



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Capacidad antioxidante y contenido fenólico total en polen apícola

Autor: Raúl Merino Gaspar

Tutora: María Teresa Martín Gómez

Quiero agradecer a mi tutora, la Dra. María Teresa Martín Gómez, su ayuda y dedicación recibidas durante la realización de este trabajo. De igual forma, expreso mi agradecimiento a los profesores del Grupo de Investigación TESEA (I.U. CINQUIMA) del Departamento de Química Analítica por sus enseñanzas.

Hago extensivo este agradecimiento a mis compañeros de laboratorio.

Dedico este trabajo a mis padres y a mi hermano, por su apoyo incondicional y su confianza, a mis amigos, por alentarme a seguir adelante en todo momento, y a Sofía, por creer en mí y nunca dejarme tirar la toalla.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
3.1. POLEN APÍCOLA Y SU COMPOSICIÓN	3
3.2. LAS ABEJAS Y LA APICULTURA.....	6
3.3. ANTIOXIDANTES	9
3.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y SU DETERMINACIÓN.....	11
3.4.1 MÉTODO DPPH	12
3.4.2 MÉTODO ABTS	14
3.5 MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU	15
4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	17
5. EXPERIMENTAL	18
5.1 EQUIPO.....	18
5.2 MATERIAL Y REACTIVOS	18
5.3 PATRONES.....	19
5.4 MUESTRAS	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
6.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE POLEN APÍCOLA	22
6.1.1. METODO DPPH	22
6.1.2. MÉTODO ABTS.....	29
6.2 CONTENIDO FENÓLICO TOTAL (TFC) DEL POLEN APÍCOLA.....	34
7. CONCLUSIONES.....	37
8. ANEXOS	38
8.1. ABREVIATURAS.....	38
8.2 LISTADO DE FIGURAS.....	39
8.3 LISTADO DE TABLAS.....	40
9. BIBLIOGRAFÍA	41

1. RESUMEN

En la actualidad, hay un creciente interés por la incorporación de antioxidantes a la dieta debido a la gran cantidad de beneficios que pueden aportar a nuestro organismo como protectores contra enfermedades cardiovasculares, cancerígenas, enfermedades autoinmunes o enfermedades relacionadas con la edad.

Los antioxidantes son moléculas que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados para prevenir o retardar los mecanismos de oxidación, algunos ejemplos son la vitamina C, vitamina E, selenio o flavonoides.

El polen recolectado por las abejas es un producto apícola utilizado en la dieta humana durante muchos siglos siendo su consumo cada día más habitual, debido a sus propiedades nutricionales y saludables. La composición del polen de abeja entre la que se encuentran compuestos como proteínas, aminoácidos, lípidos, presenta altos contenidos en compuestos fenólicos con propiedades farmacológicas y antioxidantes.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad antioxidante y la presencia de fenoles totales en polen de abeja multifloral, procedente de supermercados de Valladolid y de polen de abeja monofloral proveniente de colmenares experimentales de Guadalajara.

Para evaluar la capacidad antioxidante se utilizaron dos métodos espectrofotométricos diferentes, el método 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) y el 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), y para determinar el contenido fenólico total se utilizó el método Folin-Ciocalteu

Ha sido necesario llevar a cabo un tratamiento previo de la muestra mediante una extracción sólido-líquido (SLE). Se ha llevado a cabo un estudio de las distintas variables implicadas en la extracción con el fin de conseguir los máximos niveles de capacidad antioxidante y de contenido fenólico total en el polen.

2. ABSTRACT

At present, there is a growing interest in the incorporation of antioxidants to the diet due to the large number of benefits that they can bring to our body as protectors against cardiovascular diseases, cancer, autoimmune diseases or age-related diseases.

Antioxidants are molecules that have very varied chemical structures and mechanisms of action to prevent or delay oxidation mechanisms, some examples are vitamin C, vitamin E, selenium or flavonoids.

The pollen collected by bees is a bee product used in the human diet for many centuries, its consumption being more common every day, due to its nutritional and healthy properties. The composition of bee pollen, among which are compounds such as proteins, lipid amino acids, has high contents of phenolic compounds with pharmacological and antioxidant properties.

The objective of this work was to determine the antioxidant capacity and the presence of total phenols in multifloral bee pollen from supermarkets in Valladolid and monofloral bee pollen from experimental apiaries in Guadalajara.

To evaluate the antioxidant capacity, two different spectrophotometric methods were used, the 2,2-Diphenyl-1 picrylhydrazyl (DPPH) and the 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method), and to determine the total phenolic content was used the Folin-Ciocalteau method.

It has been necessary to carry out a previous treatment of the sample by means of a solid-liquid extraction (SLE). A study of the different variables involved in the extraction has been carried out in order to achieve the maximum levels of antioxidant capacity and total phenolic content in the pollen.

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

3.1. POLEN APÍCOLA Y SU COMPOSICIÓN

La palabra polen deriva del latín “*pollen – inis*” que significa “polvo muy fino”. El polen ha sido utilizado como alimento desde la antigüedad, pero no es hasta el siglo XIX cuando se muestra el interés por su morfología.

