

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS DE POLEN APÍCOLA DE DIFERENTE ORIGEN BOTÁNICO

Norma Almaraz Abarca^{1,2}, 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.

Introducción

Las culturas prehispánicas del Continente Americano hicieron uso del polen colectado por las abejas nativas para curar enfermedades. Existen registros que indican que la cultura maya utilizó el polen colectado por las abejas sin aguijón, trigonas y meliponas, para tratar enfermedades infecciosas (Schwartz, 1948; Ortiz y Medina, 2000).

Desde la introducción de la abeja europea (*Apis mellifera*) a México, el polen colectado por esta especie se ha destinado al consumo humano con fines alimenticios y curativos. Las propiedades alimenticias del polen de abeja están ampliamente documentadas por numerosos análisis bromatológicos que indican que este producto apícola es rico en proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, aminoácidos libres y minerales (González-Güereca y col., 2001). Sin embargo las propiedades curativas están documentadas en muchos casos con datos anecdóticos.

En México, son pocos los estudios enfocados a evaluar las propiedades curativas o terapéuticas del polen apícola, tales como su capacidad antineoplásica, antibacteriana y antioxidante. Estudios realizados principalmente en países europeos, han asociado esas capacidades del polen de abeja al contenido en él de una clase de compuestos menos conocidos y menos conspicuos que los que le confieren valor alimenticio, llamados compuestos fenólicos (Ribeiro, 1997).

Los principales compuestos fenólicos encontrados en el polen son los flavonoles, un tipo de flavonoides (Wiermann y Vieth, 1983) y solo en algunas especies se han encontrado también ácidos fenólicos (Ribeiro, 1997). Los primeros se encuentran en el polen como flavonoles glicósidos y menos frecuentemente como flavonoles agliconas. Las formas glicósidas, flavonol O-diglicósidos con enlaces glicosídicos 1→2, parecen ser compuestos exclusivos de estas estructuras reproductivas ya que no se han encontrado en los tejidos somáticos (Vogt y Taylor, 1995). De relevancia taxonómica y terapéutica es la característica de los perfiles fenólicos del polen de encontrarse en formas que tienden a ser especie-específicas (Ribeiro, 1997; Almaraz y col., 2002).

El polen apícola generalmente es una mezcla de cargas polínicas, cada una de ellas formada por el polen de prácticamente una sola especie vegetal (Ribeiro, 1997). Esto permite separar los diferentes polen constituyentes de una mezcla de polen apícola con base en la clasificación de las cargas polínicas por su color. La confirmación del origen botánico de cada polen constituyente se puede realizar por microscopía y principalmente por los perfiles fenólicos en HPLC (Ribeiro, 1997; Almaraz y col., 2002).

Existen varios estudios que demuestran que los flavonoles tienen propiedades antioxidantes importantes (Terao, 1999). Esto y la especificidad de los perfiles fenólicos sugieren que polen apícola colectado en regiones y épocas del año diferentes, con distinto origen botánico, tienen diferentes capacidades antioxidantes.

A pesar del reconocimiento del polen apícola como sustancia con propiedades antioxidantes, no existe suficiente información sobre la variabilidad en los niveles de esta actividad entre polen apícola de origen botánico diferente. Creemos que la sistematización de ese conocimiento podría contribuir a aumentar el consumo de este producto apícola y estimular el desarrollo de una apicultura integral. En este estudio se determinaron las capacidades antioxidantes, como bloqueadores de radicales libres y como inhibidores de la peroxidación lipídica, de polen apícola de diferente origen botánico. La asociación con el contenido y composición fenólica fue también evaluada.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue determinar las actividades antioxidantes de los extractos crudos de una mezcla de polen apícola de Durango, México y de sus polen constituyentes, por el método de dialdehído malónico-ácido tiobarbitúrico (MAD) en preparaciones microsomales de hígado y por el método del bloqueo del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH*) y comparar las actividades con la composición fenólica y con los contenidos de flavonoles en cada tipo de polen.

Materiales y Métodos

Muestras de polen.

