



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES
TOTALES, FLAVONOIDES Y ANTIOXIDANTES EN
EL POLEN FRESCO Y PAN DE LAS ABEJAS (*Apis
mellifera* L).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

FABIOLA AGUILAR GABAY

ASESOR:

MVZ. Ángel López Ramírez



MÉXICO, D. F.

Febrero,

2014

=

*Anoche cuando dormía
Soñé ¡bendita ilusión!
Que una colmena tenía
Dentro de mi corazón;
Y las doradas abejas
Iban fabricando en él
Con las amarguras viejas
Blanca cera y dulce miel*

Antonio Machado



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi madre:
Sra. Lucila Margarita Aguilar Gabay
por brindarme su apoyo, amor y comprensión

A la memoria de mi abuela:
Sra. Gloria Gabay Pacheco
por brindarme su amor, apoyo y cuidados

A mi hermano:
Mixtiani, por su ayuda y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por compartir los conocimientos.

Mi sincero agradecimiento a mi asesor
MVZ.. Ángel López Ramírez
por sus enseñanzas, orientación, paciencia y amistad, gracias

Fue un gran honor trabajar con usted
M. en C. Daniel Prieto Merlos
por brindarme sus enseñanzas, orientación, paciencia, amistad y sobre todo por
su valioso tiempo y experiencia, gracias

A los miembros del jurado
MVZ.. José Juan Martínez maya
MVZ.. Adriana Correa Benítez
QBP.. Carolina Castro Martínez
MVZ. Martha Silvia Reyes Cuayahuitl
por su interés, apoyo en la revisión y análisis de este trabajo, gracias

Al MVZ.. Andrés Castro Fuentes
por su asesoría técnica y apoyo, gracias

Al anexo de la Facultad de Química por haberme proporcionado las instalaciones
y aparatos para llevar a cabo esta investigación, gracias

A mis amigos y amigas:
Virginia, Yasmine, Jorge, Belinda, Cesar, Celestino, Jabir, Joel, Lázaro y muchos
más, por su amistad y apoyo que siempre me han brindado.

A mis compañeras de trabajo y amigas
Martha, Victoria, Verónica, Sandra, Fabiola, Patricia, por ser siempre mis amigas,
apoyarme y darme ánimos para seguir adelante, gracias por todo



CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	F
1.0 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Formación de aminoácidos aromáticos	3
1.2 Formación de compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides)	4
1.3 Origen de los granos de polen	6
1.4 Recolección y utilización del polen por las abejas	7
1.5 Métodos mencionados en la literatura para determinar la capacidad antioxidante	8
1.6 Justificación	9
1.7 Objetivo	9
1.8 Hipótesis	10
2.0 MATERIAL Y MÉTODOS	10
2.1 Localización del área de estudio	10
2.2 Preparación de las muestras del polen	10
2.3 Métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante	12
2.4 Análisis estadístico	15
3.0 RESULTADOS	16
4.0 DISCUSIÓN	17
5.0 CONCLUSIONES	19
6.0 REFERENCIAS	20
7.0 FIGURAS	22
8.0 CUADRO	34

RESUMEN

FABIOLA AGUILAR GABAY. Determinación del contenido de fenoles totales, flavonoides y antioxidantes en el polen fresco y pan de las abeja (*Apis mellifera* L). Bajo la dirección del MVZ. Ángel López Ramírez.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de fenoles totales y la capacidad antioxidante en el polen fresco y pan de abeja. Se utilizaron tres colmenas de donde se obtuvo el polen fresco de trampas tipo alza. El pan de abeja se obtuvo de panales de la cámara de cría de las mismas colmenas. La cantidad recolectada fue de 228 g. de polen fresco y 178.9 pan de abeja. Para evaluar la capacidad antioxidante se utilizaron los métodos: ácido 2,2- azino-bis(3-etilenbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), y el 2,2-difenil- 1 –picrilhidracilo (DPPH), y para determinar el contenido de fenoles totales se utilizó el método Folin-Ciocalteu

Para la extracción de los fenoles y antioxidantes se utilizó las técnicas de Soxhlet y macerado utilizando etanol 100% y 70% como diluyente.

Los datos fueron analizados por la prueba de t-Student. En los resultados obtenidos no se encontraron diferencias estadísticas significativas en la capacidad antioxidante en el polen fresco y pan de abejas con en el método DPPH: (t=2.7764; gl=4; P=0.3627), (t=2.7764; gl=4; P=0.6655), (t=2.7764; gl=4; P=0.3568), y ABTS: (t=2.7764; gl=4; P=0.4996), (t=2.7764; gl=4; P=0.1055), (t=2.7764; gl=4; P=0.2068), (t=2.7764; gl=4; P=0.4472), sin embargo, con el método DPPH, Soxhlet etanol 70% si hubo diferencia estadística (t=2.7764; gl=4; P=0.0005).

En la determinación de fenoles totales tampoco se encontraron diferencias significativas estadísticas: (t=2.7764; gl=4; P=0.4263), (t=2.7764; gl=4; P=0.8535), (t=2.7764; gl=4; P=0.0511), (t=2.7764; gl=4; P=0.4920).

Palabras clave: *Apis mellifera* L. / polen/ pan de abeja / antioxidantes / fenoles totales / flavonoides / DPPH / ABTS / Folin y Ciocalteu / Soxhlet

1.0 INTRODUCCION

La suma de todas las reacciones químicas que se generan en un organismo constituye el metabolismo, este se divide en catabolismo y anabolismo. La fotosíntesis, respiración, síntesis de proteínas y lípidos son reacciones anabólicas, ya que conducen a la síntesis de compuestos más complejos y utiliza la energía química almacenada de vías catabólicas.¹ Por otro lado, el catabolismo conduce a la descomposición de moléculas complejas para formar productos más simples, cumple dos funciones: poner a disponibilidad la materia prima a partir de la cual se pueden sintetizar otras moléculas y suministrar la energía química requerida para muchas actividades de la célula. Las moléculas empleadas por una célula poseen una estructura química compleja y deben sintetizarse paso a paso en secuencia iniciada con materia específica. Cada serie de reacciones químicas dentro de la célula se denomina vía metabólica. Los compuestos formados a lo largo de las vías metabólicas pueden generar productos que no tienen por sí mismos una función y a los cuales se les denominan intermediarios metabólicos o metabolitos.^{1,2}

Las plantas en sus rutas metabólicas generan diferentes tipos de metabolitos, y se dividen en primarios y secundarios. Los primarios son productos directos del metabolismo, tales como, fitoesteroles, nucleótidos, aminoácidos ácidos orgánicos y se encuentran en todas las plantas y realizan papeles metabólicos que son esenciales y evidentes. Mientras los secundarios son derivados de los primarios, no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo de la planta, es decir, no tienen función reconocida o directa en la fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos.^{3,4,5}

Los metabolitos secundarios también difieren de los primarios, tienen una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, un metabolito secundario determinado se

encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal⁵

Muchos metabolitos secundarios son empleados comercialmente como insecticidas, fungicidas y productos farmacéuticos, mientras otros son usados para fragancias, saborizantes, drogas medicinales y material industrial.⁵

Además, tienen normalmente una función ecológica importante, protegen a las plantas de la ingestión por herbívoros y de la infección por patógenos microbianos, sirven como atrayentes polinizadores y dispersadores de semillas y como agente en la competencia planta-planta.⁵

Las vías metabólicas de una célula están interconectadas en diferentes puntos, de modo que un compuesto generado en una vía se puede repartir en varias direcciones según las necesidades de las células en ese momento.⁵

A continuación se describirán de manera concisa las diferentes rutas metabólicas en donde se generan los sustratos para producir estos metabolitos secundarios.

1.1. Formación de aminoácidos aromáticos.

En las hojas de las plantas verdes, se encuentra una capa de células llamada mesófilo, es el tejido fotosintético más activo, en ella, se encuentran gran número de cloroplastos, los cuales son organelos limitados por doble membrana (membrana interna y externa), contienen clorofila asociada a proteínas, además, un tercer sistema de membranas organizados en sacos membranosos aplanados llamados tilacoides, que se disponen ordenadamente formando la grana (pila de monedas), y en estos sitios se realiza la fotosíntesis. La fotosíntesis convierte la luz del sol en energía y la almacena como glucosa, generada en el ciclo de Calvin o ciclo de las pentosas fosfato (última fase de la fotosíntesis). La energía luminosa dirige la síntesis de carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua, generando oxígeno (O₂) necesario para la respiración celular y la producción de más adenosín-trifosfato (ATP),⁵ esta ruta metabólica se lleva a cabo en el

citosol de la célula vegetal. Posteriormente, la glucosa formada en el ciclo de Calvin se dirige a la glucólisis (vía Embden-Meyerhoff), la cual representa una vía anabólica y se realiza parcialmente en el citosol de la célula.^{5,6}

En el curso de la degradación de la glucosa se produce adenosin trifosfato (ATP). En la ruta de la glucólisis se forma una molécula de seis átomos de carbono, (fructuosa-1,6-difosfato) que se transforma en dos triosas: dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, este paso se produce en el interior de los cloroplastos⁵ (Figura 1).

