

Physicochemical characterization, antioxidant and antifungal activity of three stingless bee pollen aggregate (Apidae: Meliponini) from Soconusco, Chiapas

Caracterización fisicoquímica, actividad antioxidante y antifúngica de agregado de polen de tres especies de abejas (Apidae: Meliponini) provenientes del Soconusco, Chiapas

Víctor Albores-Flores, Erick Saavedra-Camacho, José Alfonso López-García, Julieta Grajales-Conesa, Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Boulevard Príncipe Akishino s/n. Colonia Solidaridad 2000. Tapachula Chiapas CP 30798, México; Liliana Carolina Córdova-Albores, Escuela de Agronomía, Universidad Dela Salle Bajío. Avenida Universidad #602, Colonia Lomas del Campestre, León, Guanajuato. CP 37150. Autor de correspondencia: jugrajco79@gmail.com.

Recibido: 29 de Septiembre, 2020.

Aceptado: 19 de Noviembre, 2020.

Albores-Flores V, Saavedra-Camacho E, López-García JA, Grajales-Conesa J and Córdova-Albores LC. 2021. Physicochemical characterization, antioxidant and antifungal activity of three stingless bee pollen aggregate (Apidae: Meliponini) from Soconusco, Chiapas. Mexican Journal of Phytopathology 39(1).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2009-4>

Primera publicación en línea: 12 de Diciembre, 2020.

First publication on line: December 12, 2020.

Resumen. La interacción planta-abeja puede generar productos de la colmena con diferentes características fisicoquímicas, bioactivos y actividad antimicrobiana. Por lo cual, en este trabajo se determinó la composición química de conglomerados o agregados de polen colectados de 12 colmenas establecidas en Chiapas, México, en los municipios

Abstract. Plants-bees interaction can generate bee-hive products with different physicochemical, bioactive and antimicrobial composition. Therefore, in this study we determined the physicochemical composition of pollen aggregates collected from 12 stingless bee-hives established in Chiapas, Mexico, from three different municipalities: Tapachula, Mazatán and Cacahoatán, and with three different species: *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona mexicana* and *Tetragonisca angustula*. We also evaluated the effect of pollen aggregate extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* growth. Our results showed differences in the physicochemical composition based on bee species. Pollen from *M. beecheii* registered the highest phenol content, flavonoids, and free acidity. These results, and the obtained from the antioxidant capacity (Trolox), glucose and pH, were associated with *in vitro* *C. gloeosporioides* growth. The fungus radial growth

Tapachula, Mazatán y Cacahoatán, dentro de tres meliponarios comerciales asociados a las especies: *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula*. Asimismo, se evaluó el efecto de los agregados de polen en *Colletotrichum gloeosporioides*. Se encontró una composición química muy diversa independientemente de la especie de abeja. El polen obtenido de colmenas con *M. beecheii* tuvieron la mayor cantidad de fenoles, flavonoides y acidez libre. Estas propiedades, en adición de la capacidad antioxidante (trolox), glucosa y pH, estuvieron asociados a la inhibición del crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides*. La velocidad de crecimiento radial del hongo durante nueve días fue de 0.013 a 0.009 mm h⁻¹ con extractos de polen, 44 % menor que el efecto del clorotalonil. La actividad antifúngica de los extractos de polen fue de 65 y 37 % para *M. beecheii*, 57 y 16 % para *T. angustula* y 60 y 30 % para *S. mexicana*, respecto al tratamiento testigo y a la dosis más alta de clorotalonil, respectivamente.

Palabras clave: Interacción, inhibición, compuestos bioactivos, agregados de polen, abejas sin aguijón.

Las abejas colectan productos de plantas que emplean para su crecimiento y desarrollo, siendo los más importantes el néctar, polen, resinas y, en algunos casos, aromas de flores requeridos en cortejo y apareamiento (Borkraâ y Sulaiman, 2010; Dötterl y Vereecken, 2010; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2015). Esta interacción planta y abeja genera a su vez productos con diferentes características físicoquímicas, sensoriales y capacidades bioactivas, los cuales dependen de la especie vegetal, condición nutricional, origen geográfico y de los grupos taxonómicos de especies de abejas. Entre las más estudiadas se encuentran *Apis mellifera*

rate during the nine-day study was 0.013-0.009 mm h⁻¹ with pollen extracts, which was equivalent to 44% lower value than chlorothalonil. The antifungal activity of pollen extracts depends on bee species; for *M. beecheii* we registered 65 and 37%, for *T. angustula* 57 and 16%, and for *S. mexicana* 60 and 30%, which were higher than the chlorothalonil fungicide.

Key words: Interaction, inhibition, hive products, pollen aggregate, stingless bees.

Bees collect plant products that they use for their growth and development; among the most important products are nectar, pollen, resins, and, in some cases, scent of flowers required in courtship and mating (Borkraâ and Sulaiman, 2010; Dötterl and Vereecken, 2010; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2015). The plant-bee interaction leads in turn to the development of products with different physicochemical and sensory characteristics, as well as bioactive capacities, which depend on the plant species, nutritional conditions, geographical origin, and taxonomic group of the bee species. The species that have been studied the most are *Apis mellifera* (Apidae:Apinae) and meliponines (Apidae: Meliponini), which are stingless bees from tropics and subtropics (Ayala *et al.* 2013; Komosinska *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2016).

Since ancient times, beehive products of different species have been used as exchange material, divine offerings, and in the treatment of various diseases (Borkraâ and Sulaiman, 2010). Currently, because of their properties, beehive products have diverse uses, for example, in diabetic foot and wound treatment, as antioxidant and anti-inflammatory, antimicrobial activity, among others (Molan and Bets, 2004; Basim *et al.*, 2006; Vit *et al.* 2008; Grajales-Conesa *et al.*, 2018). On the other

(Apidae:Apinae) y los meliponinos (Apidae: Meliponini), abejas sin aguijón de trópicos y subtrópicos (Ayala *et al.* 2013; Komosinska *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2016).

Desde épocas ancestrales, los productos de colmena de diversas especies de abejas se han empleado como material de intercambio y ofrendarios divinos, así como en el tratamiento de diversas enfermedades (Borkraã y Sulaiman, 2010). Actualmente, sus productos tienen diversos usos médicos, incluyendo tratamiento de pie diabético y heridas, antioxidante, antiinflamatorio y actividad antimicrobiana (Molan y Bets, 2004; Basim *et al.*, 2006; Vit *et al.* 2008; Grajales-Conesa *et al.*, 2018). Por otra parte, estudios recientes con productos de abejas sin aguijón, han demostrado que estos promueven mayor tasa de epitelización en heridas y efecto antiinflamatorio y antimicrobiano que la abeja europea o melífera (Rao *et al.*, 2016). La actividad antimicrobiana se ha evaluado *in vitro* contra distintas bacterias de importancia médica: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* y diferentes especies fungosas del género *Candida* (Cabrera y Montenegro 2013; Zainol *et al.*, 2013; Vit *et al.*, 2016). Extractos metanólicos y etanólicos de polen, así como mieles de *A. mellifera* y de diversas especies de abejas sin aguijón han tenido efectiva actividad antimicrobiana contra hongos de interés médico y agrícola: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *C. gloeosporioides* (Cabrera y Montenegro 2013; Albores-Flores *et al.*, 2018). De los productos de colmena, el polen está compuesto por subproductos del gametangio masculino floral que colectan las abejas y cuenta con un alto contenido nutricional, constituido por carbohidratos (13 y 55%), proteínas (10 y 40%), lípidos (1-10%) y fibra cruda (0.3 y 20%), además de minerales, oligoelementos, vitaminas,

hand, recent studies with stingless bee products have shown a higher rate of epithelialization in wounds and greater anti-inflammatory and antimicrobial effects than those of European or honeybees (Rao *et al.*, 2016). The antimicrobial activity has been evaluated *in vitro* against different medically important bacteria: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, and different fungal species of the *Candida* genus (Cabrera and Montenegro 2013; Zainol *et al.*, 2013; Vit *et al.*, 2016). Methanolic and ethanolic extracts of pollen, as well as honey of *A. mellifera* and different stingless bee species, have shown an effective antimicrobial activity against fungi of medical and agricultural interest: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *C. gloeosporioides* (Cabrera and Montenegro 2013; Albores-Flores *et al.*, 2018). Of the beehive products, pollen is made up of by-products of the floral male gametangium collected by bees and has a high nutritional content, which is constituted by carbohydrates (13 and 55%), proteins (10 and 40%), lipids (1-10%) and raw fiber (0.3 and 20%), as well as minerals, oligoelements, vitamins, carotenoids, phenolic compounds, flavonoids, sterols and terpenes (Bogdanov, 2004). Besides being a source of food for bees, the pollen aggregate is also important in the human diet (Pascoal *et al.*, 2014).

In Soconusco, Chiapas, Mexico, meliponiculture is practiced in areas adjacent to crops, especially coffee (*Coffea* spp.), mango (*Mangifera indica*), rambutan (*Nephelium lappaceum*) and banana (*Musa* spp.). Several studies have been conducted to characterize the beehive products of the stingless bee species that are most widely bred in the region, such as: *Melipona beecheii*, *M. solani*, *Scaptotrigona mexicana* and *Tetragonisca angustula* (Grajales-Conesa *et al.*, 2018; Espinoza-

carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, esteroides y terpenos (Bogdanov, 2004). Además de ser fuente alimenticia para las abejas, el agregado de polen es importante en la alimentación humana (Pascoal *et al.*, 2014).

