luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno en los extractos oleosos de polen apícola

Carotenoide $\mu\text{g/g}$ de extracto	NO Lluvia		
	Convencional	Ultrasonido	Supercrítico
<b>Luteína</b>	152,87 $\pm$ 5,29 <sup>a</sup>	308,43 $\pm$ 12,25 <sup>d</sup>	694,46 $\pm$ 23,20 <sup>f</sup>
<b>Zeaxantina</b>	70,36 $\pm$ 10,85 <sup>b</sup>	141,76 $\pm$ 15,19 <sup>e</sup>	254,28 $\pm$ 25,09 <sup>g</sup>
<b>B-caroteno</b>	18,97 $\pm$ 8,57 <sup>c</sup>	ND	40,44 $\pm$ 6,74 <sup>h</sup>

ND: carotenoide no detectado. Letras iguales representa que no hay diferencia significativa en el promedio ( $p < 0,05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey entre las diferentes metodologías de extracción

El  $\beta$ -caroteno presentó los contenidos más bajos dentro de los carotenoides cuantificados tanto en las muestras de polen apícola como en los extractos oleosos. Sin embargo, en muestras de otras regiones este puede llegar a ser uno de los máximos representantes, tal y como lo reportan Karkar et al., (2021) donde muestras de polen de castaña pueden llegar a tener un contenido de 395,02  $\mu\text{g/g}$  de polen. En muestras de polen de girasol y de trébol reportadas por Abd-Alla & Salem (2020) pueden contener 152.97 o 134.18  $\mu\text{g/g}$  de polen.

El mayor rendimiento de extracción dentro de los carotenoides estudiados se presentó en la luteína tanto en la extracción convencional con 42%, como en la extracción por ultrasonido con 84%. La extracción de zeaxantina por ultrasonido aumento al doble en comparación con la convencional (16 y 32%, respectivamente), mientras que el  $\beta$ -caroteno presento los menores porcentajes de extracción tanto en la extracción convencional como por ultrasonido con un 16% y 0% respectivamente. Lo anterior nos muestras como el tratamiento con ultrasonido favoreció una mayor conservación de las xantofilas en el extracto respecto al tratamiento convencional. Sin embargo, también se observa que tuvo un efecto negativo sobre la concentración de  $\beta$ -caroteno, lo cual indica que esta especie sería más susceptible a los efectos del ultrasonido respecto a las xantofilas. Además, es claro que el extracto con fluidos supercríticos tuvo la mayor concentración de los tres carotenoides, debido a que no se presenta el efecto de dilución del aceite en las extracciones convencional y ultrasonido que emplearon aceite de girasol como solvente. Adicionalmente, a comparación de la extracción por ultrasonido no se presentó un efecto negativo sobre el  $\beta$ -caroteno.

Como se mencionó anteriormente, las xantofilas se encuentran de forma mucho más predominante, como la zeaxantina que ha sido reportada como el mayor representante en

muestras colombianas (Gardana et al., 2018), sin embargo, en este trabajo la luteína también mostró contenidos altos. Estos resultados resaltan las xantofilas y su predominancia frente a los carotenos como marcadores químicos de pólenes provenientes de las zonas altoandinas de Colombia.

De acuerdo con la anterior cuantificación una porción diaria de 25g de polen apícola de Cundinamarca podrían suplir las necesidades de zeaxantina (2 mg de zeaxantina (Eggersdorfer & Wyss, 2018) en la ingesta diaria.