Posteriormente, los fragmentos de tres carbonos se oxidan a fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato, producto final de la glucólisis. El piruvato se dirige al ciclo de Krebs (ciclo del ácido tricarbóxicos), donde sufre una descarboxilación para formar acetil coenzima A y este entra a la ruta del ácido malónico, convirtiéndose en malonil coenzima A, continúa hacia la formación de policétidos para que al final se formen los compuestos fenólicos, además, puede dirigirse a la ruta del ácido mevalónico que forma los compuestos terpenoides. Otra de las rutas, es la pentosas fosfato que genera una tetrosa, (eritrosa 4-fosfato), esta vía se desarrolla en el citosol. El fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa 4-fosfato se dirigen a la ruta del ácido siquímico, a esta sustancia resultante se le incorpora una unidad más de fosfoenolpiruvato, el producto conduce en varios pasos al ácido corísmico. Después, esta vía se bifurca en dos ramas. Una de ellas, produce triptófano. La segunda conduce del ácido corísmico a ácido prefénico. Otra vía, es por medio del fenilpiruvato, del cual se obtiene la fenilalanina y tirosina y también del p-hidroxifenilpiruvato se produce tirosina (Figura 2). A estos tres aminoácidos se les conoce con el nombre de aminoácidos aromáticos y estos permiten la generación de los compuestos fenólicos⁷ (Figura 2).

1.2. Formación de compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides).

Existe una ruta básica implicada en la formación de compuestos fenólicos en las plantas: la vía del ácido siquímico, la cual es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los

fenoles y flavonoides. Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo heterogéneo de unos 10,000 compuestos. Estos compuestos tienen en común un anillo aromático que puede estar unido a grupos hidroxilos libres o combinados en forma de éster, éter, etc. Son químicamente un grupo diverso de sustancias que tienen varias funciones, protección contra herbívoros, patógenos, a la radiación de la luz ultravioleta y atracción a los diversos polinizadores. De acuerdo a su longitud y complejidad de sus cadenas, estos se categorizan dentro de cuatro grupos; a) fenoles simples, b) ácidos fenol carboxílicos, c) fenilpropanos y d) derivados del flavano (flavonoides). La mayor parte de los compuestos fenólicos de las plantas derivan de la fenilalanina por la eliminación de una molécula de amonio para formar ácido cinámico.⁵ Esta reacción es catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL), la reacción que cataliza es una etapa reguladora importante en la formación de muchos compuestos fenólicos. Después de esta reacción se forma el ácido trans-cinámico, el ácido p-cumárico, p-cumaroil-CoA y chalconas para producir al final el amplio grupo de los flavonoides⁵ (Figura 3).

Los flavonoides tienen un esqueleto carbonado básico que contiene 15 átomos de carbono ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos⁵ (Figura 4).

Se clasifican en flavonas, isoflavonas, flavonoles y antocianinas, en su esqueleto puede tener numerosos sustituyentes, los azúcares son muy comunes y de hecho los flavonoides existen naturalmente como glucósidos, sin embargo, puede tener otros sustituyentes como grupos metilésteres que producen un carácter lipofílico (hidrofóbicos).⁵

Las diferentes funciones que pueden tener los flavonoides incluyen los pigmentos coloreados de las plantas, ejemplo de esto son las antocianinas, responsables de la mayoría de los colores rojo, rosa, morado, y azul de las plantas. Debido a que colorean flores y frutos, las antocianinas son muy importantes en la atracción de animales para la polinización y la dispersión de las semillas. El color, desde luego, es un tipo de señal

usado por las flores para atraer a los polinizadores. Los compuestos volátiles, particularmente los monoterpenos, proporcionan los olores atractivos de las flores y frutos⁵ (Figura 5).

Los dos grupos de flavonoides que se encuentran en las flores son las flavonas y los flavonoles, estos generalmente absorben la luz a longitud de onda más corta que las antocianinas y son visibles para los humanos. Las abejas ven el rango ultravioleta del espectro, responden a flavonas y flavonoles como señales de atracción. Los flavonoles en una flor suelen formar patrones simétricos de rayas, manchas o círculos concéntricos llamadas guías de néctar que ayudan a los insectos a localizar el polen y néctar.⁵

1.3. Origen de los granos de polen.

Existen dos categorías de plantas con semilla: las gimnospermas (del griego “semilla desnuda”) y angiosperma (del griego “semilla encapsulada” o semilla contenida en un recipiente). Las gimnospermas son el grupo menos evolucionado se conocen unas 700 especies de gimnospermas. El grupo más grande de gimnospermas es el de las coníferas (“portadoras de conos”) que incluyen muchas especies de árboles comerciales importantes como el pino y el abeto. Las angiospermas, el tipo más evolucionado de las plantas con semilla, se hicieron más abundantes durante el periodo Cretácico, hace unos 100 millones de años. Hoy en día son el tipo dominante en la tierra. Se conocen unas 250,000 especies, aunque quedan muchas por caracterizar. La principal innovación de las angiospermas es la flor, por tanto, se refiere a ellas como plantas con flores.⁸

Dentro de la morfología de una flor existen órganos reproductores masculinos y femeninos. La parte masculina está conformada por el filamento y la antera que en conjunto forma el estambre. El carpelo formado por el estigma, estilo y ovario es la parte femenina de una flor. La antera tiene dos lóbulos longitudinales unidos por una banda de tejido. Cada lóbulo tiene dos sacos polínicos longitudinales dentro de los que se producen los granos de polen⁸ (Figura 6). Cada grano de polen tiene dos membranas que lo

protegen, la membrana externa, formada por un politerpeno denominada esporopolenina, llamada exina. La esporopolenina es una de las sustancias vegetales conocidas más resistentes a los agentes químicos y degradaciones enzimáticas. La membrana interna se denomina intina y está formada fundamentalmente por celulosa. Tiene diversos colores que son proporcionados por dos grupos de pigmentos en la exina: uno soluble en agua que son los flavonoides y uno soluble en grasa que son los derivados de carotenos (carotenoides y xantofilas)^{9,10,11} (Figura 7).

1.4. Recolección y utilización del polen por las abejas.

Existen diversas adaptaciones para la recolecta y transporte del polen, como los pelos plumosos en todo el cuerpo y la corbícula (depresión de la parte externa de la tibia del tercer par de patas, sólo se encuentra en las abejas obreras).^{12,13} Las abejas recolectan el polen directamente de las anteras de las flores con sus mandíbulas, o bien, los granos de polen pueden adherirse a su cuerpo, y posteriormente ser recogidos y transportados en las corbículas.^{12,14} Para formar las “pelotitas” de polen utilizan las patas delanteras, así como dos estructuras especializadas, la corbícula y el cepillo del polen (tercer par de patas), este último lo utilizan para recoger el polen adherido a los pelos de todo el cuerpo, así junto con las mandíbulas forman una “pelotita”, la cual es humedecida con miel o néctar que la abeja lleva en el buche melario, consiguiendo su aglutinación, posteriormente estas “pelotitas” son colocadas en las corbículas para transportarlas a la colmena^{15,16}(Figura 8).

Una vez en la colmena el polen es desprendido por otras abejas, generalmente jóvenes y lo depositan en la periferia de las celdas con cría, es depositado al interior de la celda empujándolo con la cabeza, lo compactan y le agregan miel. Una vez cubierta toda la celda de miel y polen se lleva a cabo una fermentación láctica causada por bacterias y levaduras. La gran cantidad de ácido láctico que se forma durante la fermentación (3-3.2%) contribuye a la conservación del producto y lo preserva en buen estado; sin

embargo, otros autores identificaron un ácido, el ácido fitocidal, el cual previene la germinación y deterioro de la posible actividad bacteriana, conservando el polen por meses. Se desconoce el sitio anatómico donde se secreta, pero parece ser que las glándulas hipofaríngeas son las causantes de su producción. El polen así almacenado y preservado bajo estas condiciones es conocido como “pan de las abejas” que es el alimento que se les proporciona a partir de los tres días de edad a las larvas de obreras y zánganos, y será uno de sus alimento de por vida¹⁰ (Figura 9).