En el Soconusco, Chiapas, la meliponicultura se realiza en zonas aledañas a cultivos de la región, siendo café (*Coffea* spp.), mango (*Mangifera indica*), rambután (*Nephelium lappaceum*) y banano (*Musa* spp.) los principales. Se han desarrollado diversos estudios para caracterizar los productos de colmena de especies de abejas sin aguijón mayormente cultivadas en esta región, tales como: *Melipona beecheii*, *M. solani*, *Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula* (Grajales-Conesa *et al.*, 2018; Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Albores-Flores *et al.*, 2018).

Por otro lado, *Colletotrichum gloeosporioides* es la especie fungosa más frecuente que causa antracnosis a nivel de campo y postcosecha en frutales y hortalizas (Beltrán y García, 2006; Chacini *et al.*, 2013). A pesar de prácticas de manejo específicas para evitar la incidencia de esta enfermedad, incluyendo aplicación de fungicidas de contacto y sistémicos, no se ha logrado disminuir pérdidas de cosecha y postcosecha superiores al 40 y 60%, respectivamente (Huerta *et al.*, 2009; Trinidad-Ángel, 2017). Por la condición tropical y subtropical del Soconusco, la incidencia de este hongo es frecuente en cultivos de la región, principalmente frutícolas (Huerta *et al.*, 2009).

Por lo anterior, es necesario desarrollar estudios de eficacia biológica de nuevos productos con potencial para el control de *C. gloeosporioides* y que además representen una alternativa para los sistemas de producción orgánica. Este trabajo complementa estudios previos del efecto antifúngico a partir de extractos de miel producidas por las especies de abejas sin aguijón *M. beecheii*, *M. solani* y *S. mexicana* del Soconusco (Albores-

Toledo *et al.*, 2018; Albores-Flores *et al.*, 2018).

On the other hand, *Colletotrichum gloeosporioides* is the fungal species most frequently reported to cause anthracnose in fruit trees and vegetables, in the field and postharvest (Beltrán and García, 2006; Chacini *et al.*, 2013). Despite the specific management practices used to prevent the incidence of this disease, which include application of contact and systemic fungicides, it has not been possible to reduce harvest and postharvest losses of more than 40 and 60%, respectively (Huerta *et al.*, 2009; Trinidad-Ángel, 2017). Because of the tropical and subtropical conditions that prevail in Soconusco, the incidence of this fungus is frequent in crops, especially fruit crops (Huerta *et al.*, 2009).

Based on the above, it is necessary to conduct studies to evaluate the biological effectiveness of new products to control *C. gloeosporioides* and which also provide an alternative for organic production systems. This study complements previous research on the antifungal effect using honey extracts of the stingless bee species *M. beecheii*, *M. solani* and *S. mexicana* collected in Soconusco (Albores-Flores *et al.* 2018). This research was focused on characterizing extracts of pollen aggregates at the physicochemical level and identifying potential bioactive compounds with antifungal effects on *C. gloeosporioides*, using material collected in commercial beehives of *M. beecheii*, *S. mexicana* and *Tetragonisca angustula*, a species whose effects on the fungus had not been previously studied.

MATERIALS AND METHODS

Samples of aggregates of pollen of stingless bees.

Samples of pollen aggregates from commercial beehives of three stingless bee species (*M. beecheii*,

Flores *et al.*, 2018). Esta investigación se enfocó en caracterizar extractos de agregados de polen a nivel fisicoquímico e identificar potenciales compuestos bioactivos con efecto antifúngico contra *C. gloeosporioides* a partir de material colectado de colmenas comerciales de *M. beecheii*, *S. mexicana* y *Tetragonisca angustula*, una especie no estudiada previamente respecto al hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de agregados de polen de abeja sin aguijón. Las muestras de agregados de polen de colmenas comerciales de tres especies de abejas sin aguijón *M. beecheii*, *S. mexicana* y *T. angustula* se colectaron de febrero 2017 a febrero de 2018. La identificación de especies se basó en trabajos previos regionales y con información taxonómica de la subfamilia (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Ayala *et al.* 2013). La localización de colmenas, número de muestras por especie y fechas de colecta se indican en el Cuadro 1. Las muestras de agregados de polen se colectaron con pinzas estériles de cajas racionales (cajas de abejas) y después se colocaron en frascos de plástico estériles previamente etiquetados con la información correspondiente. Las

S. mexicana and *T. angustula*) were collected from February 2017 to February 2018. The species were identified based on previous regional studies and using taxonomic information of the subfamily (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Ayala *et al.* 2013). The location of the beehives, number of samples per species and dates of collection are shown in Table 1. The pollen aggregate samples were collected using sterile forceps from rational boxes (bee boxes) and then placed in sterile plastic jars that were previously labeled with the corresponding information. The samples were concentrated and stored at -4 °C at the Biosciences Institute of the Autonomous University of Chiapas, in Tapachula.

Physicochemical analysis. The samples were determined in triplicate using the methods described by the AOAC (2003) and the following parameters: humidity (method 969.38), ashes (945.38), pH (method 962.19) and free acidity (method 962.19). The determination of free acidity was carried out according to Bogdanov (2002) and AOAC (2003) by potentiometric titration with an alkaline buffer up to pH 8.5.

Extraction of total phenols. For this, the protocol of Carpes *et al.* (2007) with modifications was used.

Cuadro 1. Especie de abeja melipona, número y ubicación de meliponarios comerciales y la composición vegetal predominante en el área de las colmenas muestreadas en Chiapas, México.

Table 1. Stingless bee species, number, and location of commercial meliponine beekeepers, and plant composition that prevails in the area of Chiapas, Mexico, where beehives were sampled.

Especie (número meliponarios)	Clave de Muestra	Establecimiento de la colmena	Fecha de colecta de polen	Tipo agroecológico (predominante)
<i>Tetragonisca angustula</i> (n=3)	TA1	Mazatán	Febrero 2017	Frutales (mango)
	TA2	Rancho San Juan, Mazatán	Abril 2017	
	TA3	Rancho San Juan, Mazatán	Junio 2017	
<i>Scaptotrigona mexicana</i> (n=6)	SM1	Cacahoatán	Mayo 2017	Frutales (rambután)
	SM2	Tapachula	Mayo 2017	
	SM3-SM6	Mazatán	Agosto 2017	
<i>Melipona beecheii</i> (n=3)	MB1-MB3	Estancia Agroecológica "Ayol"	Enero-Febrero 2018	Agrícola (temporal)

muestras se concentraron y almacenaron a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, Tapachula.

Análisis fisicoquímico. Se determinaron por triplicado usando métodos descritos por la AOAC (2003) con los siguientes parámetros: humedad (método 969.38), cenizas (945.38), pH (método 962.19) y acidez libre (método 962.19). La determinación de acidez libre se realizó según Bogdanov (2002) y AOAC (2003) mediante la valoración potenciométrica con un buffer alcalino hasta pH 8.5.

Extracción de fenoles totales. Se utilizó el protocolo modificado de Carpes *et al.* (2007). La preparación de solución de agregado de polen se realizó colocando 1g de agregado en 5 mL de metanol:agua (1:1) a pH 2. Para flavonoides se utilizó etanol al 80% dejando en reposo por 24 h.

Análisis del contenido de fenoles. Se determinó por el método de Restrepo *et al.* (2009) con el reactivo Folin Ciocalteu. A partir del extracto de agregado de polen se tomó 1 mL para preparar concentraciones a 25, 50, 75 y 100 %. Cada concentración se mezcló con 500 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10 con agua y se añadió 400 μL de Na_2CO_3 . La mezcla se mantuvo en oscuridad total durante 15 min para propiciar la reacción. Posteriormente, se registró la absorbancia a 765 nm. Una mezcla de metanol:agua (1:1) se empleó como blanco (testigo). Se realizó la curva de calibración para estimar el contenido de polifenoles con una solución de ácido gálico a las concentraciones 0, 50, 100, 150, 200, 250 mg L^{-1} en una solución de metanol:agua (1:1). Los resultados del contenido total de polifenoles se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por cada 1 g de agregado de polen.

To prepare the pollen aggregates solution, 1 g of aggregate was mixed with 5 mL of methanol:water (1:1), pH 2. For flavonoids, 80% ethanol left to stand for 24 h was used.

Analysis of phenols content. It was determined following the method of Restrepo *et al.* (2009) with the Folin Ciocalteu reagent. From the extract of pollen aggregates, 1 mL was taken to prepare concentrations at 25, 50, 75 and 100%. Each concentration was mixed with 500 μL of Folin-Ciocalteu reagent diluted with water 1/10, to which 400 μL of Na_2CO_3 were added. The mixture was kept in total darkness for 15 min to promote the reaction. Later, the absorbance was recorded at 765 nm. A mixture of methanol:water (1:1) was used as blank (control). The calibration curve to estimate the polyphenols content was created with a solution at concentrations of 0, 50, 100, 150, 200, 250 mg L^{-1} in a methanol:water solution (1:1). The results of the total polyphenols content were expressed in equivalent mg of gallic acid per each 1 g of pollen aggregate.