El polen se presenta como granos microscópicos que se forman en los sacos polínicos de las anteras de los estambres de la flor. El objetivo de los granos de polen es fecundar los óvulos para formar semillas, siendo necesarios para la reproducción de las plantas. [1,2].



Figura 1: El polen apícola

La polinización se puede definir como el transporte de polen desde las anteras hasta el pistilo de una flor, es decir, de la parte masculina a la femenina. Los granos de polen se transportan entre flores bien por el aire (polinización anemófila) o bien por los insectos (polinización entomófila). El polen consta de una cubierta llamada esporodermis y está constituida por una pared celular interna llamada intina y la externa llamada exina. Las especies anemófilas suelen tener cubierta lisa y ofrecen menos resistencia al aire para facilitar su transporte, mientras que en las especies entomófilas la cubierta es gruesa y tienen espinas o verrugas para engancharse a los animales polinizadores. Además, suelen ser más grandes que los granos de polen anemófilos. [1]

Las abejas recogen el polen de los estambres de las flores y lo aglutinan con néctar o miel formando acúmulos, que transportan en una especie de cestillas en sus patas traseras llamadas corbículas. El peso del polen apícola suele estar entre 4 y 10 mg, suelen ser pelotas redondas y de diferentes tonos, desde amarillo, naranja o marrón, hasta rojo, negro y verde. El color también depende de la presencia de flavonoides, de la exposición al sol y al aire y de la especie de flores. [1,3]

La abeja deposita el polen en celdillas dentro de la colmena, recubriéndolo de miel, donde se produce la transformación fermentativa convirtiéndose en “pan de abeja”, conservándose por el ácido láctico que se forma. El polen es muy rico en nutrientes, que sirve de alimento a las larvas durante su desarrollo. También es necesario para el desarrollo de órganos y tejidos en abejas adultas, cuerpos grasos, glándulas hipofaríngeas y el crecimiento de los ovarios de las abejas recién nacidas.

Por lo tanto, los granos de polen son un compuesto nutricional muy importante para las larvas, las abejas jóvenes y también para las abejas reinas. [1,3]

El polen apícola es un alimento que contiene numerosos compuestos bioactivos beneficiosos para la salud. La composición del polen varía según su origen geográfico, el hábitat ecológico y la estación del año. Por ello, hay una variación grande entre los valores mínimos y máximos. [3,4,5]

Composición química: [3]

- Componentes principales:
 - Proteínas (5-60%)
 - Aminoácidos esenciales (13-55%).
 - Lípidos (4-7%).
 - Ácidos nucleicos (0.3-20%).

- Componentes secundarios: Son mucho más minoritarios.
 - Minerales: Fe, Cu, Ca, Mg, Zn.
 - Vitaminas: Ácido ascórbico, β -caroteno, tocoferol, ácido fólico, enzimas y coenzimas.
 - Ácidos grasos saturados e insaturados.
 - Fosfolípidos.
 - Fitoestanoles.
 - Polifenoles (flavonoides principalmente).

Tabla 1: Composición del polen apícola y requerimientos nutricionales humanos.

Main components	Amount (g kg ⁻¹)	% RDI for 15 g pollen	RDI
Carbohydrates			
Fructose, glucose, sucrose, fibre	130–550	1–46	320
Crude fibre	3–200	0.3–18	30
Protein	100–400	5.4–22	50
Fat	10–130	0.1–4	80
Vitamins			
Ascorbic acid (vitamin C)	0.07–0.56	2–15	100
β -Carotene (provitamin A)	0.01–0.20	30–600	0.9
Tocopherol (vitamin E)	0.04–0.32	8–66	13
Niacin (vitamin B ₃)	0.04–0.11	7–20	15
Pyridoxin (vitamin B ₆)	0.002–0.007	4–13	1.4
Thiamin (vitamin B ₁)	0.006–0.013	15–32	1.1
Riboflavin (vitamin B ₂)	0.006–0.02	12–42	1.3
Pantothenic acid	0.005–0.02	2–9	6
Folic acid	0.003–0.01	20–67	0.4
Biotin (vitamin H)	0.0005–0.0007	30–42	0.045
Minerals			
Potassium (K)	4–20	5–27	2000
Phosphorus (P)	0.80–6	2–16	1000
Calcium (Ca)	0.20–3	0.5–7	1100
Magnesium (Mg)	0.20–3	2–23	350
Zink (Zn)	0.03–0.25	10–79	8.5
Manganese (Mn)	0.02–0.11	15–85	3.5
Iron (Fe)	0.011–0.17	2–37	12.5
Copper (Cu)	0.002–0.016	4–36	1.2

Dada su composición el polen es un alimento muy completo, siendo un suplemento perfecto en las dietas.