La luteína y la zeaxantina son más conocidas como pigmentos maculares que ayudan a construir un escudo de pigmento amarillo para proteger las células oculares de los efectos nocivos de ciertas fuentes de luz, como el sol. La suplementación con alimentos ricos en luteína y zeaxantina o con suplementos ricos en luteína aumenta la densidad del pigmento macular, reduciendo el riesgo de cataratas relacionadas con la edad en la población de edad avanzada (Abdel-Aal et al., 2013; Mozaffarieh et al., 2003). En productos cosméticos los extractos de licopeno se utilizan para la elaboración de cremas protectoras contra los rayos UV, destinada a regenerar y reafirmar la piel. Es especialmente beneficioso para la piel seca y cetrina. Además, tiene un efecto tonificante recomendado en pieles grasas. También regula la producción de procolágeno, una proteína precursora del colágeno que protege el ácido hialurónico contra la degradación (Baran et al., 2020).

La acción del  $\beta$ -caroteno está estrechamente relacionada con la acción de la vitamina A. Las propiedades de la vitamina A y el  $\beta$ -caroteno son usados en la industria cosmética para reducir los efectos nocivos de factores externos. La adición de estos compuestos permite retrasar los procesos de envejecimiento de la piel, aumentar la elasticidad, reduce las arrugas finas y aclara las manchas de la piel (Baran et al., 2020).

## 4.5 Conclusiones parciales

La técnica de HPLC desarrollada permitió la separación de los carotenoides presentes en muestras apícolas y los extractos oleosos. Los cuales pudieron ser identificados posteriormente con ayuda de las curvas de calibración y los espectros de absorbancia obtenidos de los patrones de  $\beta$ -caroteno, luteína y zeaxantina.

Se pudo observar que el carotenoide presente en mayor proporción tanto en las muestras de polen apícola como en los extractos oleosos fue:  $\beta$ -criptoxantina, seguido en la mayoría de los casos de zeaxantina, mientras que el carotenoide presente en menor proporción o inexistente fue el  $\beta$ -caroteno.

La extracción por ultrasonido favoreció la extracción de las xantofilas en comparación con la extracción convencional. En contraposición, se presentó la degradación del  $\beta$ -caroteno en la extracción por ultrasonido.

Finalmente, se puede destacar en todos los casos la presencia de isómeros de zeaxantina, luteína y zeinoxantina, los cuales no mostraron tendencia ni para las épocas ni zonas estudiadas.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

La técnica de HPLC desarrollada permitió la separación de los carotenoides presentes en muestras apícolas y los extractos oleosos. Se pudo observar que el carotenoide presente en mayor proporción en cada una de las muestras fue:  $\beta$ -criptoxantina, seguido en la mayoría de los casos de zeaxantina, mientras que el carotenoide presente en menor proporción o inexistente fue el  $\beta$ -caroteno.

Las muestras del polen apícola pueden considerarse como buena fuente de proteína total (24,6-29,4 g/100g de polen), una excelente fuente de ácidos grasos n-3 (0,6 g de ácido  $\alpha$ -linolénico) y vitamina E (26,13-60,70  $\mu$ g  $\alpha$ -tocoferol/g polen) de acuerdo con la resolución 810 del 2021 de Colombia. Por lo cual, puede convertirse en un producto con alto potencial para ser empleado como un suplemento alimenticio.

En las muestras de polen apícola multifloral se pudieron identificar 26 tipos polínicos pertenecientes a 15 familias botánicas, de las cuales las familias con una mayor representación con siete y tres tipos polínicos fueron Asteraceae y Fabaceae, respectivamente. Adicionalmente, se destacó por su alta frecuencia la aparición de la especie *Brassica* sp, tipo Brassicaceae.

El contenido de carotenoides totales, actividad antioxidante determinada por TEAC y FRAP y el contenido de fenoles totales, de las muestras de polen apícola variaron de 65.4 a 1301,9 mg de  $\beta$ -caroteno/Kg, 34,46 a 79,82 mmol Trolox/kg polen, 39,14 a 103,81 mmol Trolox/kg polen y 21,11 a 36,5 mg Ácido gálico/g polen, respectivamente. Las diferencias en el contenido de los compuestos bioactivos entre las diferentes regiones estudiadas y respecto a lo reportado por otros autores se deben principalmente al origen geográfico y botánico, los cuales también pueden variar a lo largo año.