El polen colectado por las abejas fue proporcionado por los apicultores de la localidad específicamente para este trabajo. La muestra se colectó, por medio de trampas para polen, en La Parrilla, Durango, México, en septiembre de 2002. Polen de las anteras de las especies en floración se colectó de las plantas que crecían en los alrededores del apiario. Los especímenes de referencia ("vouchers") se depositaron en el Herbario CIIDIR.

Análisis Microscópico

Para corroborar la homogeneidad y el origen botánico de las diferentes cargas polínicas se realizó el análisis microscópico de éstas, clasificadas previamente por su color. Polen de anteras de diferentes especies de plantas fue analizado de la misma manera. Todas las muestras se acetolizaron de acuerdo a Erdtman (1966) antes del análisis microscópico. Las observaciones se realizaron con un microscopio de contraste de fases Olympus BX40.

Preparación de los Extractos

La preparación de los extractos se llevó a cabo según Ribeiro (1997). Treinta gramos de cada tipo de polen apícola se extrajeron individualmente cinco veces en 200 ml de una solución de etanol-agua al 50% (v/v), con maceraciones de una hora. Los extractos se separaron por centrifugación. La mezcla de todos los sobrenadantes de un tipo formaron los extractos crudos. Los extractos crudos se concentraron a sequedad de manera individual en condiciones de vacío y temperatura de 38°C y se resuspendieron, también de manera individual, en 10 ml de etanol-agua al 50% para evaluar su actividad antioxidante.

HPLC

Los perfiles fenólicos de cada polen constituyente se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Ribeiro (1997), en un equipo Agilent 1100/detector de diodos, con una columna Zorbax SB-C18.

Actividad Bloqueadora de Radicales Libres

El método reportado por Ribeiro (1997) se utilizó para evaluar las actividades antirradicales libres. Se evaluaron cuatro concentraciones de cada muestra. Se adicionaron de manera individual a una solución de DPPH* (6.6 mg /100 ml en etanol-agua, al 50%, v/v) de tal manera que se mantuviera un volumen total final de 2 ml. Se midieron las absorbancias a 523 nm después de 10 minutos. Se calculó para cada tipo de polen, la concentración eficaz al 50%, definida como la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en 50% la concentración inicial de DPPH* (CE_{50}). Los estándares ácido ascórbico, ácido caféico, quercetina, quercitrina y ácido *p*-cumárico se evaluaron como se describió previamente para el extracto crudo. La siguiente curva de calibración, hecha con DPPH* entre 6.6 y 66.0 $\mu\text{g/ml}$, se usó para calcular la concentración de DPPH* ($\mu\text{g/ml}$) en el medio de reacción: $A_{523\text{ nm}} = 0.00021 + 0.0291 [\text{DPPH*}]$, coeficiente de correlación $r = 0.9999$.

Contenido de Flavonoles

Debido a que el polen es rico en flavonoles (Ribeiro, 1997), estos resultados se expresaron como equivalentes de quercetina (un flavonol). Las concentraciones de flavonoles en las alícuotas utilizadas de cada muestra se calcularon a partir de la curva estándar de quercetina: $Abs_{425\text{ nm}} = -0.0221 + 0.0549 [\text{Quercetina}]$, coeficiente de correlación $r = 0.9973$, y de las respectivas curvas de calibración de cada uno de los extractos crudos. Las absorbancias se registraron después de la adición de cloruro de aluminio a 425 nm. Las concentraciones de flavonoles se expresaron como μg equivalentes de quercetina/ml.

Inhibición de la Peroxidación Lipídica

La determinación de la inhibición de la peroxidación lipídica se realizó por medio de la cuantificación de DAM por el método usado por Ohkawa et al. (1979) en preparaciones microsomales de hígado de ratones macho de cuatro semanas de la cepa FI del Instituto Nacional de Virología. Las fracciones microsomales se prepararon de acuerdo al método de Diczfalussy et al. (1996). La cuantificación de proteínas en los microsomas se llevó a cabo por el método de Lowry (García y Vázquez, 1998). El extracto crudo y las sustancias de referencia (quercetina, ácido caféico y quercitrina) se evaluaron a cuatro concentraciones. Las actividades antioxidantes se expresaron en términos de la concentración de antioxidante requerida para inhibir la formación de DAM en 50% (CI_{50}) calculada a partir de curvas, obtenidas por regresión lineal, de concentración de DAM contra concentración de flavonoles en las muestras. El coeficiente de extinción molar de DAM ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se utilizó para calcular las concentraciones de esta sustancia en las mezclas de reacción.