Para las abejas adultas el pan de las abejas es necesario para poder fabricar las diferentes secreciones que ellas producen: jalea real, secreciones salivales y cera, además de ser imprescindible para el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas y para la formación de los cuerpos adiposos que permiten a la abeja pasar el invierno.^{10,16,17}

La cantidad de polen que se requiere para criar una sola larva ha sido estimado en un rango de 125 a 145 mg, por lo tanto, una colonia requerirá alrededor de 15 a 55 kg al año.¹⁰ El polen contiene entre 6 a 28% de proteína y es el único recurso natural disponible para las abejas. Es la fuente proteica de donde las abejas obtienen los aminoácidos esenciales, ellas requieren para su correcto crecimiento arginina, histidina, lisina, triptófano, fenilalanina, metionina, treonina, leucina, isoleucina y valina.¹⁰

La colección de polen es crucial para la vida y reproducción de las colonias de la abeja melífera y está correlacionada con la producción de miel y la postura de huevos⁹.

1.5. Métodos mencionados en la literatura para determinar la capacidad antioxidante.

Se han utilizado diferentes métodos químicos para analizar los granos de polen. Uno de los métodos que ha sido utilizado es la electroforesis con espectrometría de masas usando polen fresco. Se identificó diversos compuestos fenólicos, tales como acetilglucoside, quercetina-3-rutinoside entre otros ocho compuestos más.^{18,19} En otro estudio, se determinó la actividad antioxidante que posee el polen, dichas moléculas

inducen la actividad proteosómica en fibroblastos humanos, estos promueven y disminuyen los radicales libres y aparentemente un menor daño tisular,²⁰ sin embargo, existen controversias sobre el efecto dañino que puedan tener los radicales libres. Otras técnicas han sido utilizadas para medir los compuestos fenólicos y flavonoides. Las técnicas de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), Folin-Ciocalteu, cromatografía líquida (HPLC) y ácido 2,2- azino-bis(3-etilenbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), todas se han utilizado para determinar diferentes compuestos fenólicos encontrados en polen fresco.^{21,22} Campos, utilizando HPLC, encontró 29 diferentes compuestos flavonoides en polen de Portugal y Nueva Zelanda.²³ Stanciu, analizó polen de cuatro especies florales y pan de las abejas, concluyó que no hubo diferencias significativas entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante del polen fresco y pan de las abejas, asimismo, encontró una gran variabilidad en las concentraciones de los diferentes antioxidantes.²⁴

1.6. Justificación

Determinar la presencia de antioxidantes en el polen fresco y pan de las abejas, permitirá generar conocimientos básicos de los posibles procesos bioquímicos que realizan las abejas en la transformación del polen fresco al pan de las abejas y por lo tanto, comprender los efectos nutricionales que pueda haber en las abejas con el uso de estos compuestos.

Existen pocos trabajos que hayan determinado diferencias en la cantidad de compuestos fenólicos en el polen, tanto fresco como almacenado en los panales. En México no existen publicaciones al respecto, este es el primer trabajo realizado para determinar compuestos fenólicos en el polen.

1.7. Objetivo

Determinar diferencias en la capacidad antioxidante entre el polen fresco y pan de las abejas (*Apis mellifera* L.)

1.8. Hipótesis

La capacidad antioxidante es mayor en el pan de las abejas que en el polen fresco.

2.0. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Localización del área de estudio

Para realizar este trabajo se utilizaron tres colmenas de abejas *Apis mellifera* L., localizadas en el Centro de Educación Ambiental “Acuexcomatl”, que se encuentra ubicado en: Avenida Año de Juárez N° 1900, Colonia Quirino Mendoza, San Luis Tlaxialtemalco, Delegación Xochimilco. Se ubica entre las coordenadas geográficas 19° 19', al sur, 19° 09' de latitud norte; 98° 58' al este y 99° 10' de longitud oeste. La delegación Xochimilco colinda al norte con las delegaciones Tlalpan, Coyoacán, Iztapalapa y Tláhuac; al este con Tláhuac y Milpa Alta; al sur con Milpa Alta y Tlalpan; al oeste con Tlalpan.²⁵

El polen fresco se colectó de una trampa para polen tipo alza colocada en cada una de las colmenas durante un periodo de 10 días. El pan de las abejas fue obtenido de las mismas colmenas de un bastidor de cámara de cría, utilizando una cucharilla metálica que se introdujo en las celdillas del panal. Se tomaron tres muestras, una de cada colmena, se obtuvieron los siguientes pesos: 1° colmena 79 g, 2° colmena 86 g y la 3° colmena 63 g, que sumaron un total de 228 g colectados de polen fresco, y de pan de abeja 1° colmena 18.81 g, 2° colmena 85.19 g y la 3° colmena 54.4 g, que sumaron un total de 158.4 g. colectados. Los análisis químicos se realizaron en el laboratorio de Farmacia ubicado en el anexo E de la Facultad de Química de la UNAM.

2.2. Preparación de las muestras de polen.

El primer paso fue la extracción de los diferentes compuestos químicos del material vegetal (en este caso el polen), se utilizaron dos técnicas: Soxhlet y macerado, cada una requirió etanol a dos concentraciones, 100% y 70%. Cada muestra se le trabajó con las

dos concentraciones del disolvente, para dar un total de 24 muestras. Se pesaron 3.5 g de polen fresco de cada una de las tres muestras y 5 g de pan de las abejas de cada muestra.

La técnica de extracción de Soxhlet consiste en poner en un sobre de papel filtro la muestra e introducirlo en un tubo de vidrio que lleva el mismo nombre, en la parte superior del tubo Soxhlet se une un refrigerante y por la parte inferior del mismo se conecta un matraz de bola de 100 ml con el etanol (100 y 70%), en la parte baja del matraz se encuentra una platina caliente a 80°C que provoca la evaporación del disolvente, cuando este se evapora sube por medio del tubo hasta el área donde se encuentra la muestra, es condensado por el refrigerante y al descender regresa a la cámara del disolvente (matraz) y va separando los diferentes compuestos de la muestra²⁶ (Figura 10). Al extracto obtenido de cada muestra se coloca en otro aparato llamado rotaevaporador, el cual consiste en un motor eléctrico que produce el giro del matraz de bola del Soxhlet que contiene el extracto. Dicho matraz se sumerge parcialmente en un baño María, manteniendo el giro, acoplado al sistema, se encuentra un refrigerante por el que circula el etanol con agua, que produce la condensación del disolvente que se recoge en otro matraz de bola²⁷ (Figura 11). Al obtener el concentrado se diluye con metanol para poder vaciarlo en un vial, el cual es pesado antes de vaciar la muestra, donde se deja hasta que se consuma el metanol y quede seco para poderlo pesar.

La técnica del macerado consistió en colocar una muestra en un matraz Erlenmeyer al que se le agregó el disolvente y se dejó reposar por 4 días y posteriormente, se filtró con papel filtro y un embudo de porcelana, el obtenido se vierte en un matraz de bola y se coloca en el rotaevaporador para obtener un concentrado y se realiza el último paso del sistema Soxhlet (Figura 12).

2.3. Métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante.

Con los extractos obtenidos de las técnicas de Soxhlet y macerado se realizó la técnica de cromatografía de capa fina la cual consiste en la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y utiliza una placa recubierta de sílica gel manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa y la otra es una fase móvil que transporta las sustancias que separan y que progresa en relación con la otra fase y son reveladas por el método 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). El método de DPPH desarrollado por Brand-Willams basado en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH, por antioxidantes, basado en la medida de la absorbancia del radical DPPH 100 μM (3,9 ml) disuelto en metanol al 80% a la longitud de onda de 517 nm. Se añade 0.1 ml de la muestra o patrón, la mezcla se homogeniza y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Las medidas de absorbancia a 517 nm se realizan antes de añadir la muestra, se dejan pasar 30 y 60 minutos. La concentración de DPPH en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibración obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en TEAC actividad equivalente a Trolox ($\mu\text{M/g}$ de muestra de peso fresco).²⁸ Se tomaron tres muestras de polen fresco procesadas con etanol 100% y tres con etanol 70%, asimismo, se trabajó para el pan de abeja, a éstas se les aplicó la técnica del DPPH.

El método ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) descrito por Kuskoski. El radical ABTS se obtiene tras la reacción de ABTS (7 Mm) con persulfato potásico (2,45 Mm, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70 (± 0.1) a 754 nm (longitud de onda máxima absorción). Las muestras filtradas se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80% en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 μL de la muestra. Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a

Trolox).²⁸ Este método se utiliza para medir la actividad antioxidante de la muestra. De los 24 extractos contenidos en los viales de las técnicas de Soxhlet y macerado se pesó 1mg y se colocaron en una tarjeta de ELISA, depositando 20 µl de cada dilución en los pocitos y se repitió por triplicado de cada muestra, se preparó el reactivo de ABTS agregándole 20 ml de metanol que fue vertido en una caja de plástico envuelta en aluminio, de ahí se tomó 200 µL con una micropipeta múltiple para depositarlo en las muestras. La tarjeta de Elisa que contiene la muestra con el reactivo y el blanco (ABTS) es sometida a una lectura y los resultados obtenidos son mostrados en una hoja de Excel y posteriormente son acomodados de acuerdo a la identificación de las muestras y mediante fórmulas son graficados. El programa por el cual se lee la placa de ELISA se programa con el número de lecturas (muestras), el número de filtro y el tiempo en que se requiere la lectura (Figura 13).