La metodología de superficie de respuesta fue útil para seleccionar la combinación de tiempo y amplitud (14 minutos y 34% de amplitud) que permitiera obtener el mayor contenido de carotenoides totales en los extractos oleosos obtenidos por la metodología de extracción por ultrasonido. El uso de una cinética de segundo orden de extracción sólido-líquido en la metodología de extracción convencional permitió determinar el tiempo necesario para obtener los extractos con el mayor contenido de carotenoides totales, el cual quedó establecido en 8 días.

Los extractos oleosos obtenidos por las tres metodologías de extracción cumplieron con la normatividad establecida para los valores de peróxido, *p*-anisidina y TOTOX, indicando que estos son aptos para consumo humano. Comparado con el contenido de carotenoides de los extractos supercríticos, el contenido es alrededor de 10 veces mayor que en el extracto convencional y por ultrasonido, además, este resalta por su contenido en el ácido  $\alpha$ -linolénico [C18:3n-3] y vitamina E. Debido a su alto contenido en compuestos bioactivos, los productos con inclusión del extracto supercrítico del polen serían un ingrediente útil para formular nuevos alimentos con características funcionales.

Las imágenes por microscopía electrónica de barrido realizadas sobre el polen antes y después de las extracciones mostraron una modificación estructural en la capa externa del grano, lo cual podría indicar que las extracciones indujeron cambios que favorecieron la extracción de compuestos nutricionales y bioactivos. Las mayores afectaciones sobre la estructura del polen se presentaron, como era de esperarse, en los extractos supercríticos seguido de la extracción por ultrasonido y en menor medida en la extracción convencional.

## 5.2 Recomendaciones

Establecer la vida útil de los extractos obtenidos y evaluar su viabilidad y potencial para su empleo como alimento directo o para su inclusión en otros productos como ingrediente. Esta evaluación debería realizarse basada en costos de producción y aceptación sensorial por parte de los consumidores.

La validación del método cromatográfico desarrollado en este trabajo permitiría implementar esta metodología en los laboratorios de la Universidad Nacional y podrían servir como apoyo al desarrollo de nuevas tesis o la prestación de servicios a externos.

## Bibliografía

- Abd-Alla, A., & Salem, R. (2020). Impact of storage period on different types of bee pollen pigments. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 11(1), 9–13. <https://doi.org/10.21608/jppp.2020.68178>
- Abdel-Aal, E.-S., Akhtar, H., Zaheer, K., & Ali, R. (2013). Dietary Sources of Lutein and Zeaxanthin Carotenoids and Their Role in Eye Health. *Nutrients*, 5(4), 1169–1185. <https://doi.org/10.3390/nu5041169>
- Al-Kahtani, S. N. (2017). Fatty acids and B vitamins contents in honey bee collected pollen in relation to botanical origin. *Scientific Journal of King Faisal University*, 18(2), 41–48.
- Aličić, D., Flanjak, I., Ačkar, Đ., Jašić, M., Babić, J., & Šubarić, D. (2020). Physicochemical properties and antioxidant capacity of bee pollen collected in Tuzla Canton (B&H). *Journal of Central European Agriculture*, 21(1), 42–50. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/21.1.2533>
- Altunatmaz, S. S., Tarhan, D., Aksu, F., Barutçu, U. B., & Or, M. E. (2017). Mineral element and heavy metal (cadmium, lead and arsenic) levels of bee pollen in Turkey. *Food Science and Technology*, 37(suppl 1), 136–141. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.36016>
- Anjos, O., Paula, V., Delgado, T., & Estevinho, L. (2019). Influence of the storage conditions on the quality of bee pollen. *Zemdirbyste-Agriculture*, 106(1), 87–94. <https://doi.org/10.13080/z-a.2019.106.012>
- Arien, Y., Dag, A., Zarchin, S., Masci, T., & Shafir, S. (2015). Omega - 3 deficiency impairs honey bee learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), 15761–15766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517375112>
- Aylanc, V., Falcão, S. I., Ertoşun, S., & Vilas-Boas, M. (2021). From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 109(January), 464–481. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.042>
- Babu, S., & Jayaraman, S. (2020). An update on  $\beta$ -sitosterol: A potential herbal nutraceutical for diabetic management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110702. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110702>
- Barajas Gómez, J. J., Castañeda Ovando, A., Contreras López, E., Martínez Torres, E., Añorve Morga, J., González Olivares, L. G., & Jaimez Ordaz, J. (2016). Estudio de la degradación de ácidos grasos sometidos a estrés térmico. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 14–19.
- BARAJAS, J., CORTES-RODRIGUEZ, M., & RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E. (2012). Effect of temperature on the drying process of bee pollen from two zones of