Análisis Estadístico

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado. Los datos se sometieron a análisis de varianza ($p \leq 0.05$) y los valores medios se separaron por la prueba de Duncan. Los resultados se procesaron utilizando el programa de computadora COSTAT (1982).

Resultados

Análisis Microscópico

Con base en el color de las cargas polínicas, se identificaron seis tipos de polen constituyentes en la muestra de polen apícola (Tabla 1). El análisis microscópico mostró homogeneidad en cada carga polínica, confirmando las observaciones previamente reportadas por Campos y col. (1997) y Almaraz y col. (2000) acerca de que las cargas polínicas están formadas por el polen de una sola especie de planta. La información microscópica dio evidencia del origen botánico de los seis polen constituyentes. Las identificaciones botánicas se muestran en la tabla 1.

Perfiles Fenólicos

La composición fenólica de cada uno de los polen constituyentes se presenta en la tabla 1. Estas fueron características para el polen de cada especie. La ausencia de derivados de ácidos fenólicos caracteriza al polen de *Amaranthus hybridus* y *Zea mays*, la dominancia de ellos sobre los flavonoles glicósidos se manifiesta en el polen de *Solanum rostratum*.

Actividad Bloqueadora de Radicales Libres

La disminución de la concentración inicial de DPPH* en todos los extractos fue lineal, dependiente de la concentración de flavonoles en las muestras. Estos resultados muestran una clara correlación entre la concentración de flavonoles en los extractos crudos y la actividad bloqueadora de radicales libres para el comportamiento cinético de la desaparición del DPPH* en los medios de reacción, como fue reportado para algunos compuestos fenólicos (Brand-Williams et al., 1995), aceites vegetales (Espín et al., 2000) y vinos y uvas (Sánchez-Moreno et al., 1999). Sin embargo, una correlación clara entre el contenido de flavonoles en el polen y la actividad bloqueadora de radicales libres parece ser más difícil de establecer.

La tabla 2 presenta los valores de CE_{50} de las sustancias de referencia: quercetina, quercitrina, ácido caféico acid, ácido *p*-coumárico and ácido ascórbico. El ácido caféico mostró la capacidad bloqueadora de radicales libres más alta ($EC_{50} = 0.261 \mu\text{g/ml}$) entre los estándares probados y la quercitrina la más baja ($EC_{50} = 1.074 \mu\text{g/ml}$). Esta propiedad fue intermedia para la quercetina y el ácido ascórbico.

El extracto crudo de la muestra de polen de abeja y el de cada uno de los seis polen constituyentes fueron efectivos antioxidantes como bloqueadores de radicales libres, aunque con niveles de actividad más bajos que los de los estándares.

La tabla 3 muestra la relación entre las actividades bloqueadoras de radicales libres y el contenido de flavonoles en la mezcla de polen apícola y en los polen constituyentes individuales. Una correlación entre estos dos parámetros no es aparente en todos los casos.

Comparando la actividad bloqueadora de radicales libres de los extractos crudos de la mezcla y de cada uno de los seis polen constituyentes de manera individual, se puede apreciar que parece haber una correlación limitada entre el contenido de flavonoles y la actividad bloqueadora de radicales libres para polen de diferente origen botánico. Nuestros resultados sugieren que la composición fenólica más que la concentración de flavonoles podría ser determinante. La combinación particular de los flavonoles glicósidos y ácidos

fenólicos podría definir el nivel de capacidad antioxidante del polen de diferente origen botánico. En la muestra de interés, la mezcla de polen apícola y el polen constituyente de *Tagetes* sp (G2) tuvieron los niveles más altos de actividad bloqueadora de radicales libres ($CE_{50} = 6.451 \mu\text{g/ml}$ y $CE_{50} = 6.828 \mu\text{g/ml}$, respectivamente)

Peroxidación Lipídica

La disminución de DAM con el incremento en la concentración de flavonoles en las mezclas de reacción fue lineal, dependiente de la concentración de flavonoles en los medios de reacción.