Para el método de DPPH también se utilizó la tarjeta de ELISA con la misma metodología del método de ABTS, sólo cambió el reactivo, el blanco (DPPH) y la cantidad que se le agregó a las muestras fue de 100 microlitos y posteriormente se realizó la lectura, cambiando el tiempo (Figura 14).

El método espectrofotométrico desarrollado por Folin-Ciocalteu para la determinación de los fenoles totales se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en un medio básico, que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) Y Molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de la muestra²⁸ (Figura 15).

Para calibrar la curva patrón se colocó en un vial color ámbar una muestra de 800 µl de agua destilada, 100 µl de reactivo de Folin (dejar reposar 8 minutos), posteriormente se

agregó 100 μ l de metanol (disolvente) y 50 μ l de carbonato de calcio al 20% (dejar reposar una hora).

En otro vial ámbar se adicionó 800 μ l de agua destilada más 100 μ l de la muestra de polen, después se agregó 100 μ l del reactivo de Folin, y se dejó reposar por 8 minutos en la oscuridad, se adicionó 50 μ l de carbonato de calcio al 20%, y reposó una hora en la oscuridad.

Las lecturas se realizaron en una celda de un espectrofotómetro con una absorbancia de 760 nm, donde primero se pone el blanco para tener un parámetro y luego las muestras se leen una por una y se repite por triplicado, las lecturas se registran y posteriormente se acomodan conforme se identificaron las muestras para poder graficarlos.(Figura16).

Los anteriores métodos se trabajaron con los 24 extractos que se obtuvieron de las técnicas de Soxhlet y macerado.

2.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos por los métodos de DPPH, ABTS y Folin y Ciocalteau del polen fresco y pan de las abejas fueron sometidos a la prueba t-Student: Los datos no mostraron varianzas iguales. Los datos obtenidos por el método DPPH presentaron una distribución normal.

El modelo estadístico de la prueba de t Student es³³:

$$\bar{x} - t(\text{gl}, \alpha/2) * s/\sqrt{n} \quad \text{a} \quad \bar{x} + t(\text{gl}, \alpha/2) * s/\sqrt{n}, \text{ donde } \text{gl} = n-1$$

gl= grados de libertad

\bar{x} = media de la muestra

s= desviación estándar

n= número de muestra

α = nivel de significancia

Los datos se analizaron comparando tres muestras de polen fresco contra tres muestras de pan de abeja, con cada uno de los métodos (DPPH, ABTS y Folin y Ciocalteau) y la técnica (macerado y Soxhlet) y como diluyente etanol 100% y 70% respectivamente.

3. RESULTADOS

Capacidad antioxidante. Para el método DPPH, Soxhlet y macerado, y etanol 100% y macerado y etanol 70%, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el polen fresco y pan de abeja en las seis muestras ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.3627$), ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.6655$), ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.3568$) respectivamente. Sin embargo, con Soxhlet y etanol al 70% se encontraron diferencias significativas ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.0005$).

Los resultados con el método ABTS, Soxhlet y macerado, y etanol 100%, Soxhlet y macerado, y etanol 70%, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el polen fresco y pan de abeja en las seis muestras ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.4996$), ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.1055$), ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.2068$), ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.4472$) respectivamente (Cuadro 1).

Fenoles totales. Para el método Folin y Ciocalteu con Soxhlet y macerado y etanol 100%, y Soxhlet y macerado y etanol 70%, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el polen fresco y pan de abeja en las seis muestras ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.4263$), ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.8535$), ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.0511$), ($t=2.7764$; $gl=4$; $P=0.4920$) respectivamente.

4. DISCUSIÓN

Actividad antioxidante. Los resultados obtenidos de los métodos DPPH y ABTS mostraron que no existe diferencia en la capacidad antioxidante entre el polen fresco y pan de las abejas, esto concuerda con Stancius 2008, en donde evaluaron polen fresco y pan de las abejas utilizando los mismos métodos, sin embargo, menciona que es importante aplicar otros métodos químicos para evaluar la capacidad antioxidante del polen, aunado a identificar previamente el origen botánico.²⁴ Sin embargo, se encontraron diferencias significativas con el método DPPH, Soxhlet y etanol 70%, posiblemente se pueda deber a la pérdida de algunos analitos en el proceso de la técnica de extracción Soxhlet o a un error en el desarrollo de la técnica. Por otro lado, Campos 2003, demostró que el polen almacenado en buenas condiciones tales como: seco, frío y oscuro durante un periodo de dos a cuatro años aumenta su capacidad antioxidante en relación al polen fresco.³⁰ En el presente trabajo se utilizó polen fresco de ocho días de recolección y el pan de las abejas tuvo un tiempo de almacenamiento menor a un año, tal vez, sea una razón por la cual no se encontraron diferencias en la capacidad antioxidante del polen estudiado.³⁴

En relación con los métodos químicos utilizados para determinar la capacidad antioxidante Kuskoski 2005, concluye que el método más rápido y con resultados confiables es ABTS, además, de que permite trabajar con compuestos de naturaleza lipofílica como hidrofílica.²⁸ Sin embargo, Pawliszyn y colaboradores (1990) desarrollaron el método de microextracción de fase sólida, la cual utiliza una fibra de sílica recubierta en su exterior por diferentes fases estacionarias, en este el analito es directamente extraído y concentrado en el recubrimiento de la fibra. Las mayores ventajas que posee es el ahorro de tiempo, de disolvente y es la mejor en los límites de detección; sin la pérdida de analitos que debido a la temperatura conlleva un proceso de extracción.^{35, 36}

Fenoles totales. La concentración de fenoles totales y la capacidad antioxidante esta correlacionada positivamente. De acuerdo a los resultados obtenidos no hubo diferencias entre el polen fresco y el pan de abeja, posiblemente porque entre los pólenes no existió gran diferencia en los tiempos de almacenamiento en el pan de abejas, basado en el estudio de Campos 2003. Por lo antes expuesto, es importante realizar las mediciones con pólenes que tengan diferencias marcadas en sus tiempos de colecta, así como la previa identificación melisopalinológica del polen en estudio.³⁰

El polen mientras mayor tiempo almacenado se encuentre en los panales tendrá mayor concentración de fenoles totales y por ende, mayor capacidad antioxidante.³¹

La capacidad antioxidante de una sustancia se debe a que capta los radicales libres, estos se forman cuando un átomo es inestable, es decir, posee un sólo electrón en su última capa. Pocos trabajos han sido desarrollados en este campo de la investigación apícola para determinar la actividad antioxidante que pueda tener el polen. De los trabajos realizados hasta ahora, se ha encontrado que el polen tiene actividad antioxidante debido a que en su estructura química se encuentran diversos grupos de compuestos fenólicos que disminuyen la formación de radicales libres y estos están relacionados con daño celular y envejecimiento. La capacidad antioxidante y la presencia de fenoles en el polen hacen que sea recomendable su consumo cotidiano y prolongado para disminuir la formación de radicales libres en las células. Puede ayudar a prevenir enfermedades como cáncer, aterosclerosis y esclerosis lateral amiotrófica o (ELA), entre otras enfermedades. Los productos de las abejas pueden considerarse como una importante fuente de antioxidantes naturales como los flavonoides.²⁹

5. CONCLUSIONES

1. No existió diferencia en la capacidad antioxidante entre el polen fresco y pan de las abejas.
2. Comparando los métodos ABTS y DPPH, el ABTS es más rápido que el DPPH.
3. Se recomienda aplicar métodos estandarizados para medir la capacidad antioxidante de este producto apícola.
4. Es necesario realizar la identificación palinológica para conocer el diferente origen botánico y permitir una evaluación precisa de la capacidad antioxidante del polen.
5. Es necesario seguir con las investigaciones para conocer mejor los componentes del pan de abeja como fuente de ácidos fenólicos.