Analysis of flavonoids content. It was determined using the technique of Restrepo *et al.* (2009). For this, quercetin dihydrate was used as a standard (1 mg mL^{-1}). The calibration curve was built with a quercetin/methanol solution at different concentrations: 0, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01 mg mL^{-1} . Afterwards, potassium acetate and aluminum trichloride were added, and the solution was kept in total darkness for 30 min. The absorbance was recorded at 415 nm.

Antioxidant capacity. To quantify the antioxidant activity, a discoloration of the radical 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) was carried out following the ABTS methodology

Análisis del contenido de flavonoides. Se determinó por la técnica de Restrepo *et al.* (2009). Para esto se empleó dihidrato de quercetina como estándar (1 mg mL⁻¹). Se realizó una curva de calibración con una solución de quercetina/metanol a diferentes concentraciones: 0, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01 mg mL⁻¹. Posteriormente se añadió acetato de potasio y tricloruro de aluminio y se dejó en oscuridad total durante 30 min. La absorbancia se registró a 415 nm.

Capacidad antioxidante. La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó mediante la decoloración del radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) con la metodología ABTS (Overveld *et al.*, 2000). Los extractos resultantes de los agregados de polen, a concentraciones 25, 50, 75 y 100 %, se adicionaron con 20 mL de ABTS (2 mM) y 80 µL de persulfato de potasio 70 mM. Se dejaron en reposo y oscuridad a 25 °C durante 16 h para producir el radical ABTS+. La absorbancia ($\lambda = 734$ nm) de la solución se ajustó a 0.800 ± 0.03 unidades de absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Modelo 4001/4) con ayuda de una solución reguladora de fosfatos 0.01 M (Na₂PHO₄+KH₂PO₄+NaCl+KCl en 1000 mL de agua destilada; pH 7.4 ajustado con NaOH). Para la construcción de la curva de calibración se agregaron 990 µL de la solución diluida de ABTS+ y se adicionaron 10 µL de solución Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) a diferentes concentraciones (0-400 µM en metanol al 80 % v/v). Después de 6 min de reposo, la absorbancia se leyó a 734 nm empleando metanol al 80% v/v como blanco. Los resultados se expresaron como la capacidad antioxidante equivalente a Trolox por g de extracto de polen.

Actividad antifúngica. La cepa de *C. gloeosporioides*, perteneciente a la colección del Instituto de

(Overveld *et al.*, 2000). The extracts obtained from pollen aggregates, at concentrations of 25, 50, 75 and 100%, were added with 20 mL of ABTS (2 mM) and 80 µL of potassium persulfate 70 mM. They were left to stand in darkness at 25 °C for 16 h to produce the ABTS+ radical. The solution absorbance ($\lambda = 734$ nm) was adjusted to 0.800 ± 0.03 absorbance units in a spectrophotometer (Thermo Scientific Model 4001/4), using a 0.01 M phosphate buffer (Na₂PHO₄+KH₂PO₄+NaCl+KCl in 1000 mL of distilled water; pH 7.4 adjusted with NaOH). To obtain the calibration curve, 900 µL of the diluted solution of ABTS+ and 10 µL of Trolox solution (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchrome-2-carboxylic acid) were added at different concentrations (0-400 µM in 80% v/v methanol). After 6 min standing, the absorbance was recorded at 734 nm using 80% v/v methanol as blank. The results were expressed as the antioxidant capacity equivalent to Trolox per g of pollen extract.

Antifungal activity. The *C. gloeosporioides* strain, belonging to the collection of the Biosciences Institute, isolated from *Carica papaya* fruits, and morphologically identified by Víctor Albores (unpublished data), was reactivated in potato-dextrose-agar (PDA) nutrient medium. The antifungal activity was evaluated by mixing methanolic extracts of the collected pollen aggregates of each bee species with PDA *in vitro*. The treatments, in triplicate, consisted of mixtures of 100 µL of extracts at 25, 50, 75 and 100% with 20 mL of PDA that was previously prepared. After sowing the strain in 0.5 cm colonial disks in the middle of 52 mm Petri dishes, it was incubated at 32 °C in a stove for 12 days. Mycelial growth was measured every 24 h with a Vernier caliper 0-150 mm capacity for nine days. The *C. gloeosporioides* colony growth in PDA under the same experimental conditions was used as the absolute control. The

Biociencias, aislada de frutos de *Carica papaya* e identificada morfológicamente por Víctor Albores (Datos no publicados), se reactivó en medio nutritivo papa dextrosa agar (PDA). La actividad antifúngica se evaluó mezclando extractos metanólicos de agregados de polen colectados de cada especie de abeja con PDA *in vitro*. Los tratamientos, por triplicado, consistieron en mezclas de 100 µL de extractos a 25, 50, 75 y 100 % con 20 mL de PDA previamente preparado. Posterior a la siembra de la cepa, consistente en discos coloniales de 0.5 cm colocadas al centro de cajas Petri de 52 mm, se incubó a 32 °C en una estufa durante 12 días. El crecimiento micelial se midió cada 24 h con un Vernier con capacidad de 0-150 mm durante nueve días. Como testigo absoluto se empleó el crecimiento de una colonia de *C. gloeosporioides* en PDA bajo las mismas condiciones experimentales. Los testigos relativos de inhibición, por triplicado, fueron: 1) solución de metanol/agua, 2) clorotalonil a 21 mg mL⁻¹ y 3) clorotalonil a 56 mg mL⁻¹, estos dos últimos acordes a dosis comerciales aplicadas al cultivo de *C. papaya* por la Asociación de fruticultores del Soconusco, Chiapas.

La velocidad de crecimiento absoluto. Se determinó mediante la siguiente ecuación: $\mu = (Db - Da) / (tb - ta)$. Donde: μ es velocidad de crecimiento de colonia (mm día⁻¹); Db es el diámetro de la colonia (mm) en el tiempo b ; Da , corresponde al diámetro de la colonia en el tiempo a , y, tb y ta es el tiempo de crecimiento absoluto entre dos evaluaciones. Para el cálculo comparativo del crecimiento de *C. gloeosporioides* de los cuatro extractos (1-4) respecto a los testigos relativos (1-3) se utilizó la siguiente ecuación: $DFC = [(D \text{ testigo relativo}_{1,3} - D \text{ extracto}_{1,4}) / (D \text{ testigo relativo}_{1,3})] \times 100$. Donde, DFC es la diferencia en el diámetro (mm) de la colonia entre el D testigo relativo_{1,3} y el D extracto del agregado de polen_{1,4} expresado en porcentaje.

inhibition relative controls, in triplicate, were: 1) methanol/water, 2) chlorothalonil at 21 mg mL⁻¹, and 3) chlorothalonil at 56 mg mL⁻¹; the last two according to commercial doses applied to *C. papaya* crops by the Asociación de Fruticultores del Soconusco, Chiapas.

Rate of absolute growth. It was determined using the following equation: $\mu = (Db - Da) / (tb - ta)$. Where: M is the rate of the colony growth (mm day⁻¹); Db is the diameter of the colony (mm) in time b ; Da corresponds to the diameter of the colony in time a ; and tb and ta is the time of absolute growth between two evaluations. For the comparative calculation of *C. gloeosporioides* growth in the four extracts (1-4) with respect to the relative controls (1-3), the following equation was used: $DFC = [(D \text{ relative control}_{1,3} - D \text{ extract}_{1,4}) / (D \text{ relative control}_{1,3})] \times 100$. Where, DFC is the difference in the diameter of the colony (mm) divided by D relative control_{1,3} and D extract of the pollen aggregate_{1,4} expressed as percent.

Analysis of data. The data of all the physicochemical variables were subjected to a multivariate analysis of variance (MANOVA), considering each species-collection as a treatment. The media comparison was carried out using Hotelling's test ($\alpha=0.05$). To determine the separation or groups of collections and species, a linear discriminant analysis (LDA) was performed. A principal component analysis (PCA) was carried out to explain the relative weight of the physicochemical variables in the composition of the pollen aggregates within and among species. The relationship of the mycelial growth with phenols, flavonoids, Trolox and the antioxidant activity was estimated using r-Spearman. An ANOVA analysis by bee species and growth evaluation date was conducted in order to compare the effect of the four concentrations of extracts of pollen aggregates

Análisis de datos. Los datos de todas las variables fisicoquímicas se analizaron por análisis de varianza multivariado (AMOVA) considerando cada especie-colecta como un tratamiento. La comparación de medias se realizó por la prueba Hotelling ($\alpha=0.05$). Para determinar la separación o agrupación de colectas y especies se utilizó un análisis discriminante (ADL). Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para explicar el peso relativo de las variables fisicoquímicas en la composición de los agregados de polen dentro y entre especies. La relación del crecimiento micelial con fenoles, flavonoides, Trolox y actividad antioxidante se estimó con r-Spearman. Se realizó un análisis ANOVA por especie de abeja y fecha de evaluación del crecimiento para comparar el efecto de las cuatro concentraciones de extractos de agregados de polen con los testigos relativos. Todos los análisis se realizaron en INFOSTAT.