Los respectivos valores de CI_{50} se muestran en la tabla 3. Los correspondientes a los estándares (quercetina y ácido caféico) se muestran en la tabla 2. Todos los extractos fueron efectivos inhibidores de la peroxidación lipídica, aunque como en el caso de la capacidad bloqueadora de radicales libres, una correlación con el contenido de flavonoles en el polen, no es clara. Nuestros resultados sugieren que los diversos niveles de actividad pueden estar asociados principalmente a los perfiles fenólicos especie-específicos más que a la concentración de flavonoles en el polen. En el polen apícola analizado, la mezcla entera y el polen constituyente de *Amaranthus hybridus* (G3) mostraron los niveles más altos de actividad inhibidora de la peroxidación lipídica ($CI_{50} = 0.731 \mu\text{g/ml}$ y $CI_{50} = 0.653 \mu\text{g/ml}$, respectivamente).

Conclusiones

Todos los extractos mostraron actividades antioxidantes. Éstas fueron diferentes para cada especie y no estuvieron claramente asociadas al contenido de flavonoles en el polen. El polen de *Amaranthus hybridus* mostró una alta capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica ($CI_{50} = 0.653 \mu\text{g/ml}$). El de la mezcla entera ($CE_{50} = 6.451 \mu\text{g/ml}$) y el de *Tagetes* sp. ($CE_{50} = 6.828 \mu\text{g/ml}$) fueron efectivos bloqueadores de radicales libres.

Referencias bibliográficas

- Almaraz-Abarca, N., Ávila-Reyes, J. A., Naranjo-Jiménez, N., Herrera-Corral, J. 2002. Perfiles fenólicos del polen apícola como parámetros de calidad. *Interciencia*, 1(2), 13-16.
- Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28 (1): 25-30.
- Campos, M. G.; K. R. Markham; K. A. Mitchel; A. Proenca da Cunha. 1997. An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochemical Analysis* 8:181-185.
- Diczfalussy M A, Björkhem I, Einarsson K, Alexson S E H. 1996. Acyl-coenzyme A: cholesterol *O*-acyltransferase is not identical to liver microsomal carboxylesterase. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 16: 606-610.
- Erdtman, G. 1970. Pollen morphology and plant taxonomy. Halner Publishing Company. New York.
- Espín J C, Soler-Rivas C, Wichers H J. 2000. Characterizations of the total free radical scavenger capacity of vegetable Oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 648-656.
- García A H, Vázquez D R. 1998. Cuantificación de proteínas: una revisión. *BioTecnología* 3: 77-88.
- González-Güerca, M. C., Almaraz-Abarca, N., Ávila-Reyes, J. A., Herrera-Corral, J., Naranjo-Jiménez, N. 2001. Polen apícola: una alternativa alimenticia y terapéutica. *Apitec*, 28,19-23.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351-358.

- Ortiz, B. J. y M. Medina. 2000. Los productos de las abejas sin aguijón y el resurgimiento de la meliponiterapia. Memorias del XIV Seminario Americano de Apicultura. Tamaulipas, México.
- Ribeiro, C. M. G. 1997. *Caracterização do polen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas*. Tesis de doutoramento. Faculdade de Farmacia. Universidade de Coimbra. Portugal.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri J A, Saura-Calixto F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International* 32: 407-412.
- Schwartz, H. F. 1948. Stingless bees (Meliponidae) of western hemisphere. Bulletin of the American Museum of Natural History. Vol. 90. pp. 546.
- Terao, J. 1999. Dietary flavonoids as plasma antioxidants on lipid peroxidation: significance of metabolic conversion. In L. Packer; M. Hiramatsu & T. Yoshikawa, *Antioxidant food supplements in human health*. (pp. 255-267). San Diego: Academic Press.
- Vogt, T., Taylor, L. P. 1995. Flavonol 3-O-glycosyltransferases associated with petunia pollen produce gametophyte-specific flavonol diglycosides. *Plant Physiology* 108:903-911.
- Wiermann, R., Vieth, K. 1983. Outer pollen wall, an important accumulation site for flavonoids. *Protoplasma*, 118, 230-233.