6. REFERENCIAS

1. HOPKINS WG. Introduction to plant physiology. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. printed in the United State of America. 1995.
2. KHANAM S. General study of formation of secondary metabolites. *Pharmacognosy* 2007;9:12.
3. SINHA RK. Modern plant physiology. Alpha Science International. Pangbourne England 2004
4. BUCHANAN BB, GRUISSEM W, JONES R. Biochemistry & Molecular biology of the plants. 1er American Society of Physiologists, Rockville, Maryland 2000.
5. TAIZ L. ZEIGER E. Fisiología vegetal Vol.1. 3er ed. Sinauer Associates, INC, Publicaciones de la Universidad Jaume I, 2006
6. KARP G. Biología celular y molecular. 4a ed. USA: McGraw Hill Interamericana, 2005
7. HESS D. Fisiología vegetal. Fundamentos moleculares, bioquímicos y fisiológicos del metabolismo y el desarrollo. Ed. Omega S.A. Barcelona 1980
8. WEITER T.E, STOCKING, C.R, BARBOR, MG. Botánica 5ª ed. Editorial Limusa México 1983.
9. RALLO GJB. Frutales y abejas. Madrid: Extensión Agraria Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1986.
10. WINSTON ML. The biology of the honey bee. 1er ed. London England 1991.
11. LANGSTROTH LL. The hive and honey bee. 4to ed. USA: Dadant publication, 1993.
12. BARTH FG. Insects and flowers. Nueva Jersey: Princeton University Press, 1991
13. FONTURBEL F.R. Rol de la coevolución planta-insecto en la evolución de las flores cíclicas en las angiospermas. *Ciencia abierta serie en línea* 2002 (citado el 22 de octubre del 2008): 17 (2). Disponible en: <http://abierta.uchile.cl>, 17,2002.
14. PROCTOR M. YEA P, LACK A. The natural history of pollination. Portlan, Oregon Timber 1996
15. ORTEGA SJ. Flora de interés apícola y polinización de cultivos. Madrid: Mundi prensa 1987.
16. PROST J.P. Apicultura. Conocimiento de la abeja, manejo de la colmena. 7ª ed Madrid: Mundi prensa 2007.
17. DEWER C. Honey bee biology and beekeeping 2ª ed Cheshire, Connecticut Wicwas, 2001
18. ARRAEZ RD, ZUREK G, BÄßMANN C, ALMARAZ-AN., QUIRANTES R, SEGURACA. et al. Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007;389:1909-1917.
19. GONZÁLEZ GMC, ALMARAZ AN, ÁVILARJA, HERRERA CJ, NARANJO JN. Polen apícola: alternativa alimenticia y terapéutica. *Apitec*; 2001;28:19-23
20. GRAIKOU K, KAPETA S, ALIGIANNIS N, SOTIROUDIS G, CHONDROGIANNI N, GONOS E, CHINOI I. et al. Chemical analysis of Greek pollen-antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chemistry Central J* 2011;5:33-41.
21. ALMARAZ-ABARCA N, CAMPOS GM, AVILA-REYES JA, NARANJO-JIMÉNEZ N, HERRERA CJ, GONZÁLEZ-VALDEZ LS. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *J of Food Composition and Analysis* 2007;20:119-124
22. LEBLANC BW, DAVIS OK, BOUE S, DELUCCA A, DEEBY T. Antioxidant activity of Sonora Desert bee pollen. *Food Chem* 2009;115:1299-1305

23. CAMPOS MG, MARKHAM KR, MITCHELL KA, PROENCA CA. An approach to the characterization of bee pollen via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochem Anal* 1997;8: 181-185.
24. STANCIU O, MARGHITAS LA, DEZMIREAN D. A comparison of methods used to define the antioxidants capacity of bee pollen y beebread from Romania. *Proceedings 43rd and 3rd International Symposium on Agriculture; Croatian and Opatija, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, (751-754).*
25. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA Y GEOGRAFÍA (INEGI). Actualizada en 2008, citado el 22 de octubre del 2008. Disponible en: <http://www.inegi.gob.mx/>.
26. CANOSA R.M. Desarrollo de metodología para la determinación de triclosan y parabenceno. Aplicación de su distribución y transformación en muestras ambientales. Facultad de química. Universidad Santiago Compostela USA. Disponible en: <http://book.google.com.mx/book?id=2jxbsyO1IC>.
27. BUCHI. Manual de instrucciones rotavapor ® R- 3. Disponible en: www.equipor.com.mx/welo2012/wp_content/uploads/2012/info_man/buchi/Manual_Operación_R-3.pdf.
28. KUSKOSKI ME, ASUERO AG, TRONCOSO AM, MANCINIFILHO J, FETT R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad de antioxidante en pulpa de frutas. Universidad de Sao Paulo, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Alimentos e Nutricao Experimental, Universidade de Sao Paulo, USP, Br.
29. ALMARAZ-ABARCA N, CAMPOS GM, AVILA-REYES JA, NARANJO-JIMÉNEZ N, HERRERA CJ, GONZÁLEZ-VALDEZ LS. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 2004; 29, 10.
30. CAMPOS MG, WEBBY FR, MARKHAM RK, MITCHELL KA, CUNHA AP. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51,742-745.
31. GARCIA DE. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales; Estación experimental de pastos y forrajes "Indio Hatuey". *Pastos y Forrajes* vol. 27 n°1, 2004
32. MARTÍNEZ FS, GONZÁLEZ, GJ, CULEBRAS, JM, TUÑÓN MAJ. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 2002 XVII (6) 271-278
33. JOHNSON R, KUBY P. Estadística elemental lo esencial 3er ed. Thomson.
34. ZENKEVICH I. Chromatographic quantitation at losses of analyte during simple preparation application of the modified method of double internal standar. *Journal of Chromatography* 2006, 1150:117-23.
35. KUING AJ. The application of solid-phase micro-extraction (SPEM) to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environmental Geochemistry and Health*. 2003, 25:69-75
36. PAWLISZYN J. Application of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography* 2000, a 880;35-62.
37. MANGEISS TA. D.HG CROUT. *Organic Chemistry Secondary Plant Metabolism*. Ed. Freeman, Cooper & Company 1969, printed in the United States of America, University of Exeter.Sons, Inc. printed in the United State of America. 1995.

7. FIGURAS

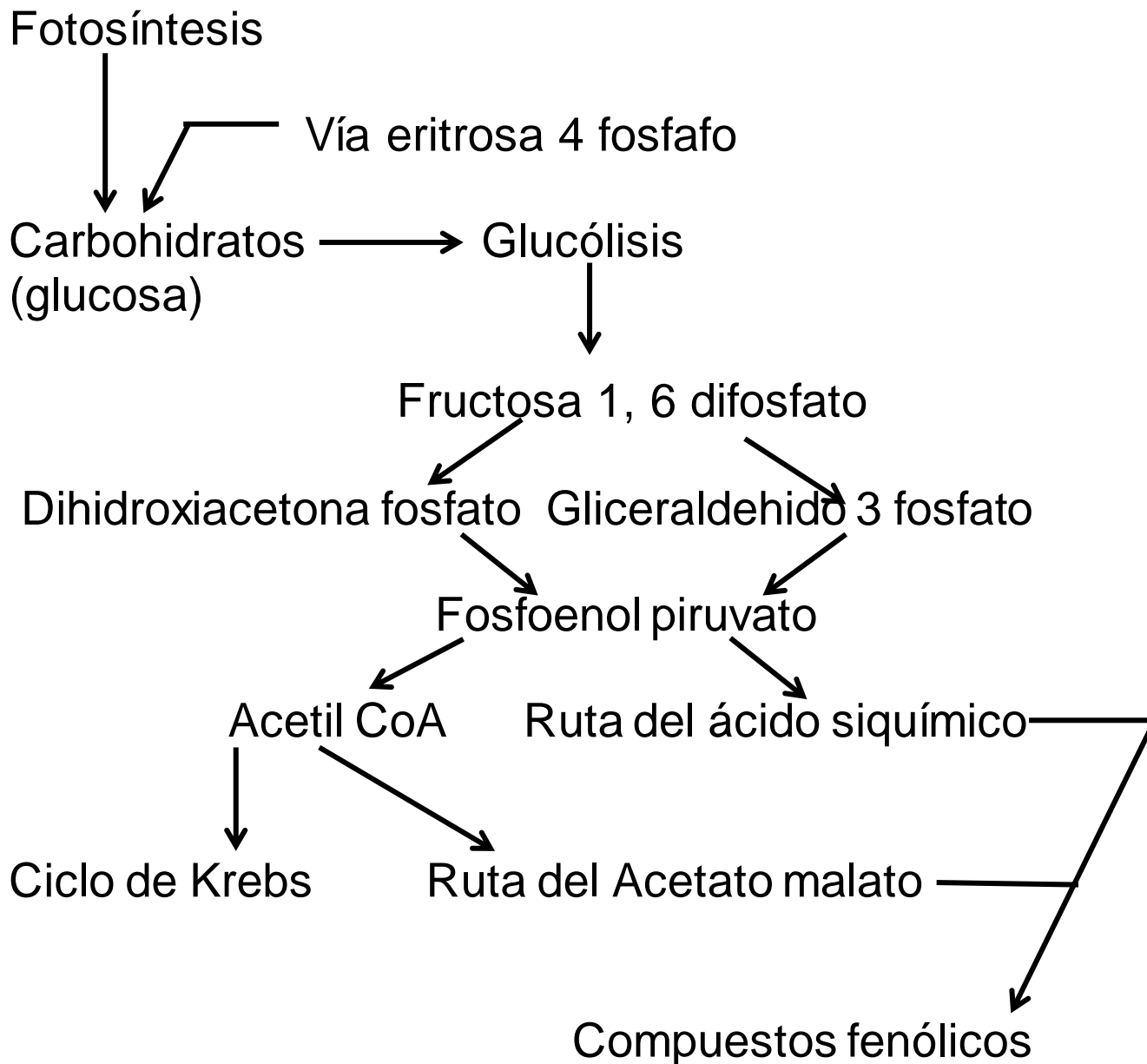


Figura 1. Vías de síntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios y su relación con la fotosíntesis.³¹