- colombia. *Journal of Food Process Engineering*, 35(1), 134–148. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00577.x>
- Baran, M. T., Miziak, P., & Bonio, K. (2020). Characteristics of carotenoids and their use in the cosmetics industry. *Journal of Education, Health and Sport*, 10(7), 192–196. <https://doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.07.020>
- Belina-Aldemita, M. D., Opper, C., Schreiner, M., & D'Amico, S. (2019). Nutritional composition of pot-pollen produced by stingless bees (*Tetragonula biroi* Friese) from the Philippines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103215. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.04.003>
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154–161. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>
- Conte, G., Benelli, G., Serra, A., Signorini, F., Bientinesi, M., Nicolella, C., Mele, M., & Canale, A. (2017). Lipid characterization of chestnut and willow honeybee - Collected pollen: Impact of freeze - Drying and microwave-assisted drying. *Journal of Food Composition and Analysis*, 55, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.11.001>
- De-Melo, A. A. M., Estevinho, L. M., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., Freitas, A. da S. de, Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. de. (2018). A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Bioscience*, 25(July), 91–110. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.001>
- Djuricic, I., & Calder, P. C. (2021). Beneficial outcomes of Omega-6 and Omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. *Nutrients*, 13(7), 2421. <https://doi.org/10.3390/nu13072421>
- Dong, J., Yang, Y., Wang, X., & Zhang, H. (2015). Fatty acid profiles of 20 species of monofloral bee pollen from China. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 503–511. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1173427>
- Duarte, A. W. F., Vasconcelos, M. R. dos S., Oda-Souza, M., Oliveira, F. F. de, & López, A. M. Q. (2018). Honey and bee pollen produced by Meliponini (Apidae) in Alagoas, Brazil: multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. *Food Science and Technology*, 38(3), 493–503. <https://doi.org/10.1590/fst.09317>
- Estevinho, L. M., Dias, T., & Anjos, O. (2019). Influence of the storage conditions (frozen vs. dried) in health - Related lipid indexes and antioxidants of bee pollen. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(2), 1800393. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800393>
- FAO. (2010). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos. In *Estudio FAO alimentación y nutrición*. <https://doi.org/978-92-5-3067336>
- Feás, X., Vázquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., & Iglesias, A. (2012). Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17(7), 8359–8377. <https://doi.org/10.3390/molecules17078359>
- Fuenmayor B., C., Zuluaga D., C., Díaz M., C., Quicazán de C., M., Cosio, M., & Mannino, S. (2014). Evaluation of the physicochemical and functional