RESULTADOS

El resultado del análisis fisicoquímico de agregados de polen colectado por *M. beecheii*, *S. mexicana* y *T. angustula* se observa en el Cuadro 2. De manera general, los valores de humedad fueron de 12.2 a 31.4%, cenizas de 0.9 a 5.9%, pH estuvo en rango de 2.2 a 3.5, acidez libre de 117 a 233.4 meq Kg⁻¹, fenoles de 1.2 a 2.6 mg EAG g⁻¹, flavonoides de 0.9 a 3.1 µg EQ g⁻¹, trolox de 4.3 a 8.1 mg Trolox g⁻¹ y en concentración de glucosa de 0.01 a 0.3 mg L⁻¹. En el análisis multivariado se encontró significancia de la especie de abeja-colecta en el contenido fisicoquímico ($p=0.0001$). Todas las combinaciones especie-colecta fueron estadísticamente diferentes ($p=0.05$), observándose que los valores multivariados fueron mayores en *M. beecheii* y menores para *T. angustula*. La cantidad de fenoles y flavonoides estuvieron relacionadas

with the relative controls. All the analyses were conducted in INFOSTAT.

RESULTS

The result of the physicochemical analysis of pollen aggregates collected by *M. beecheii*, *S. mexicana* and *T. angustula* is shown in Table 2. Overall, the humidity values ranged from 12.2 to 31.4%, ashes from 0.9 to 5.9%, pH from 2.2 to 3.5, free acidity from 117 to 233.4 meq Kg⁻¹, phenols from 1.2 to 2.6 mg EAG g⁻¹, flavonoids from 0.9 to 3.1 µg EQ g⁻¹, Trolox from 4.3 a 8.1 mg, Trolox g⁻¹, and the concentration of glucose from 0.01 a 0.3 mg L⁻¹. The multivariate analysis was significant on bee species in the physicochemical content ($p=0.0001$). All the species-collection combinations were statistically different ($p=0.05$); *M. beecheii* had the highest values, while *T. angustula* had the lowest. The amount of phenols and flavonoids were positively related to the antifungal activity ($p\leq 0.02$), while the antioxidant capacity (Trolox) had a negative r-Spearman (-0.41 a -0.61) (Table 3). In most of the extracts associated with *S. mexicana* and *M. beecheii* species, the antioxidant activity had a negative correlation with the antifungal activity.

The discriminant analysis explained 91.1% of variance in the first two components, CAN 1 (80%) and CAN 2 (11.1%). The greatest weight in CAN 1 corresponded to phenols, flavonoids, and free acidity. The formation of groups clearly included the three replications of each species-collection but there was significant variation between intra and inter-species collections. According to MANOVA, the collections from *M. beecheii* beehives were separated from the other collections and distributed across the positive dimension of CAN 1. The other two species-collections were distributed across CAN 2, which had the greatest weight of pH, ashes,

Cuadro 2. Valores fisicoquímicos del polen colectado por *Melipona beecheii* (Mb), *Scaptotrigona mexicana* (Sm) y *Tetragonisca angustula* (Tar) en diferentes regiones del Soconusco, Chiapas.

Table 2. Physicochemical values of pollen collected by *Melipona beecheii* (Mb), *Scaptotrigona mexicana* (Sm) and *Tetragonisca angustula* (Tar) in different regions of Soconusco, Chiapas.

Clave de muestra	pH	Humedad (%)	Cenizas (%)	Variables fisicoquímicas					
				Acidez Libre (meq kg ⁻¹)	Trolox (mg g ⁻¹)	Fenoles (mg EAG g ⁻¹)	Flavonoides (mg EQ g ⁻¹)	Glucosa (mg L ⁻¹)	Prueba hotelling
MB1	2.2	31.4	0.9	127.1	6.8	2.2	1.8	0.04	C
MB2	2.6	19.6	1.1	233.3	5.8	2.6	2.9	0.1	B
MB3	2.5	12.2	3.4	206.2	6.4	2.5	3.1	0.01	A
TA1	3.3	21.1	2.5	126.6	7.9	1.9	1.3	0.2	J
TA2	3.4	24.7	4.1	146.4	7.4	1.8	1.7	0.2	K
TA3	3.3	26.2	3.9	133.2	8.0	2.2	1.6	0.3	L
SM1	3.3	30.6	1.8	142.8	7.4	1.2	1.5	0.1	F
SM2	3.3	27.0	2.1	159.9	6.8	1.5	1.2	0.01	E
SM3	3.5	12.2	2.4	146.4	8.1	1.4	1.3	0.02	D
SM4	3.3	23.7	2.8	117.9	4.3	1.3	1.0	0.3	I
SM5	3.5	27.5	5.9	183.1	5.3	2.1	1.1	0.06	H
SM6	3.5	24.3	3.4	129.9	5.5	2.0	0.9	0.03	G

*La información de referencia de cada muestra de extracto de polen se describe en el Cuadro 1. ♦ *The reference information of each sample of pollen extract is described in Table 1.

positivamente con la actividad antifúngica ($p \leq 0.02$), mientras que la capacidad antioxidante (Trolox) tuvo una r-Spearman negativa (-0.41 a -0.61) (Cuadro 3). En la mayoría de los extractos asociados a la especie *S. mexicana* y *M. beecheii*, la actividad antioxidante presentó correlación negativa con la actividad antifúngica.

Con el análisis discriminante se explicó el 91.1% de varianza en los primeros dos componentes, CAN 1 (80%) y CAN 2 (11.1%). El mayor peso en CAN 1 lo aportaron fenoles, flavonoides y acidez libre. La conformación de grupos incluyó claramente las tres repeticiones por cada especie-colecta, pero mostró amplia variación entre colectas intra- e inter-especie. En concordancia con MANOVA, las colectas correspondientes a colmenas de *M. beecheii* se separaron del resto distribuyéndose en la dimensión positiva de CAN 1. En CAN 2, con un mayor peso de pH, cenizas y glucosa, se distribuyeron las otras dos especies-colectas, siendo *S. mexicana* la que tuvo mayor dispersión (Figura 1A).

and glucose; *S. mexicana* had the highest dispersion (Figure 1A).

The analysis of main components explained 58% of the multivariate variance (CP1=43.5; CP2=14.8%) in the two first components. CP1 was mainly explained by flavonoids, pH, and free acidity, while CP2 was determined by ashes and glucose. Phenols had similar weight in both components (Figure 1B). The projection of the collections in this multivariate space unmarked *M. beecheii* samples from beehives established in an agroecological area where annual agricultural crops prevail (MB3 and MB2). The remaining collections had low dispersion regarding low values of CP1 and CP2.

Antifungal activity. The three bee species and four methanolic extracts that were evaluated showed *C. gloeosporioides* inhibition compared to the controls. From day three of incubation and up to the end, at day nine, statistical differences were observed in the fungus mycelial growth compared to the

Cuadro 3. Valores del coeficiente de correlación entre la concentración de fenoles, flavonoides y Trolox con la actividad antifúngica de los extractos de polen de cada especie de abeja.
Table 3. Values of the correlation coefficient among the concentration of phenols, flavonoids and Trolox with the antifungal activity of pollen extracts from each bee species.

Clave de Muestra	Fenoles		Flavonoides		Trolox	
	Spearman	Valor p	Spearman	Valor p	Spearman	Valor p
MB1	0.82	<0.0001	0.77	0.0018	-0.51	0.0154
MB2	0.86	<0.0001	0.81	0.0001	-0.46	0.0525
MB3	0.86	<0.0001	0.80	0.0001	-0.51	0.0154
TA1	0.74	0.0012	0.76	0.0018	-0.44	0.0722
TA2	0.74	0.0012	0.72	0.0032	-0.42	0.0915
TA3	0.78	0.0001	0.70	0.0040	-0.41	0.1458
SM1	0.80	<0.0001	0.70	0.0040	-0.44	0.0722
SM2	0.80	<0.0001	0.70	0.0040	-0.51	0.0154
SM3	0.81	<0.0001	0.66	0.0051	-0.42	0.0915
SM4	0.88	<0.0001	0.62	0.0073	-0.61	0.0003
SM5	0.91	<0.0001	0.62	0.0073	-0.55	0.0083
SM6	0.88	<0.0001	0.58	0.0241	-0.56	0.0083

[∇]La información de referencia de cada muestra de extracto de polen se describe en el Cuadro 1. [♦]The reference information of each pollen extract sample is described in Table 1.

Con el análisis de componentes principales, los primeros dos componentes explicaron el 58% de la varianza multivariada (CP1=43.5; CP2=14.8%). CP1 fue explicado principalmente por flavonoides, pH y acidez libre, mientras que CP2 estuvo determinado por cenizas y glucosa. Fenoles tuvo similar peso en ambos componentes (Figura 1B). La proyección de las colectas en este espacio multivariado desmarcó muestras de *M. beecheii* de colmenas establecidas en una estancia agroecológica con predominancia de cultivos anuales agrícolas (MB3 y MB2). El resto de colectas tuvieron poca dispersión en torno a valores bajos de CP1 y CP2.