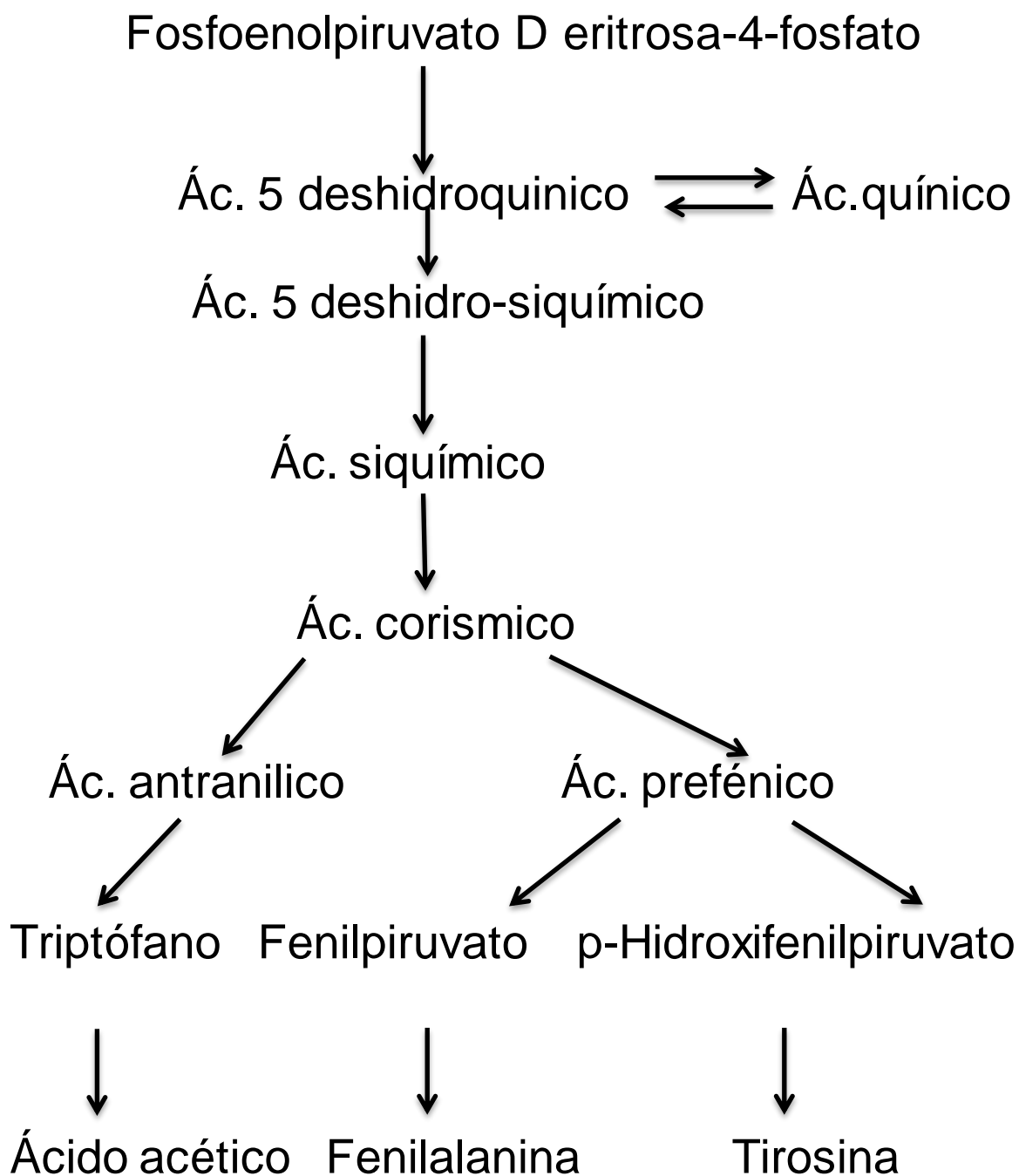


Figura 2. Formación de aminoácidos aromáticos esenciales para la generación de compuestos fenólicos.⁷

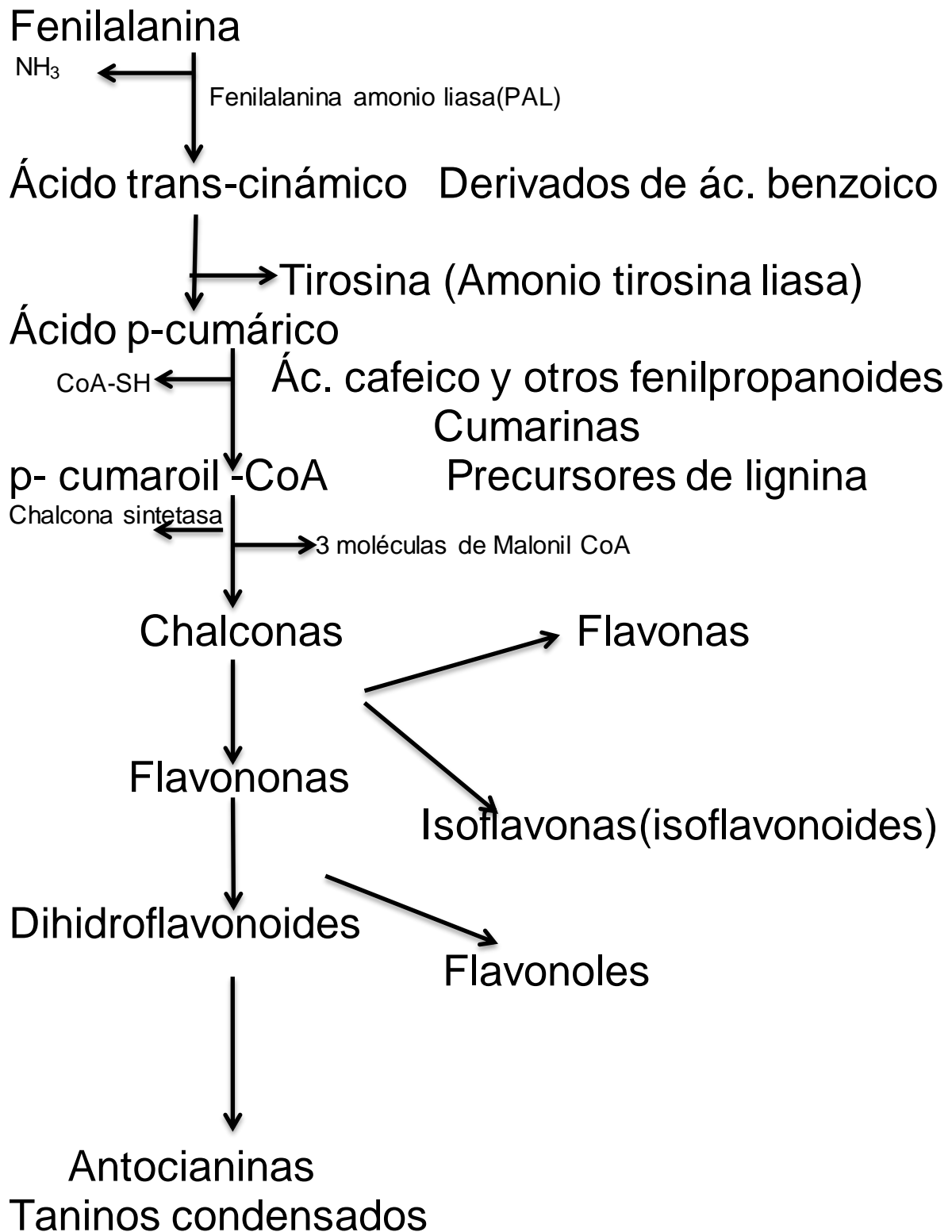


Figura 3. Esquema de biosíntesis de flavonoides y fenoles vegetales a partir de fenilalanina.⁵