- properties of Colombian bee pollen. *Rev.MVZ Córdoba*, 19(1), 4003–4014.
- Fuenmayor, C. A. (2009). *Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para el desarrollo de un suplemento nutricional proteico* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://doi.org/10.1038/132817a0>
- Gardana, C., Del Bo', C., Quicazán, M. C., Correa, A. R., & Simonetti, P. (2018). Nutrients, phytochemicals and botanical origin of commercial bee pollen from different geographical areas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.07.009>
- Ghosh, S., & Jung, C. (2020). Changes in nutritional composition from bee pollen to pollen patty used in bumblebee rearing. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(3), 701–708. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.04.008>
- Giordano, E., & Visioli, F. (2014). Long-chain omega 3 fatty acids: Molecular bases of potential antioxidant actions. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 90, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.11.002>
- Gómez Candela, C., Bermejo López, L. M., & Loria Kohen, V. (2011). Importancia del equilibrio del índice omega-6/omega-3 en el mantenimiento de un buen estado de salud. recomendaciones nutricionales. *Nutricion Hospitalaria*, 26(2), 323–329. <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.2.5117>
- Irwin, J. W., & Hedges, N. (2004). Measuring lipid oxidation. In *Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food* (pp. 289–316). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781855739024.2.289>
- Isik, A., Ozdemir, M., & Doymaz, I. (2019). Effect of hot air drying on quality characteristics and physicochemical properties of bee pollen. *Food Science and Technology*, 39(1), 224–231. <https://doi.org/10.1590/fst.02818>
- Jarukas, L., Kuraite, G., Barauskaite, J., Marksa, M., Bezruk, I., & Ivanauskas, L. (2020). Optimization and validation of the GC/FID method for the quantification of fatty acids in bee products. *Applied Sciences*, 11(1), 83. <https://doi.org/10.3390/app11010083>
- Kanar, Y., & Mazi, B. G. (2019). Effect of different drying methods on antioxidant characteristics of bee - Pollen. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(4), 3376–3386. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00283-5>
- Karkar, B., Şahin, S., & Güneş, M. E. (2021). Evaluation of antioxidant properties and determination of phenolic and carotenoid profiles of chestnut bee pollen collected from Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 765–774. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1844462>
- Kaškonienė, V., Adaškevičiūtė, V., Kaškonas, P., Mickienė, R., & Maruška, A. (2020). Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen. *Food Bioscience*, 34, 100532. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100532>
- Keskin, M., & Özkök, A. (2020). Effects of drying techniques on chemical composition and volatile constituents of bee pollen. *Czech Journal of Food Sciences*, 38(No. 4), 203–208. <https://doi.org/10.17221/79/2020-CJFS>
- Kostić, A. Ž., Pešić, M. B., Trbović, D., Petronijević, R., Dramićanin, A. M.,

- Miljković-Opsenica, D. M., & Tešić, Ž. L. (2017). The fatty acid profile of Serbian bee - Collected pollen – A chemotaxonomic and nutritional approach. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 533–542. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1356206>
- Kraus, S., Monchanin, C., Gomez-Moracho, T., & Lihoreau, M. (2019). Insect Diet. In *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1–9). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6\\_1137-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_1137-1)
- Leger, T., Azarnoush, K., Traoré, A., Cassagnes, L., Rigaudière, J.-P., Jouve, C., Pagès, G., Bouvier, D., Sapin, V., Pereira, B., Bonny, J.-M., & Demaison, L. (2019). Antioxidant and cardioprotective effects of EPA on early low - Severity sepsis through UCP3 and SIRT3 upholding of the mitochondrial redox potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2019/9710352>
- Li, Q., Liang, X., Zhao, L., Zhang, Z., Xue, X., Wang, K., & Wu, L. (2017). UPLC - Q - Exactive orbitrap/MS - Based lipidomics approach to characterize lipid extracts from bee pollen and their in vitro anti - Inflammatory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(32), 6848–6860. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02285>
- Liolios, V., Tananaki, C., Papaioannou, A., Kanelis, D., Rodopoulou, M.-A., & Argena, N. (2019). Mineral content in monofloral bee pollen: Investigation of the effect of the botanical and geographical origin. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 1674–1682. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00084-w>
- López-Casero, I. (2019). *Determinación de carotenoides en suero mediante hplc*. Universidad Complutense.
- Mărgăoan, R., Mărghițaș, L. A., Dezmirean, D. S., Dulf, F. V., Bunea, A., Socaci, S. A., & Bobiș, O. (2014). Predominant and secondary pollen botanical origins influence the carotenoid and fatty acid profile in fresh honeybee - Collected pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(27), 6306–6316. <https://doi.org/10.1021/jf5020318>
- Mărgăoan, R., Özkök, A., Keskin, Ş., Mayda, N., Urcan, A. C., & Cornea-Cipcigan, M. (2021). Bee collected pollen as a value-added product rich in bioactive compounds and unsaturated fatty acids: A comparative study from Turkey and Romania. *LWT*, 149(June), 111925. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111925>
- Mayda, N., Özkök, A., Ecem Bayram, N., Gerçek, Y. C., & Sorkun, K. (2020). Bee bread and bee pollen of different plant sources: Determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 1795–1809. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00427-y>
- Meléndez-Martínez, A. J. (2017). *Carotenoides en agroalimentación y salud* (P. Tapia (ed.); 1st ed.). Terracota, SA.
- Mesa, A. (2015). *Caracterización fisicoquímica y funcional del polen de abejas (Apis mellifera) como estrategia para generar valor agregado y parámetros de calidad al producto apícola*. Universidad Nacional de Colombia.
- Montenegro, G., Pizarro, R., Mejias, E., & Rodríguez, S. (2013). Biological evaluation of bee pollen from native Chilean plants. *Phyton*, 82(1), 7–14.