Actividad antifúngica. En las tres especies de abejas y cuatro concentraciones evaluadas de extractos metanólicos se detectó inhibición de *C. gloeosporioides* respecto a los testigos. A partir del tercer día de incubación y hasta su término a los nueve días, se observaron diferencias estadísticas en el crecimiento micelial del hongo respecto

methanol-water ($p < 0.0001$) control. From day four onwards, the concentrations at 25, 50, 75 and 100% started to differentiate from the same control. The differences ranged from 20 to 64% depending on the growth time rather than the species (Figure 2). From day five or six, the concentrations at 75 and 100% exceeded or equaled the inhibitory effect of chlorothalonil at its highest concentration (56 mg mL⁻¹). The *S. mexicana* extracts at 50% were the only ones that also exceeded the inhibition caused by the fungicide at that concentration. The *T. angustula* extracts had the lowest effect compared to chlorothalonil because only at a concentration of 100% exceeded the highest doses (Figure 2). The collection-species had an effect on the fungus inhibitory capacity. For example, *M. beecheii* MB1 collection had a higher effect than MB1 and MB2 (Figure 3). When the final mycelial growth of the relative control was compared to that of the absolute control (5.1 cm), it was found that methanol/water (3.8 cm) reduced the fungus growth by 25.4% and

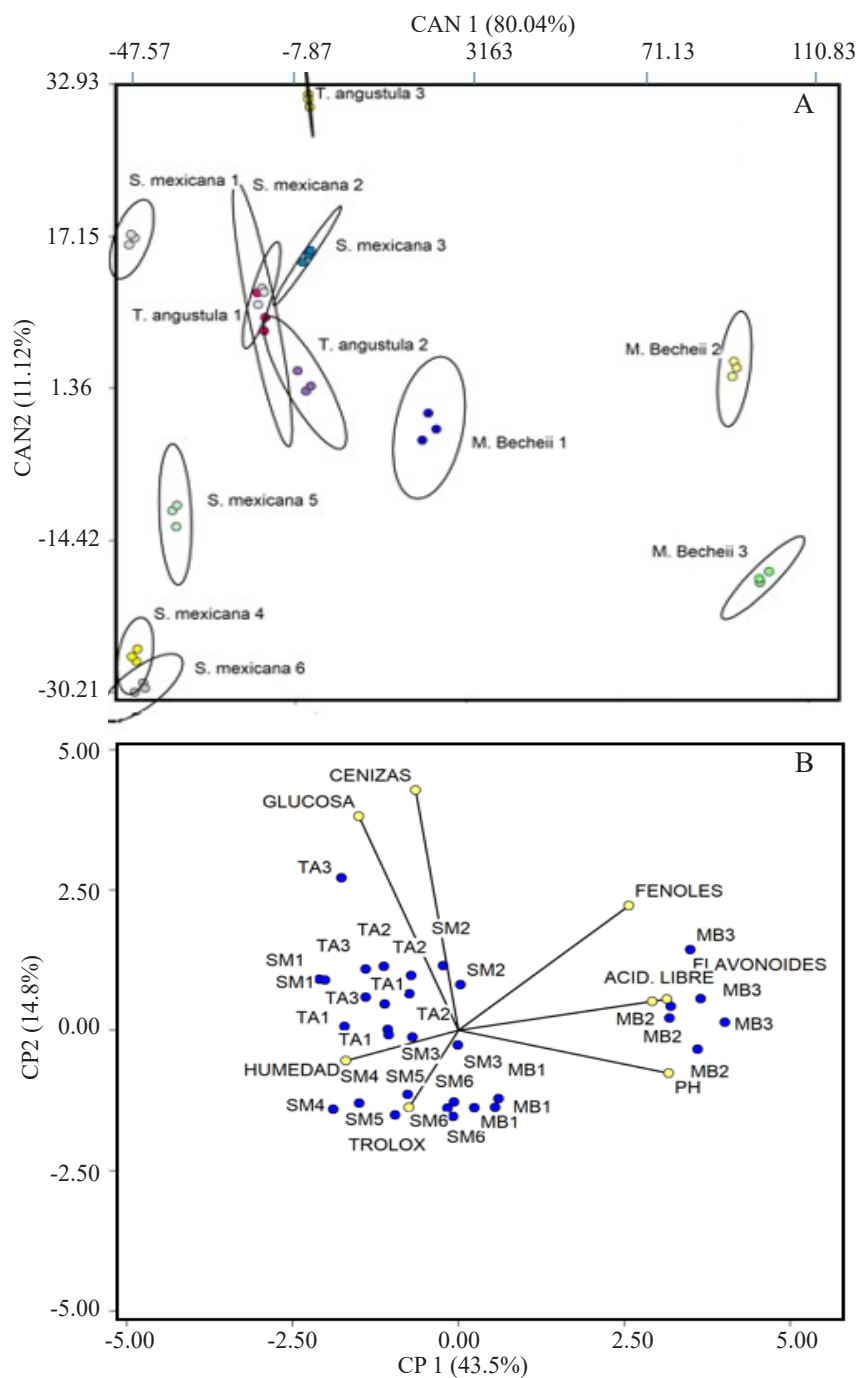


Figura 1. Análisis discriminante canónico para las tres especies de abeja colectoras de polen (A) y análisis de componentes principales de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de polen (B). La información de referencia de cada muestra de extracto de polen se describe en el Cuadro 1.

Figure 1. Canonical discriminant analysis of the three pollen collector bees (A) and analysis of the main components of the antimicrobial activity of the pollen methanolic extracts (B). The reference information of each pollen extract sample is described in Table 1.

al testigo metanol/agua ($p < 0.0001$) (Cuadro 4). Al cuarto día en adelante, las concentraciones 25, 50, 75 y 100% comenzaron a diferenciarse del mismo testigo. Las diferencias estuvieron en el rango 20-64% dependiendo del tiempo de crecimiento más que de la especie (Figura 2). Desde el quinto o sexto día, las concentraciones 75 y 100% superaron o igualaron el efecto inhibitorio del clorotalonil en su concentración más alta (56 mg mL⁻¹). Extractos de *S. mexicana* a 50% fueron los únicos que también superaron la inhibición causada por el fungicida a esa concentración. Los extractos de *T. angustula* fueron los que tuvieron el menor efecto respecto a clorotalonil ya que únicamente la concentración 100% superó la dosis alta (Figura 2). Se detectó un efecto colecta-especie en la capacidad inhibitoria

chlorothalonil by 35.3% (3.3 cm, 21 mg mL⁻¹) and 58.8% (2.1cm, 56 mg mL⁻¹). Overall, the rate of *C. gloeosporioides* mycelial growth ranged from 0.027-0.041, 0.022-0.037, 0.012-0.025, and 0.009-0.013 mm h⁻¹ at concentrations of 25, 50, 75 and 100%, respectively.

DISCUSSION

The physicochemical composition of the pollen aggregates collected from commercial stingless bee beehives was heterogeneous at intra- and inter-species level because of the bees' territorial exploration capacity and pollen collection from different plant species (Table 1). However, it was

Cuadro 4. Valores de diferencia en diámetro de colonia (DFC) de *Colletotrichum gloeosporioides* (expresados en valores de porcentaje) entre los extractos de polen colectados por las abejas y los tratamientos testigo (clorotalonil=Clor). (Se colocan únicamente en las concentraciones donde los extractos de polen de cada especie de abeja son menores en tamaño de colonia a la mayoría de los tratamientos testigo, los valores positivos indican que el diámetro de colonia con los extractos fue menor al testigo).

Table 4. Difference values in (DFC) *Colletotrichum gloeosporioides* colony diameter (expressed as percent values) among the pollen extracts collected by bees and the control treatments (chlorothalonil=Clor). (They are placed only at the concentrations where the pollen extracts of each bee species whose colony size is smaller than most of the control treatments, and the positive values indicate that the colony diameter with the extracts was smaller than that of the control).

Clave de muestra	Extracto	Metanol/ agua (E-a)	Clor (21 mg mL ⁻¹) (E-b)	Clor (56 mg mL ⁻¹) (E-c)	Clave de muestra	Extracto	Metanol/ agua (E-a)	Clor (21 mg mL ⁻¹) (E-b)	Clor (56 mg mL ⁻¹) (E-c)
MB1	75	51.9	40.4	14.4	SM1	75	48.1	35.7	7.6
	100	65.5	56.5	37.5		100	57.0	45.8	22.1
MB2	75	60.9	51.5	30.3	SM2	75	46.1	33.3	4.0
	100	65.6	56.6	37.6		100	57.7	46.6	23.3
MB3	75	58.2	48.2	25.6	SM3	75	49.4	37.3	9.8
	100	64.2	54.9	35.1		100	60.3	49.9	28.1
TA1	75	42.8	29.1	-1.9	SM4	75	53.3	42.1	16.8
	100	54.7	42.9	17.9		100	62.4	52.7	32.0
TA2	75	43.5	29.9	-0.7	SM5	75	54.2	43.2	18.4
	100	53.1	40.8	14.9		100	62.8	53.1	32.6
TA3	75	39.7	25.2	-7.5	SM6	75	56.2	45.7	22.0
	100	53.1	40.8	14.9		100	61.8	51.8	30.7

²La información de referencia de cada muestra de extracto de polen se describe en el Cuadro 1. ♦ ²The reference information of each pollen extract sample is described in Table 1.

