

CAPACIDAD INHIBIDORA DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE EXTRACTOS DE POLEN DE MEZQUITE (*Prosopis juliflora*)

Norma Almaraz Abarca^{1,2}, Sergio Romero Nájera³, Amanda Delgado Alvarado¹, José Antonio Ávila Reyes^{1,2}, Nestor Naranjo Jiménez^{1,2}, Jesús Herrera Corral^{1,2} y Laura Silvia González-Valdez^{1,2}

¹ Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango. Sigma s/n 20 de Noviembre II, Durango, Dgo., México, Tel/Fax: (618) 8-14 45 40. ² Becarios COFAA. ³ Universidad Juárez del Estado de Durango, México.

Introducción

Prosopis juliflora es una especie ecológicamente importante por su alto potencial fijador de nitrógeno, porque puede crecer en zonas y estaciones muy secas y porque representa refugio y alimento para muchas especies de animales que consumen su néctar, polen, hojas y frutos (Golubov y col, 2001). Esta especie representa la única fuente de néctar y polen para las abejas en los meses de abril y mayo en muchas de las zonas áridas y semiáridas del Estado de Durango, México. Esto para los apicultores de la zona, es de relevante importancia ya que la miel adquiere un sabor único y uniforme. Al igual que la miel, el polen recolectado por las abejas en esos meses del año es un polen monoespecífico de esta especie.

El mezquite es una fuente importante de productos naturales. Evaluaciones sobre la actividad antioxidante de extractos etanólicos del polen de *Prosopis juliflora* sugieren que éste es una sustancia con importante capacidad bloqueadora de radicales libres y con alta actividad inhibidora de la peroxidación lipídica, ambas asociadas a su composición de fenólica (Almaraz y col., 2003). Sin embargo, se sabe que las evaluaciones de la actividad de un antioxidante en sistemas químicos y en sistemas biológicos in vitro no representan la actividad real in vivo (Zhang y Shen, 1997). Por esa razón en este trabajo se evaluó in vivo la capacidad antioxidante como inhibidor de la peroxidación lipídica, del polen apícola monoespecífico de mezquite.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar in vivo la capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica asociada a la concentración de flavonoles, de extractos etanólicos crudos de polen apícola mono-específico de mezquite (*Prosopis juliflora*), en homogeneizados de hígado de ratones intoxicados con bromobenceno, evaluando la producción de dialdehído malónico (DAM), como principal producto de oxidación lipídica, por su reacción con el ácido tiobarbitúrico (ATB).

Materiales y Métodos

Muestras de polen

Se utilizó una muestra de polen apícola mono-específico de mezquite que fue proporcionada especialmente para este estudio por los apicultores de San Juan del Río, Durango, México, en abril de 2002. Esta se obtuvo por medio de trampas para polen. Se colectó polen de las anteras de flores de mezquite de los alrededores del apiario de donde provino la muestra de polen apícola. Se colectaron ejemplares de referencia ("Voucher") que se depositaron en el Herbario CIIDIR para su identificación botánica.

Análisis Microscópico

Para corroborar el origen botánico del polen apícola se realizó la comparación directa de la morfología de los granos de polen de éste y de los de las anteras de mezquite. Se elaboraron preparaciones microscópicas permanentes de los granos de polen de ambas fuentes, previa acetolización de acuerdo al método de Erdtman (1966). Todas las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio de contraste de fases marca Olympus BX40.

Preparación de los Extractos

Treinta gramos de polen se extractaron en 200 ml de una solución de etanol:agua (50 % v/v), con maceración de 1 hora. El homogeneizado se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recuperó y guardó en oscuridad. La pastilla se reextractó de la

misma manera tres veces. Todos los sobrenadantes se combinaron y formaron el extracto crudo. Éste se concentró a sequedad en rotavapor.

Evaluación de la Actividad Inhibidora de la Peroxidación Lipídica en Ratones Intoxicados con bromobenceno.

La evaluación de la actividad inhibidora de la peroxidación lipídica se llevó a cabo de acuerdo a la técnica espectrométrica descrita por Uchiyama y Mihara (1977), que cuantifica la producción de DAM como principal producto de la oxidación lipídica, por su reacción con el ATB, en homogeneizados de ratones intoxicados con bromobenceno.