- <https://doi.org/10.32604/phyton.2013.82.007>
- Mozaffarieh, M., Sacu, S., & Wedrich, A. (2003). The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: A review based on controversial evidence. *Nutrition Journal*, 2(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-2-20>
- Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 11173–11187. <https://doi.org/10.3390/ijms130911173>
- Oliveira, D. de J., Rodrigues dos Santos, D., Andrade, B. R., Nascimento, A. S. do, Oliveira da Silva, M., da Cruz Mercês, C., Lucas, C. I. S., Cavalcante da Silva, S. M. P., Dib de Carvalho, P., Silva, F. de L., Estevinho, L. M., & Carvalho, C. A. L. de. (2021). Botanical origin, microbiological quality and physicochemical composition of the *Melipona scutellaris* pot - Pollen (“samburá”) from Bahia (Brazil) Region. *Journal of Apicultural Research*, 60(3), 457–469. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1797271>
- Ramírez Botero, C. M., Gómez Ramírez, B. D., Martínez Galán, J. P., Martínez Galán, J. P., & Cardona Zuleta, L. M. (2014). Perfil de ácidos grasos en aceites de cocina de mayor venta en Medellín-Colombia. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 16(2), 175–185. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.v16n2a05>
- Ramkumar, D. (2005). ¿Qué es la HPLC y Cómo Funciona? trabajar. *Educación Continuada En El Laboratorio Clínico*, 8(Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada), 49–62.
- Rodriguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. In *HarvestPlus Technical Monographs* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.3141/2068-08>
- Saenz de Viteri, M., Hernandez, M., Bilbao-Malavé, V., Fernandez-Robredo, P., González-Zamora, J., Garcia-Garcia, L., Ispizua, N., Recalde, S., & Garcia-Layana, A. (2020). A higher proportion of eicosapentaenoic acid (EPA) when combined with docosahexaenoic acid (DHA) in omega-3 dietary supplements provides higher antioxidant effects in human retinal cells. *Antioxidants*, 9(9), 828. <https://doi.org/10.3390/antiox9090828>
- Sagona, S., Pozzo, L., Peiretti, P. G., Biondi, C., Giusti, M., Gabriele, M., Pucci, L., & Felicioli, A. (2017). Palynological origin, chemical composition, lipid peroxidation and fatty acid profile of organic Tuscanian bee - Pollen. *Journal of Apicultural Research*, 56(2), 136–143. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1287995>
- Şahin, S., & Karkar, B. (2019). The antioxidant properties of the chestnut bee pollen extract and its preventive action against oxidatively induced damage in DNA bases. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12888>
- Salazar-González, C. Y., Rodríguez-Pulido, F. J., Stinco, C. M., Terrab, A., Díaz-Moreno, C., Fuenmayor, C., & Heredia, F. J. (2020). Carotenoid profile determination of bee pollen by advanced digital image analysis. *Computers and*