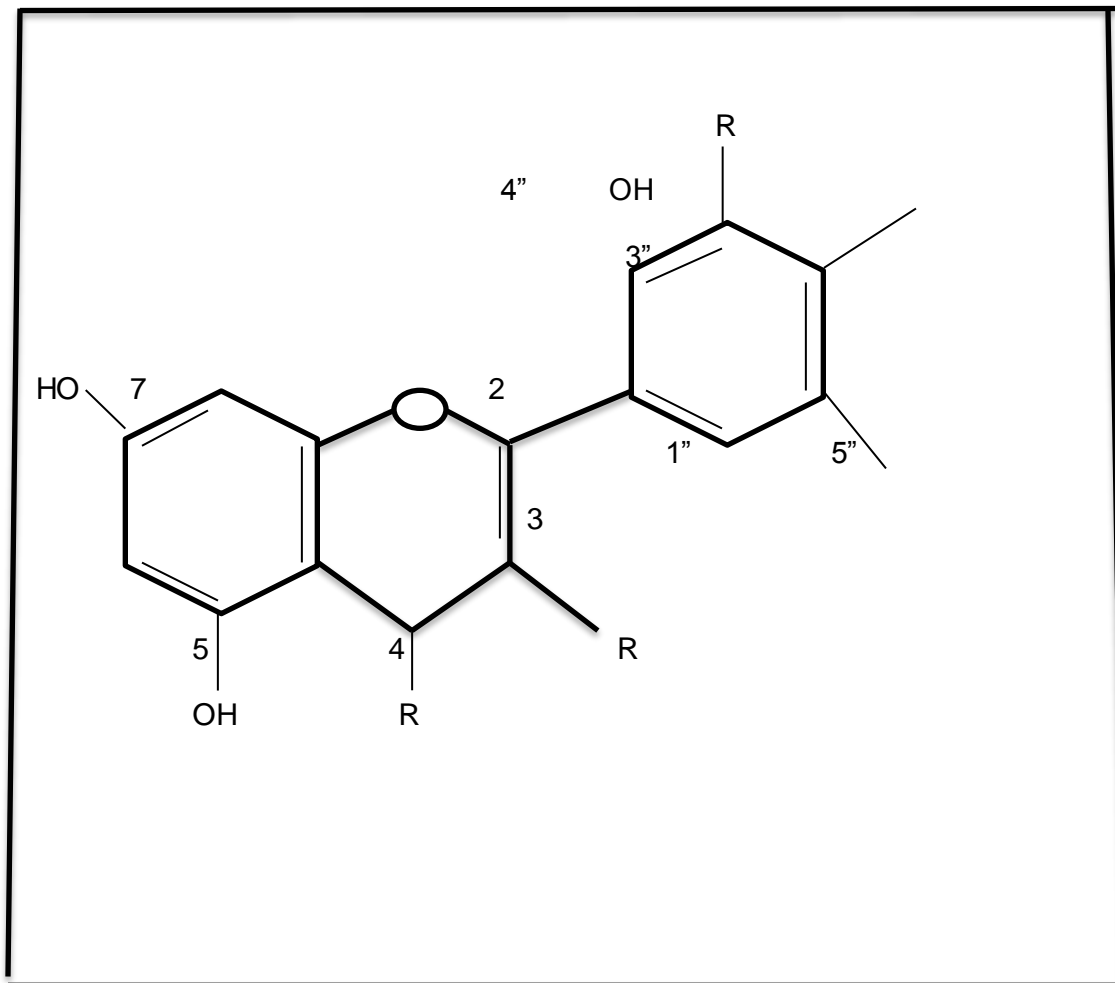


Figura 4. Estructura química general de un flavonoide

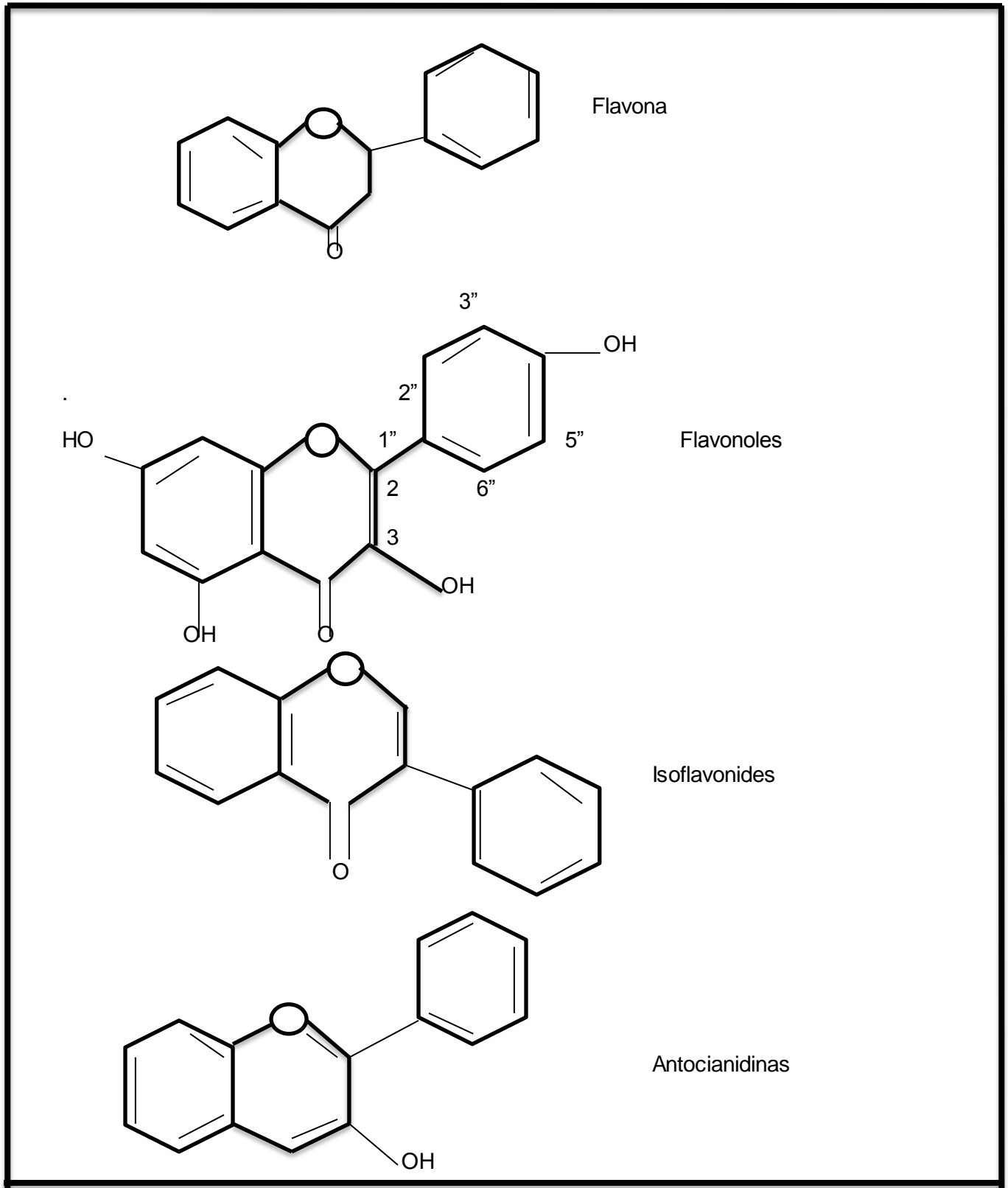


Figura 5. Estructuras químicas de algunos ejemplos de flavonoides.³²

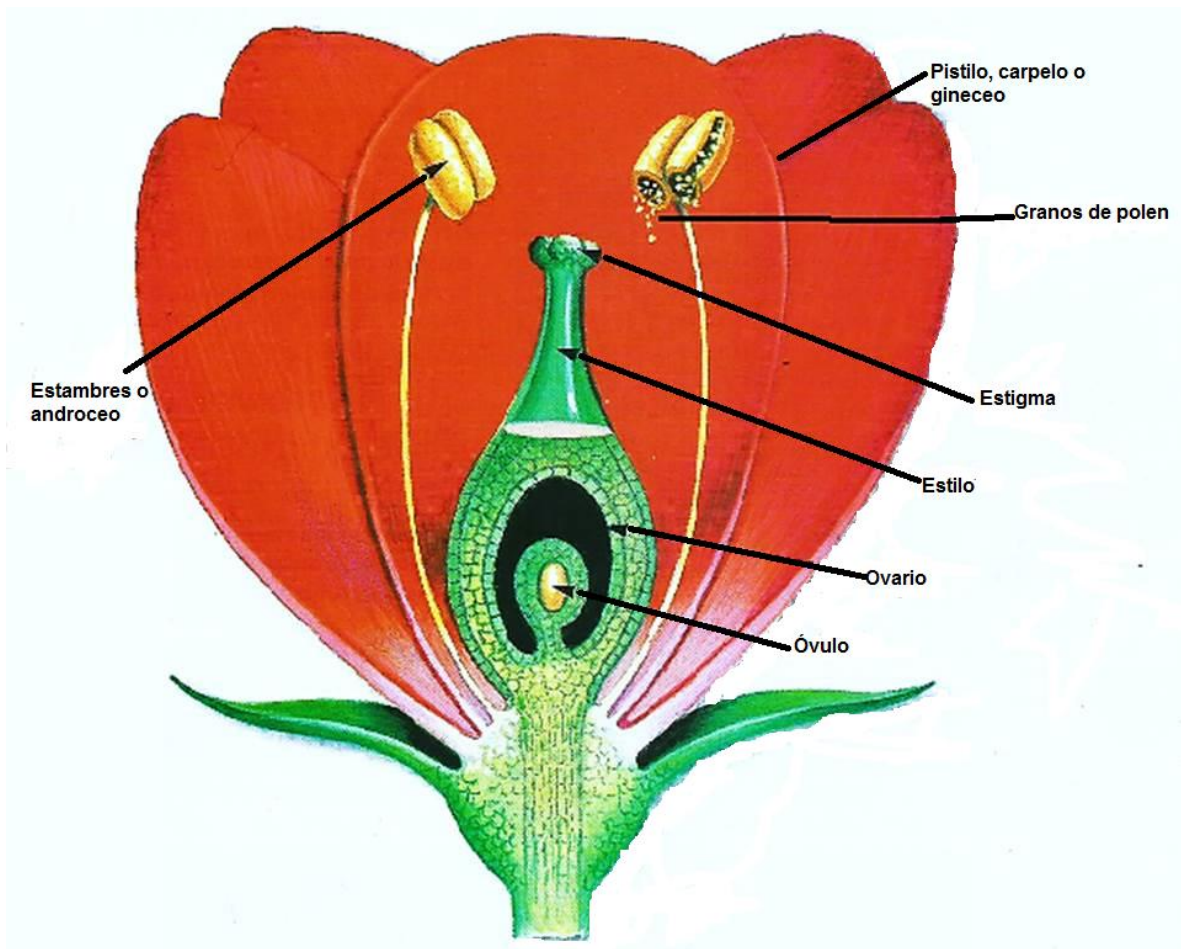


Figura 6. Órganos femeninos y masculinos de una flor

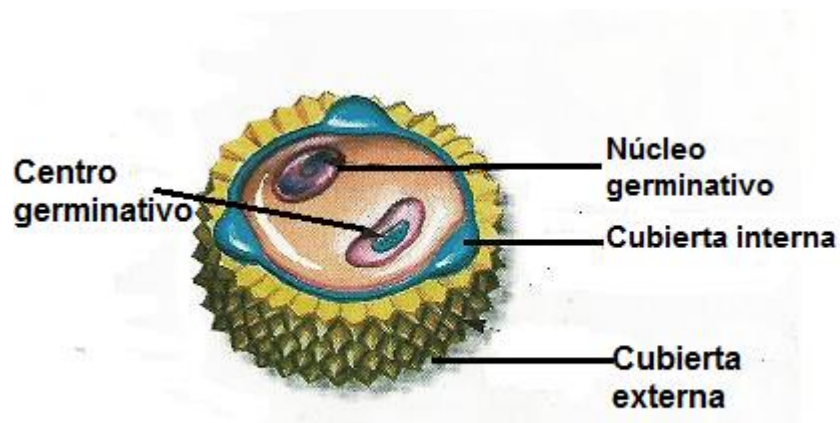


Figura 7. Estructura interna y externa de un grano de polen



Figura 8: (a) Abeja recolectando polen

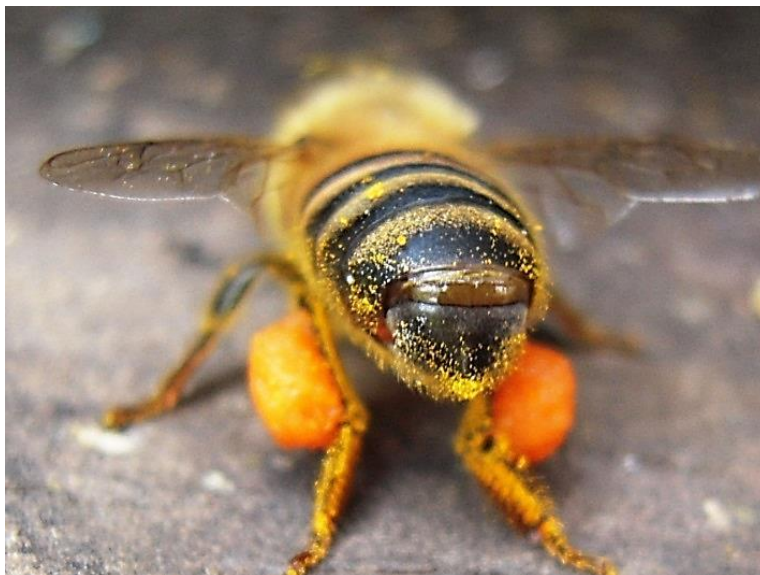


Figura 8: (b) Abeja realizando el transporte de polen (tercer par de patas)

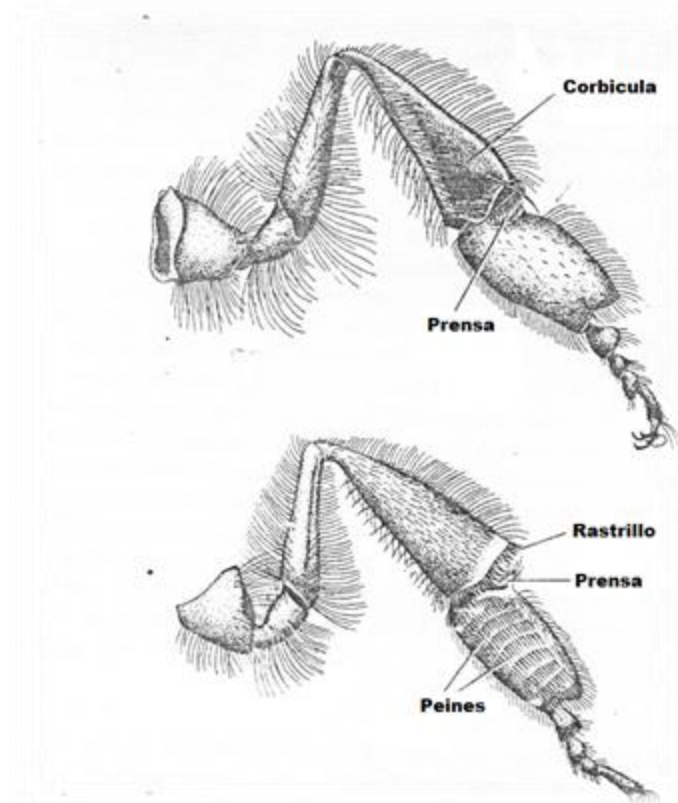


Figura 8: (c) Corbícula (órgano especializado para el transporte del polen)



Figura 9. Polen almacenado en el panal (pan de abeja)