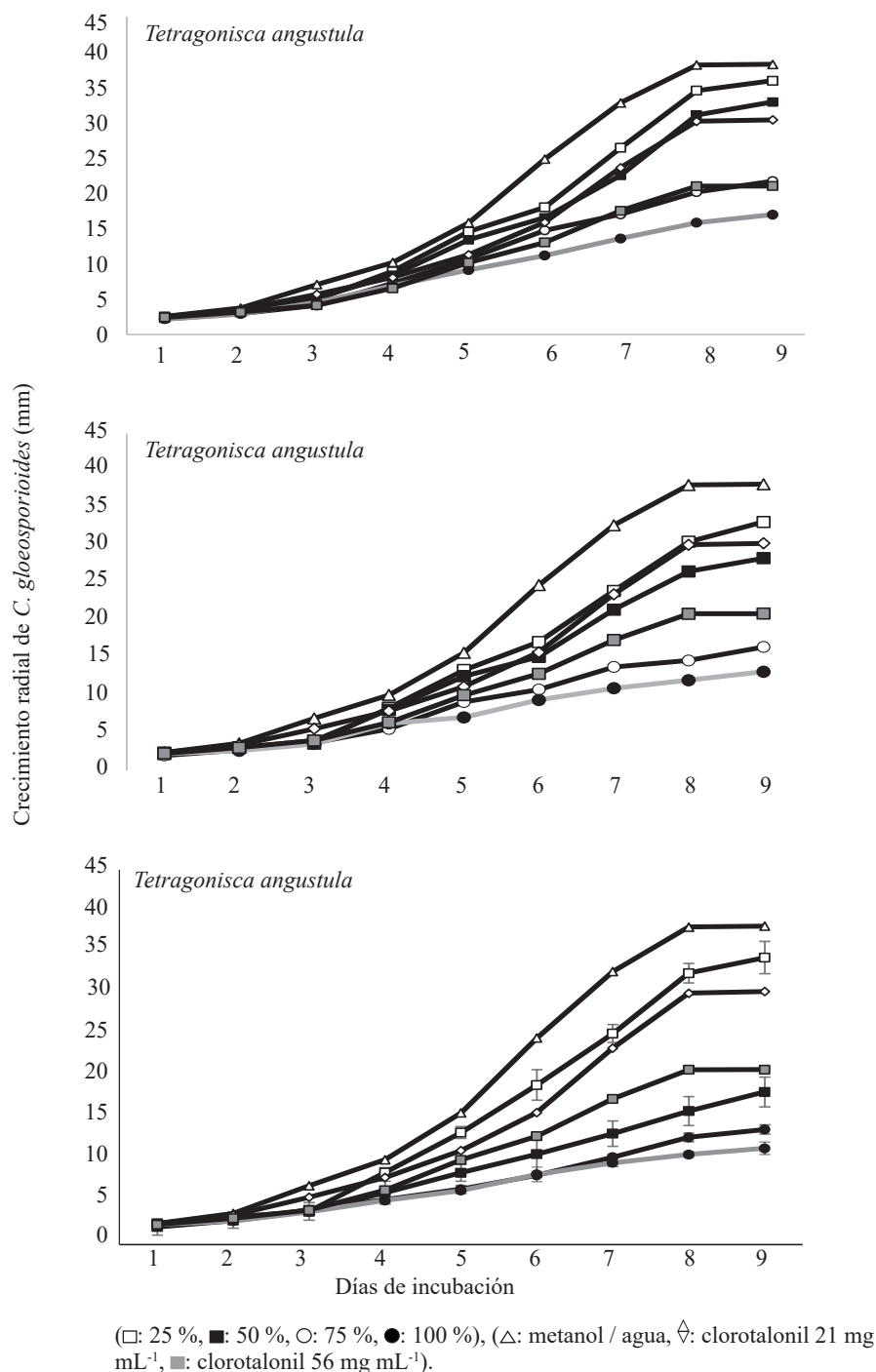


Figura 2. Valores promedio del crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* en presencia de extracto metanólico a diferentes concentraciones de agregado de polen de *Melipona beecheii* (Mb), *Scaptotrigona mexicana* (Sm) y *Tetragonisca angustula* (Ta).

Figure 2. Average values of *Colletotrichum gloeosporioides* growth *in vitro* in the presence of methanolic extract at different concentrations of pollen aggregates of *Melipona beecheii* (Mb), *Scaptotrigona mexicana* (Sm) and *Tetragonisca angustula* (Ta).

del hongo. Por ejemplo, la colecta MB1 de *M. beecheii* tuvo mayor efecto que MB1 y MB2 (Figura 3). Al comparar el crecimiento micelial final de los testigos relativos con el testigo absoluto (5.1 cm) se encontró que metanol/agua (3.8 cm) redujo el crecimiento del hongo en 25.4% y el clorotalonil en 35.3 % (3.3 cm, 21 mg mL⁻¹) y 58.8 % (2.1cm, 56 mg mL⁻¹). En general, la velocidad de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* estuvo en el rango de 0.027-0.041, 0.022-0.037, 0.012-0.025, y 0.009-0.013 mm h⁻¹ en las concentraciones 25, 50, 75 y 100%, respectivamente.

DISCUSIÓN

La composición fisicoquímica de los agregados de polen colectados de colmenas comerciales de abeja sin aguijón fue heterogénea a nivel intra- e inter-especie debido a la capacidad de exploración territorial de las abejas y a la recolección de polen

possible to classify the species in groups, observing that *M. beecheii* was segregated from the other species. The species effect can be associated with vegetal exploitation niches in order to prevent interspecific competence more than some metabolic effect. Previous reports indicate that this is a single-flower species which prefer fabaceae 45% in contrast with *M. solani* and *S. mexicana* (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018). The physicochemical composition at the pollen aggregates level has an implication in its quality, and nutritional, therapeutic, antioxidant and antimicrobial value (Mărgăoan *et al.*, 2010; Saavedra *et al.*, 2013). Physicochemical heterogeneity has also been reported in studies about honey produced by meliponines in Soconusco (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018), and the value of these attributes for ecological purposes has been recognized (Vit, 2008). The correlation from the physicochemical variables with the antioxidant capacity of the extracts of pollen aggregates suggests that phenols, flavonoids and free acidity

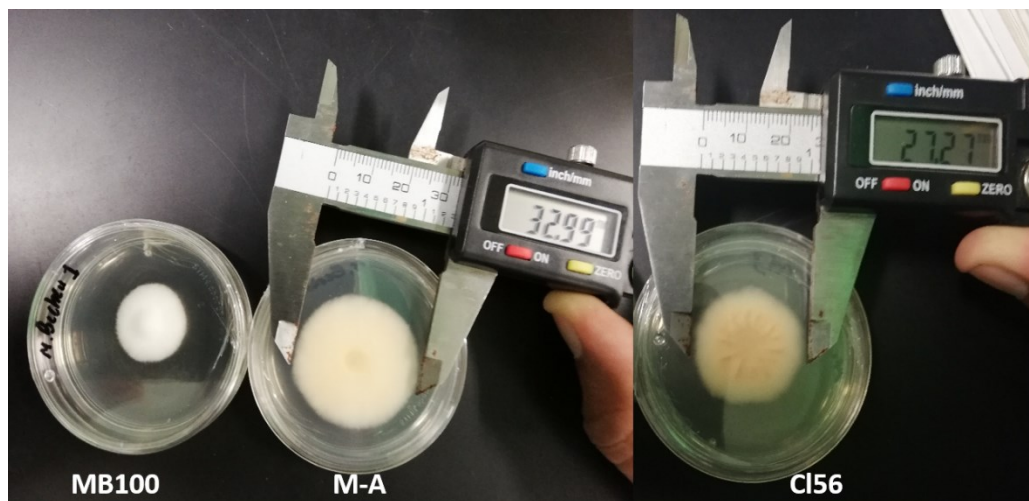


Figura 3. Crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* en presencia de extracto metanólico de agregado de polen de *Melipona beecheii* (MB100) (100%), así como los controles metanol/agua (M-A) y clorotalonil 56 mg mL⁻¹ (CI56).
Figure 3. *Colletotrichum gloeosporioides* growth *in vitro* in the presence of methanolic extract of *Melipona beecheii* (MB100) (100%) pollen aggregate, as well as the controls methanol/water (M-A) and chlorothalonil 56 mg mL⁻¹ (CI56).

de diferentes especies vegetales (Cuadro 1). Sin embargo, se pudieron clasificar las especies en grupos, observándose que *M. beechii* se segregó del resto de las especies. El efecto de especie puede estar asociado a nichos de explotación vegetal con el fin de evitar competencia interespecífica más que a algún efecto metabólico. Previamente se reportó que esta especie es monofloral con preferencia en fabáceas 45%, en contraste a *M. solani* y *S. mexicana* (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018). La composición fisicoquímica a nivel de agregados de polen tiene implicación en su calidad y valor nutrimental, terapéutico, antioxidante y antimicrobiano (Mărgăoan *et al.*, 2010; Saavedra *et al.*, 2013). La heterogeneidad fisicoquímica también se ha reportado en estudios de miel producida por meliponinos en el Soconusco (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018), y se ha reconocido el valor de estos atributos con fines ecológicos (Vit, 2008).