La intoxicación de los ratones se hizo de acuerdo a la técnica descrita por Zhang y Shen (1997). Se sacrificaron ratones machos de 4 semanas de edad de la cepa CF1 del Instituto Nacional de Virología. Se formaron al azar 8 grupos de 10 ratones cada uno: un grupo control (solo aceite vegetal comestible); dos grupos suministrados con 200 µl de extracto de polen apícola de mezquite, uno con una concentración C1 de flavonoles de 9.794 µg equivalentes de quercetina/ml (calculada a partir de curvas de calibración de los extractos y de una curva estándar de quercetina) y el otro con una concentración C2 de flavonoles de 21.7514 µg equivalentes de quercetina/ml (calculada de la misma manera); un grupo suministrado con 200 µl de vitamina E (a concentración comercial de 400 UI); un grupo intoxicado con 200 µl de una solución 0.6 M de bromobenceno disuelto en aceite de cocina, y tres grupos intoxicados con 200 µl de la solución 0.6 M de bromobenceno en aceite comestible después de la administración en cada caso, de 200 µl de la concentración C1 del extracto, de 200 µl de la concentración C2 del mismo y de 200 µl de vitamina E.

Los ratones de cada grupo fueron privados de alimento durante una noche. Al día siguiente los animales de los grupos correspondientes fueron administrados oralmente con los antioxidantes (200µl de extracto de polen de mezquite a la concentración C1 y C2, o 200 µl de vitamina E a concentración comercial, según correspondiera) e intoxicados 1 hora después por la administración oral de bromobenceno (200µl de una solución 0.6 M en aceite comestible). Los animales fueron sacrificados por desnucamiento 24 horas después.

El hígado de los ratones sacrificados fue extirpado, lavado con una solución fría de NaCl al 0.9% y homogeneizado con KCl frío al 1.15%, en una proporción 1:9 (hígado:KCl). A 0.5 ml de los homogeneizados se les añadieron 3 ml de ácido fosfórico al

1% y 1ml de solución acuosa de ATB al 0.6%. Las mezclas de reacción fueron calentadas durante 45 minutos en baño de agua hirviendo. Después de enfriarlas con agua de la llave, se les añadieron 4 ml de *n*-butanol y se mezclaron vigorosamente. La fase de *n*-butanol fue separada por centrifugación y las absorbancias a 535 y 520 nm fueron registradas. Las diferencias entre ambos valores de absorbancia fueron usadas para calcular la concentración de DAM en las mezclas de reacción (Uchiyama y Mihara, 1977) utilizando el valor del coeficiente de extinción de DAM ($1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Análisis Estadístico

Todos los análisis se realizaron con 10 réplicas. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (Anova) para un diseño completamente al azar. Los valores de las medias se agruparon de acuerdo a la prueba de Duncan.

Resultados

Análisis Microscópico

Los granos de polen de todas las cargas polínicas analizadas fueron morfológicamente idénticos a los granos del polen recolectado de las anteras de las flores de mezquite. Con base en lo reportado por Martínez-Hernández y col. (1993), quienes mencionan que las ornamentaciones de la exina de los granos de polen son exclusivas de la planta de la cual proviene, se puede afirmar que el polen apícola analizado en este trabajo proviene de *Prosopis juliflora*. Esa afirmación se ve apoyada por los perfiles fenólicos obtenidos por HPLC de extractos de la muestra de polen apícola analizada en este estudio y de polen de flores de mezquite, realizados en un estudio paralelo (resultados no publicados), los cuales resultaron idénticos entre sí.

Evaluación de la Inhibición de la Oxidación Lipídica en Ratones Intoxicados con Bromobenceno

Los valores de la producción de DAM en los ratones de los diferentes tratamientos se muestran en la tabla 1. En ella se puede observar que el extracto crudo de mezquite a la concentración de flavonoles más elevada, 21.7514 µg/ml, puede tener un efecto oxidante tan potente como lo tiene el bromobenceno a la concentración manejada en este estudio.

Los valores de DAM (0.0107 µg/ml) de los ratones suministrados con el extracto de polen de concentración de flavonoles más baja, resultaron menores que los de los ratones control (0.1293 µg/ml). Estos dos hechos sugieren que en condiciones en las que no se induce la oxidación, el suministro de extracto de polen de mezquite con concentraciones elevadas de flavonoles, resulta dañino al organismo, ya que puede actuar él mismo como agente oxidante, generando una concentración alta de DAM.

Ambas concentraciones de flavonoles, en los extractos de polen de mezquite analizados, tuvieron actividad antioxidante in vivo. El extracto de concentración más baja de flavonoles disminuyó 19.4 % la oxidación lipídica producida por el bromobenceno en los ratones intoxicados. El extracto de concentración más alta causó una disminución de 32.4 %. Estos resultados sugieren una relación entre la concentración de flavonoles en los extractos y el nivel de actividad antioxidante de los mismos. Sin embargo, ninguna de las dos concentraciones alcanzó el nivel presentado por la vitamina E para inhibir la oxidación lipídica in vivo, que fue de 88.08 %.