Figura 10. Sistema de extracción e Soxhlet (obtención de extractos)



Figura 11. Rotaevaporador (obtención de extractos)

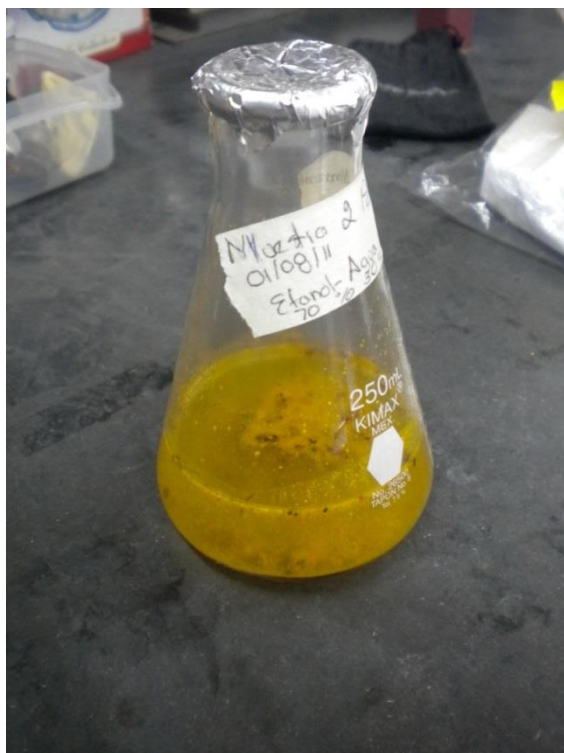


Figura 12. Técnica de maceración



Figura 13. Placa de ELISA con ABTS (antioxidantes)



Figura 14. Placa de ELISA con DPPH (antioxidante)



Figura 15. Método Folin-Ciocalteu (fenoles totales).



Figura 16. Espectrofotómetro

8. CUADRO

Cuadro 1

Prueba de t-Student con los datos obtenidos de la técnica 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) para comprobar si hay diferencia en la capacidad antioxidante entre polen fresco y pan de abeja.

	Media	Desviación estandar	t	Grados de libertad
Fresco	187.07	3.36	2.7764	4
Pan	232.19	6.88	2.7764	4