La correlación obtenida de las variables fisicoquímicas con la capacidad antioxidante de los extractos de agregados de polen sugiere que los fenoles, flavonoides y acidez libre ejercen mayor acción inhibitoria en el crecimiento micelial de *C. gloesporioides* (Cuadro 3) (Mărgăoan *et al.*, 2010). Lo anterior podría estar relacionado con el tipo de compuestos fenólicos extraídos de los agregados de polen, que no tengan la propiedad de ser donadores de electrones y sean ácidos, evitando reaccionar con el radical oxidado ABTS. Este compuesto actúa sobre polifenoles donadores de átomos de hidrógeno mientras que el complejo férrico en FRAP actúa sobre los polifenoles capaces de donar electrones (Schaich *et al.*, 2015). No se pudo atribuir que la capacidad oxidante observada en las muestras de extracto de agregado de polen de abeja sin guijón se deba a un componente en particular. La capacidad antioxidante es el resultado de la interacción entre moléculas que componen cada muestra (Paulino-Zunini *et al.*, 2010). Por lo anterior, la

exert a higher inhibitory action on *C. gloesporioides* mycelial growth (Table 3) (Mărgăoan *et al.*, 2010). This could be associated with the type of phenolic compounds extracted from pollen aggregates, which do not have the property of donating electrons and are acidic and prevent a reaction with the ABTS oxidized radical. This compound acts on polyphenols which donate hydrogen atoms, while the ferric complex in FRAP acts on polyphenols that can donate electrons (Schaich *et al.*, 2015). It was not possible to state that the oxidizing capacity observed in the samples of extracts of stingless bee pollen aggregate was caused by a component in particular. The antioxidant capacity is the result of the interaction between molecules that make up each sample (Paulino-Zunini *et al.*, 2010). Based on this, the low relationship obtained with the antifungal activity would be defined by diverse factors, such as the chemical composition of the sample, geographical region and plant from which the pollen was taken (Bertrams *et al.*, 2013; Duran *et al.*, 2011).

The lowest relationship between the antioxidant and antifungal capacity in the extracts of *T. angustula* pollen aggregates could be caused by the sample composition (Mărghitaș *et al.*, 2009). On the other hand, it could also be due to a methodological effect, since, according to the solvent, it is possible to determine what molecule was extracted (Muñoz *et al.*, 2015). The inhibitory effect of the extracts of pollen aggregates is consistent with other reports where it is recognized that the type of biomolecule and its bioactivity can vary making it possible to differentiate regions and taxa, but implying the sample effect (Pellati *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Ruíz-Montañez *et al.*, 2014).

The extracts of pollen aggregates showed a clear inhibitory effect on *C. gloesporioides* compared to chlorothalonil commercial fungicide. The inhibitory action in each extract of pollen

baja relación obtenida con la actividad antifúngica estaría definida por diversos factores como la composición química de la muestra, región geográfica y fuente vegetal del polen (Bertrams *et al.*, 2013; Duran *et al.*, 2011).

La menor relación entre la capacidad antioxidante y la antifúngica en extractos de agregado de polen de *T. angustula* puede deberse a la composición de la muestra (Mărghitaş *et al.*, 2009). Por otra parte, también puede haber un efecto metodológico ya que de acuerdo al solvente se puede determinar la molécula extraída (Muñoz *et al.*, 2015). El efecto inhibitorio de extractos de agregados de polen es consistente con otros reportes donde se reconoce que el tipo de biomolécula y su bioactividad puede ser variable permitiendo diferenciar regiones y taxas pero implicando el efecto de la muestra (Pellati *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Ruíz-Montañez *et al.*, 2014).

Los extractos de agregados de polen mostraron un claro efecto inhibitorio en *C. gloeosporioides* comparados con el fungicida comercial clorotalonil. La acción inhibitoria observada en cada extracto de agregado de polen estuvo asociada con la acción extractora del solvente y a la composición química de las muestras de polen. La concentración relativamente alta de compuestos fenólicos, en los cuales pueden estar incluidos terpenoides, fenilpropanoides, estilbenos y saponinas (Soto y Rosales, 2016), pueden estar implicados en la actividad antifúngica. Los extractos hidrofílicos de células vegetales están fuertemente relacionados con la inhibición del crecimiento celular y la germinación de conidios de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* y, además pueden ser tóxicos en procesos de respiración microbiana (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015). El 60% de extractos hidrofílicos presentan alta cantidad de flavonoides y fenoles (Pietarinen *et al.*, 2006; Okwu y Nnamdi, 2008).

aggregate was associated with the extracting action of the solvent and the chemical composition of the pollen samples. The relatively high concentration of phenolic compounds, which may include terpenoids, phenylpropanoids, stilbenes and saponins (Soto and Rosales, 2016), can be involved in the antifungal activity. The hydrophilic extracts of plant cells are strongly related to *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* cell growth inhibition and conidia germination and can also be toxic in microbial respiration processes (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015). 60% of hydrophilic extracts contain a large amount of flavonoids and phenols (Pietarinen *et al.*, 2006; Okwu and Nnamdi, 2008).

The antifungal property of the pollen aggregates collected by *A. mellifera* has been reported to inhibit up to 70% of mycelial growth in *Aspergillus niger* and 99.9% in *A. fumigatus* (Kacaniova *et al.*, 2012). Similar effects have been reported in *Alternaria*, *Botrytis* and *Fusarium* (Cabrera and Montenegro, 2013). Regarding antifungal properties of pollen aggregates associated with stingless bees, there are reports of *T. angustula* and 26% inhibition in *Candida albicans* (Rojas, 2015). In Soconusco, previous studies using meliponines honey showed 40% more effectiveness than chlorothalonil fungicide in *C. gloeosporioides* (Albores-Flores *et al.*, 2018). In contrast, these results, using extracts of pollen aggregates collected by the same species (*M. beecheii*, *S. mexicana*), had a higher effect up to 50% than the fungicide in high commercial doses (56 mg mL⁻¹), depending on the extract concentration. This study provides the first report of the antifungal properties of meliponines pollen aggregates. In particular, for Soconusco, Chiapas, stingless bees are an alternative for pollination of different economically important crops, besides honey, pollen aggregates and propolis are medical alternatives for treating diabetic ulcers, and are also

La propiedad antifúngica de agregados de polen colectadas por *A. mellifera* se ha reportado hasta en 70% de inhibición micelial en *Aspergillus niger* y 99.9% en *A. fumigatus* (Kacaniova *et al.*, 2012). Similares efectos se han reportado en *Alternaria*, *Botrytis* y *Fusarium* (Cabrera y Montenegro, 2013). Respecto a las propiedades antifúngicas de agregados de polen asociados a abeja sin aguijón, se tienen reportes con *T. angustula* e inhibición del 26% en *Candida albicans* (Rojas, 2015). En el Soconusco, estudios previos con mieles de meliponinos demostraron un efecto 40% mayor que el fungicida clorotalonil en *C. gloeosporioides* (Albores-Flores *et al.*, 2018). En contraste, estos resultados con extractos de agregados de polen colectados por las mismas especies (*M. beecheii*, *S. mexicana*) mostraron un efecto superior hasta del 50% en comparación con el fungicida en dosis comercial alta (56 mg mL⁻¹) dependiendo de la concentración del extracto. Este trabajo constituye el primer reporte sobre propiedades antifúngicas de agregados de polen de meliponinos. En particular, en el Soconusco, Chiapas, las abejas sin aguijón son una alternativa para la polinización de diversos cultivos de importancia económica, además de que la miel, los agregados de polen y propóleos son alternativas médicas para el tratamiento de úlceras diabéticas, así como en manejo en pre y postcosecha frutícola (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Albores-Flores *et al.*, 2018, Grajales-Conesa *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

En las muestras de agregados de polen, los valores observados de cada propiedad fisicoquímica estudiada oscilaron como sigue: pH: 2.2 a 3.5, humedad: 2 a 31%, cenizas: 0.9 a 5.9%, acidez libre: 117 a 133 meq kg⁻¹, fenoles: 1.4 a 2.6 mg EAG g⁻¹, flavonoides: 0.9 a 3.1 mg EQ g⁻¹, glucosa: 0.01 a

used in fruit crops pre- and postharvest processes (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Albores-Flores *et al.*, 2018, Grajales-Conesa *et al.*, 2018).

CONCLUSIONS

In the pollen aggregates samples, the values of each of the physicochemical properties that were evaluated ranged as follows: pH: 2.2 to 3.5, humidity: 2 to 31 %, ashes: 0.9 a 5.9 %, free acidity: 117 to 133 meq kg⁻¹, phenols: 1.4 to 2.6 mg EAG g⁻¹, flavonoids: 0.9 to 3.1 mg EQ g⁻¹, glucose: 0.01 to 0.3 mg L⁻¹ and Trolox: 4.3 to 8.0 mg g⁻¹. The highest values of pH, ashes, glucose and Trolox corresponded to *S. mexicana* and *T. angustula* species. The highest values of free acidity, phenols and flavonoids corresponded to *M. beecheii*.

The bioactive compounds of the pollen aggregates involved in the antifungal action were free acidity, phenols, and flavonoids. The inhibition values reached by *M. beecheii* were 38-66% higher in *C. gloeosporioides* than those of chlorothalonil.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

0.3 mg L<sup>-1</sup> y Trolox: 4.3 a 8.0 mg g<sup>-1</sup>. Los mayores valores de pH, cenizas, glucosa y Trolox, correspondieron a las especies de *S. mexicana* y *T. angustula*. Las que presentaron valores mayores de acidez libre, fenoles y flavonoides fueron las de *M. beecheii*.

Los compuestos bioactivos de los agregados de polen involucrados en la acción antifúngica fueron acidez libre, fenoles y flavonoides. La especie *M. beecheii* alcanzó valores de 38 a 66 % más inhibición de *C. gloeosporioides* comparado con el clorotalonil.