Tabla 1 Producción de DAM (µg/ml) en ratones sometidos a los diferentes tratamientos

TRATAMIENTO	MEDIA* ± DS
Ratones suministrados con extracto de polen de mezquite a la concentración de 21.7514 µg equivalentes de quercetina/ml	0.2251 ± 0.0566 a
Ratones intoxicados con bromobenceno (200 µl, 0.6 M)	0.2021 ± 0.0397 a b
Ratones intoxicados con bromobenceno (200 µl, 0.6 M) y suministrados con extracto de polen de mezquite a la concentración de 9.7949 µg equivalentes de quercetina/ml	0.1629 ± 0.05892 b c
Ratones intoxicados con bromobenceno (200 µl, 0.6 M) y suministrados con extracto de polen de mezquite a la concentración de 21.7514 µg equivalentes de quercetina/ml	0.1373 ± 0.0653 c
Ratones control, suministrados con 200 µl de aceite comestible	0.1293 ± 0.0641 c
Ratones intoxicados con bromobenceno	0.0241 ± 0.0022 d

(200 µl, 0.6 M) y suministrados con 200 µl de vitamina E a concentración comercial.	
Ratones suministrados con extracto de mezquite a la concentración de 9. 7949 µg equivalentes de quercetina/ml	0.0107 ± 0.0017 d
Ratones suministrados con 200 µl de vitamina E a concentración comercial	0.0091 ± 0.0017 d

* Valores calculados de 10 repeticiones

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada para este trabajo, no existen estudios sobre la evaluación inhibidora de la oxidación lipídica de extractos de polen que se hayan llevado a cabo en sistemas in vivo, razón por la cual no es posible presentar comparaciones de las actividades entre polen de diferente origen botánico. Sin embargo, evaluaciones de la capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica de extractos crudos de polen de *Prosopis juliflora*, en sistemas microsomales de hígado de ratones, utilizando la misma técnica de MAD-ATB, permiten comparar la capacidad del polen de esta especie entre un sistema biológico in vitro y un sistema in vivo. De acuerdo a esos estudios, la capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica (definida como la concentración de sustancia antioxidante necesaria para disminuir en 50 % la concentración inicial de DAM) de *Prosopis juliflora* en el primero de esos sistemas es 7.885 µg/ml (Almaraz y col., 2003). Esto indica que se requieren 7.885 µg/ml de flavonoles en un extracto de polen de mezquite para disminuir 50 % la producción de DAM con respecto a un control sin antioxidante, en un sistema biológico in vitro. Mientras que se requieren 21.751 µg/ml de flavonoles en un extracto análogo para lograr solamente una reducción de la producción de DAM de 32 %, en un sistema in vivo.

Conclusiones

Los extractos etanólicos crudos de polen apícola monoespecífico de mezquite tienen actividad como inhibidores de la oxidación lipídica en sistemas in vivo, si bien ésta es menor que la de la vitamina E y menor que la manifestada en sistemas microsomales aislados. Sin embargo, considerando el potencial alimenticio de este producto apícola y las demás propiedades terapéuticas asociadas a él, su consumo se considera recomendable.

Los flavonoles que contienen los extractos crudos de polen apícola monoespecífico de mezquite son, al menos en parte, responsables de la actividad antioxidante del polen de esta especie.

Dependiendo de la concentración de flavonoles y en la ausencia de estrés oxidativo, los extractos crudos de este tipo de polen pueden actuar ellos mismos como sustancias oxidantes.

Referencias Bibliográficas

- Almaraz, A. N.; Delgado, A. A.; Ávila, R. J. A.; Naranjo, J. N.; Herrera, C. J. 2003. Actividad Antioxidante de Extractos de Polen de Abeja Monoespecífico de Mezquite (*Prosopis* sp.). En: X Congreso Internacional de Actualización Apícola. Tlaxcala, Tlax. México.
- Erdtman, G. 1966. Pollen morphology and plant taxonomy. Halner Publishing Company, New York.
- Golubov, J., Mandujano, M.; Eguiarte, L. 2001. The paradox of mesquites (*Prosopis spp*): invading species or biodiversity enhancers? Bol. Soc. Bot. México 69:23- 30.
- Hang, X. AND Xun,S. 1997. Antioxidant Activities of Baicalin, Green Tea Polyphenols and Alarin In Vitro and In Vivo. In: Journal of nutritional and Environmental Medicine 7(2): 79-89.
- Martínez-Hernández, E., Cuadriello-Aguilar, J., Téllez-Valdez, O., Ramírez-Arriaga, E., Sosa-Nájera, M., Melchor-Sánchez, J., Medina-Camacho, M.; Lozano-García, M. 1993. Atlas de las plantas y el polen utilizados por las cinco especies principales de abejas productoras de miel en la región del Tacaná, Chiapas, México. México D.F, UNAM, Instituto de Geología.
- Uchiyama, M.; Mihara, M. 1977. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Analytical Biochemistry, pp. 271-278.
- Zhang, J.; Shen, S. 1997. Antioxidant activities of baicalin, green tea polyphenols and alizarin in vitro and in vivo. Journal of Nutrition and Environmental Medicine 7(2):79-89.