Tabla 1 Polen constituyentes (% en peso) de una mezcla de polen apícola de Durango, México y sus principales fenoles.

Polen Constituyente	%	Color	Tiempo de Retention (min)	Fenoles principales
<i>Zea mays</i> (G1)	24	Amarillo	30.47	Glicósido de Quercetin
			33.24	Derivado de Luteolina
			35.01	Flavonol glicósido
			35.72	Flavonol glicósido
			36.49	Glicósido de Quercetina
			38.87	Glicósido de Quercetina
<i>Tagetes</i> sp. (G2)	20	Amarillo-café	34.76	Glicósido de Quercetina
			36.54	Glicósido de Kanferol
			37.88	Glicósido de Kanferol
			50.14	Derivado de Ácido Cinámico
			53.27	Derivado de Ácido Cinámico
<i>Amaranthus hybridus</i> (G3)	18	Verde	34.02	Flavonol glycosido
			34.09	Flavonol glycosido
			34.17	Flavonol glycosido
			34.69	Flavonol glycosido
			37.82	Flavonol glycosido
<i>Solanum rostratum</i> (G4)	17	Amarillo verde	36.43	Glicósido de Kanferol
			39.58	Derivado de Ácido Cinámico
			43.52	Derivado de Ácido Cinámico
			45.09	Derivado de Ácido Cinámico
			46.03	Derivado de Ácido Cinámico
			52.97	Derivado de Ácido Cinámico
<i>Bidens odorata</i> (G5)	14	Naranja	38.61	Quercetin glycoside
			39.60	Quercetin glycoside
			53.56	Cinnamic acid derivative
<i>Ranunculus petiolaris</i> (G6)	7	Amarillo Claro	44.56	Glicósido de Quercetina
			45.18	Glicósido de Quercetina
			46.03	Glicósido de Kanferol
			47.11	Glicósido de Kanferol
			53.06	Derivado de Ácido Cinámico

Tabla 2 Actividades antioxidantes de las sustancias de referencia.

Compounds	CE ₅₀ (µg/ml) ^a	CI ₅₀ (µg/ml) ^a
Quercetin	0.433 ± 0.007	2.201 ± 0.139
Quercitrin	1.074 ± 0.012	*
Caffeic acid	0.261 ± 0.004	1.742 ± 0.308
Ascorbic acid	0.613 ± 0.003	*
<i>p</i> -coumaric acid	NA	*

^a : muestras analizadas por triplicado.

* : no evaluadas

NA: no actividad

Tabla 3 Relación entre las actividades antioxidantes y el contenido de flavonoles en las muestras de polen

Extractos crudos	Contenido total de flavonoles (µg/g polen) ^a	CE ₅₀ (µg/ml) ^a	CI ₅₀ (10 ⁻¹ µg/ml) ^a
Mezcla G	3435.106 ± 84.985	6.451 ± 0.308 d	0.731 ± 0.044 d
G6	1648.285 ± 42.142	9.861 ± 0.290 b	5.232 ± 0.424 b
G2	534.116 ± 5.843	6.828 ± 0.355 d	2.573 ± 0.120 c
G3	506.073 ± 4.422	13.946 ± 0.891 a	0.653 ± 0.016 d
G4	447.999 ± 2.857	8.351 ± 0.665 c	5.931 ± 0.457 b
G1	402.833 ± 2.254	10.294 ± 0.608 b	16.216 ± 2.317 a
G5	183.595 ± 6.911	9.339 ± 0.303 b	3.571 ± 0.288 c

^a muestras analizadas por triplicado.

Las letras indican diferencias significativas (p ≤ 0.5)