## LITERATURA CITADA

- Albores-Flores V, Marín SIM, López-García JA, Sánchez GA y Grajales-Conesa J. 2018. Propiedad antifúngica de mieles sobre el desarrollo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(3): 423–431. <http://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1805-3>
- Ayala R, González VH and Engel MS. 2013. Mexican stingless bees (Hymenoptera:Apidae): diversity, distribution, and indigenous Knowledge. In: Vit P, Pedro SR and Roubik D (eds.). Honey-Pot: A legacy of stingless bees. New York: Springer. 366p. [http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7\\_9](http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_9)
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2003. Methods of analysis. Washington, D.C. AOAC. [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjt55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1994521](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjt55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1994521)
- Basim E, Basim H and Özcan M. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. Journal of Food Engineering 77(4): 992–996. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.027>
- Beltrán CMC y García JDJ. 2006. *Colletotrichum gloeosporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición humana. Investigaciones Andinas 8(13): 73-80. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=239017515006>
- Bertrams J, Müller M, Kunz N, Kammerer D and Stintzing FC. 2013. Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. Journal of Applied Botany and Food Quality 86(1):143-153. <http://dx.doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.020>
- Bogdanov S. 2004. Quality and standards of pollen and beeswax. Apiacta 38: 334–341. [http://www.researchgate.net/publication/229041189\\_Quality\\_and\\_standards\\_of\\_pollen\\_and\\_beeswax](http://www.researchgate.net/publication/229041189_Quality_and_standards_of_pollen_and_beeswax)
- Bogdanov S. 2002. Harmonized Methods of the International Honey Commission. International Honey Commission. [http://www.researchgate.net/publication/285841406\\_Harmonised\\_methods\\_of\\_the\\_International\\_Honey\\_Commission](http://www.researchgate.net/publication/285841406_Harmonised_methods_of_the_International_Honey_Commission)
- Borkraâ L and Sulaiman S. 2010. Rediscovering the antibiotics of the hive. Recent patents on anti-effective drug discovery 4(3):2006-2013. <http://dx.doi.org/10.2174/157489109789318505>
- Cabrera C and Montenegro G. 2013. Pathogen control using a natural Chilean bee pollen extract of known botanical origin. Ciencia e Investigación Agraria 40(1): 223-230. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202013000100020>
- Carpes S, Begnini R, de Alencar S and Masson M. 2007. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. Ciência e Agrotecnologia 31(6): 1818-1825. <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n6/a32v31n6.pdf>
- Chacini C, Blanco M, Sanchez S y Acevedo I. 2013. Evaluación a nivel de laboratorio del efecto de 7 extractos vegetales para el control de *Colletotrichum* sp. agente causal de la antracnosis en el cultivo de tomate de árbol. Innovación 1(1): 30-35. <https://doi.org/10.15649/2346075X.214>
- Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO and Fett R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. Food Chemistry 196: 309–323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- Dötterl S and Vereecken N. 2010. The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. Canadian Journal of Zoology 88(7): 668-697. <http://dx.doi.org/10.1139/Z10-031>
- Duran N, Muz M, Culha G, Duran G and Ozer B. 2011. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. Parasitology Research 108(1):95-105. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2039-z>
- Espinoza-Toledo C, Vázquez-Ovando A, Torres de los Santos R, López García A, Albores-Flores V and Grajales-Conesa J. 2018. Stingless bee honeys from Soconusco, Chiapas: a complementary approach. Revista de Biología Tropical 66(4): 1536-1546. <http://dx.doi.org/10.15517/RBT.V66I4.32181>
- Grajales-Conesa J, Ibarias TC, Ruíz TJ y Sánchez D. 2018. Miel de abejas sin aguijón en el tratamiento de úlceras de pie diabético. Salud Pública de México 60:102-104. <http://doi.org/10.21149/8604>
- Huerta G, Holguin F, Benítez C y Toledo J. 2009. Epidemiología de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz and Sacc) en mango (*Mangifera indica* L.) CV. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27: 93-105. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v27n2/v27n2a2.pdf>
- Kacaniova M, Vuković N, Chlebo R, Haščík P, Rovná K, Cubon J and Pasternakiewicz A. 2012. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. Archives of Biological Sciences 64(3): 927–934. <http://doi.org/10.2298/ABS1203927K>
- Komosinska VK, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L and Olczyk K. 2015. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015: 1–6. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/297425>
- Li Y, Skouroumounis GK, Elsey GM and Taylor DK. 2011. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. Food Chemistry 129(2):570-6. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.068>
- Mărgăoan R, Mărgăitaş L, Dezmirean D, Mihai CM and Bobiş O. 2010. Bee collected pollen – general aspects and chemical composition. Bull UASVM Animal Science and Biotechnologies 67(1-2): 254-259. <file:///C:/Users/RMF/Downloads/5305-19198-1-PB.pdf>
- Mărgăitaş LA, Stanciu OG, Dezmirean DS, Bobiş O, Popescu O, Bogdanov S and Campos MG. 2009. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. Food Chemistry 115(3): 878-83. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.014>
- Molan P and Betts N. 2004. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. Journal of Wound Care 13: 353-356. <https://doi.org/10.12968/jowc.2004.13.9.26708>
- Muñoz CW, Chavez RW, Pabón LC, Rendón FMR, Patricia CM y Otálvaro AAM. 2015. Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*) Revista CENIC Ciencias Químicas 46: 38–46. <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181643224027.pdf>

- Okwu DE and Nnamdi FU. 2008. Evaluation of the chemical composition of *Dacryodes edulis* and *Raphia hookei* Mann and wendl exudates used in herbal medicine in South Eastern Nigeria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 5(2): 194-200. <http://doi.org/10.4314/ajtcam.v5i2.31273>
- Overveld FWPC, Haenen GRMM, Rhemrev J, Vermeiden JPW and Bast A. 2000. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chemico-Biological Interactions* 127(2): 151 – 161. [http://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00179-4](http://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00179-4)
- Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X and Estevinho L. 2014. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and antiinflamatorio. *Food and Chemical Toxicology* 63: 633-639. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.010>
- Paulino-Zunini M, Rojas C, De Paula S, Elingold I, Alvareda ME, Casanova MB, Iribarne RF, Aguilera MS and Dubin M. 2010. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern Uruguayan propolis extracts. *Journal of the Chilean Chemical Society* 55(1):141-146. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072010000100033>
- Pellati F, Orlandini G, Pinetti D and Benvenuti S. 2011. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55(5): 934-48. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.024>
- Pietarinen SP, Willfor SM, Vikstrom FA and Holmbom BR. 2006. Aspen knots, a rich source of flavonoids. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 26(3): 245 – 258. <http://doi.org/10.1080/02773810601023487>
- Rao PV, Krishnan KT, Salleh N and Gan SH. 2016. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26: 657-664. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.012>
- Restrepo SDC, Narváez CCE and Restrepo SPL. 2009. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez Santander, Colombia. *Química Nova* 32: 1517-1522. <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n6/30.pdf>
- Rodríguez-Maturino A R, Troncoso-Rojas R, Sánchez-Estrada A, González-Mendoza D, Ruíz-Sánchez E, Zamora-Bustillos R, Cece na-Duran, C, Grimaldo-Juarez O, Avilez-Marin M. 2015. Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de microbiología* 47(1): 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2014.12.005>
- Rojas YPM. 2015. Valoración *in vitro* del potencial antimicrobiano de extractos etanólicos de polen de *Apis mellifera* y de *Tetragonisca angustula*, en busca de posibles usos terapéuticos. Tesis magister. Universidad Nacional de Colombia 83 p. <http://bdigital.unal.edu.co/51696/1/yurleyapaolamonserraterojas.2015.pdf>
- Ruiz-Montañez G, Ragazo SJ, Calderón SM, Velázquez de la CG, Ramírez de LJ and Navarro OA. 2014. Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry* 159: 267-272. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.009>
- Saavedra CKI, Rojas IC y Delgado PGE. 2013. Características polínicas y composición química del polen apícola colectado de Cayaltí (Lambayeque-Perú). *Revista Chilena de Nutrición* 40: 71-78. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000100011>
- Schaich K, Tian X and Xie J. 2015. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods* 14: 111-25. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Soto GM y Rosales CM. 2016. Efecto del solvente y de la relación masa / solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas, Ciencia y Tecnología* 18(4): 701 – 714. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Trinidad-Ángel E, Ascencio VFJ, Ulloa JA, Ramírez RJC, Ragazzo SJA, Calderon SM y Bautista RPU. 2017. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. Causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 19: 3953-3964. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v8nspe19/2007-0934-remexca-8-spe19-3953-en.pdf>
- Vit P, Gutiérrez MG, Titera D, Bednar M y Rodríguez-Malaver AJ. 2008. Mielles checas categorizadas según su actividad antioxidante. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 42(2): 237-244. <http://www.redalyc.org/pdf/535/53542209.pdf>
- Vit P. 2008 Review: valorization honey of stingless bees (Meliponini). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science* 50: 20-28.
- Vit P, Santiago B, Silva P, Ruíz J, Maza F, Peña M and Pérez E. 2016. Chemical and bioactive characterization of pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 28(2): 78-84. <http://doi.org/10.9755/ejfa.2015-05-245>
- Villanueva-Gutiérrez R, Roubik D and Porter-Bolland L. 2015. Bee-Plant interactions: Competition and phenology of flowers visited by bees. In: Islebe G, Calmé S, León-Cortés J, Schmook B. (eds). *Biodiversity and conservation of the Yucatán Peninsula*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-06529-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06529-8_6)
- Zainol M, Mohd K and Mohd Y. 2013. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC complementary and alternative Medicine* 13(129): 1-10. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-13-129>