- Electronics in Agriculture*, 175(May), 105601.  
<https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105601>
- Salazar-González, C. Y., Rodríguez-Pulido, F. J., Terrab, A., Díaz-Moreno, C., Fuenmayor, C. A., & Heredia, F. J. (2018). Analysis of multifloral bee pollen pellets by advanced digital imaging applied to functional food ingredients. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(4), 328–335. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0695-9>
- Salazar, C., Céspedes, C., & Díaz, C. (2013). Propiedades bioactivas y antioxidantes de polen apícola proveniente del bosque alto-andino. *Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID*, 1–3.
- Sattler, J. A. G., de Melo, I. L. P., Granato, D., Araújo, E., da Silva de Freitas, A., Barth, O. M., Sattler, A., & de Almeida-Muradian, L. B. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Research International*, 77, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013>
- Simopoulos, A. P. (2010). The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: Health implications. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides*, 17(5), 267–275. <https://doi.org/10.1684/ocl.2010.0325>
- Soares de Arruda, V. A., Santos Pereira, A. A., Silva de Freitas, A., Barth, O. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2013). Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(2), 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.11.004>
- Stanley, J. C., Elsom, R. L., Calder, P. C., Griffin, B. A., Harris, W. S., Jebb, S. A., Lovegrove, J. A., Moore, C. S., Riemersma, R. A., & Sanders, T. A. B. (2007). UK Food Standards Agency Workshop Report: The effects of the dietary. *British Journal of Nutrition*, 98(6), 1305–1310. <https://doi.org/10.1017/S000711450784284X>
- Stinco, C. M., Benítez-González, A. M., Meléndez-Martínez, A. J., Hernanz, D., & Vicario, I. M. (2019). Simultaneous determination of dietary isoprenoids (carotenoids, chlorophylls and tocopherols) in human faeces by rapid resolution liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1583, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.010>
- Suárez Heredia, M. A., Morillo Reinoso, Y. M., Rosero, J. A., Haro Morales, G. J., & Ichau Espinoza, M. A. (2019). Eficiencia de encapsulación de carotenoides extraídos de *Capsicum annum* en nanopartículas de zeína. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 1(1), 47–52. <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.1017>
- Thakur, M., & Nanda, V. (2018). Assessment of physico-chemical properties, fatty acid, amino acid and mineral profile of bee pollen from India with a multivariate perspective. *Journal of Food and Nutrition Research*, 57(4), 328–340.
- Xu, X., Dong, J., Mu, X., & Sun, L. (2011). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil, carotenoids, squalene and sterols from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) bee pollen. *Food and Bioprocess Processing*, 89(1), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.03.003>
- Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., & Sun, P. (2013). Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*, 61(3), 708–718. <https://doi.org/10.1021/jf304056b>
- Yang, Y., Zhang, J., Zhou, Q., Wang, L., Huang, W., & Wang, R. (2019). Effect of ultrasonic and ball-milling treatment on cell wall, nutrients, and antioxidant capacity of rose ( *Rosa rugosa* ) bee pollen, and identification of bioactive components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(12), 5350–5357. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9774>
- Zuluaga-Domínguez, C., Castro-Mercado, L., & Cecilia-Quicazán, M. (2019). Effect of enzymatic hydrolysis on structural characteristics and bioactive composition of bee - Pollen. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(7), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13983>
- Zuluaga, C. M. (2015). *Valorización de polen apícola como alimento mediante el desarrollo de un proceso físico o biotecnológico*. Universidad Nacional de Colombia.