Además, el polen apícola es muy importante en la salud, ya que puede utilizarse como antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, antibacteriano, hepaprotector y en actividades de regulación del sistema inmunitario. [3]

Algunos estudios indican que tiene efectos beneficiosos en prevención de problemas de próstata, enfermedades respiratorias, arteriosclerosis, gastroenteritis y problemas en el sistema cardiovascular y digestivo. A su vez, posee una buena actividad

antioxidante, por lo que puede ser útil en la prevención de enfermedades en las que los radicales libres estén implicados. [3,6]

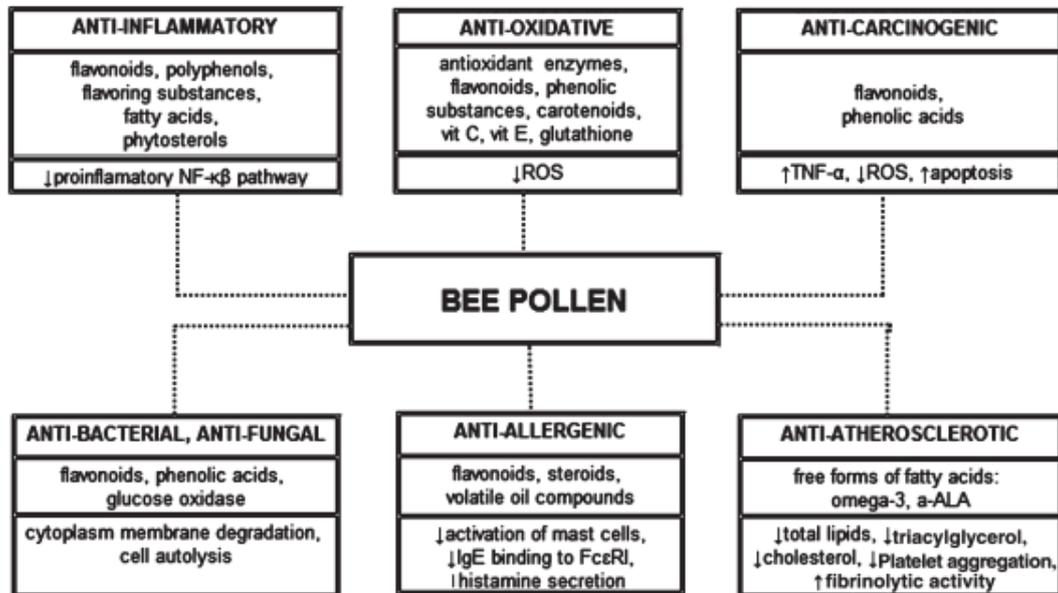


Figura 2: Propiedades terapéuticas del polen apícola:

3.2. LAS ABEJAS Y LA APICULTURA

Las abejas son las mayores especies polinizadoras según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) ya que se encargan de polinizar el 70% de las plantas destinadas al abastecimiento. [7]

Las abejas recolectan el polen desde el final del invierno hasta el final de la primavera.

Algunos factores meteorológicos pueden afectar a la recogida del polen. El viento hace que las abejas vuelen más despacio y tarden más en recolectar y además tengan que ejercer más energía para llevar el polen a la colmena. La lluvia impide la recolección, ya que al mojarse no pueden aletear. Además, la lluvia puede llegar a ahogar a las abejas.[1]

Las abejas pueden recorrerse 8 km en busca de alimento, por lo que cuanto más cerca se encuentren las flores de la colmena, más visitas recibirán de las abejas, ya que las primeras llegarán a la colmena avisando a sus hermanas, que irán a por el resto del polen. [8]

La abeja doméstica o abeja Melífera es la especie con mayor población mundial. Estas abejas pertenecen a la familia Apidae (orden Hymenoptera) y se encontraron originalmente en Europa y África, expandiéndose gracias a la exportación de colmenas hasta el resto del mundo. [1]

La estructura jerárquica de sus colmenas se divide de la siguiente manera: [1,9]

- Abeja Reina: Son las que forman las colonias. La abeja reina es la única hembra capaz de tener descendencia dentro de la colonia. Es capaz de poner huevos fecundados para dar abejas obreras o huevos sin fecundar para criar zánganos. Tienen una esperanza de vida de entre 2 y 4 años.

- Abejas Obreras: Forman la mayor población de la colmena (entre 200000 y 800000). Son los individuos más pequeños. Nacen de huevos fecundados de los que sale una larva, la cuál es alimentada con jalea real durante los tres primeros días y posteriormente con pan de abejas (mezcla de agua, polen y miel). Su esperanza de vida varía según la época del año en el que nazcan y de los trabajos que realicen durante su vida en la colmena. Suele rondar los 6 u 8 meses.

Las abejas nodrizas (son las abejas con 7-12 días de vida) limpian las colmenas y alimentan a las crías. Posteriormente, cuando ya tienen 21 días de Vida, hacen sus primeros vuelos fuera de la colmena y eliminan las larvas y abejas muertas, almacenan polen, maduran el néctar, vigilan la colmena y segregan cera que usan para la construcción de celdillas de los panales. Cuando ya son abejas adultas se encargan de recolectar alimento (néctar, polen, agua, propóleo).

También se encargan de la termorregulación de la colmena, una tarea muy importante, ya que deben mantener la colmena entre los 32º y los 36º.

- Zánganos: Proceden de los huevos sin fecundar de las abejas reinas, siendo de mayor tamaño que las abejas obreras. Su principal función es fecundar a la abeja reina y ayudan a las abejas obreras a termoregular la colmena.

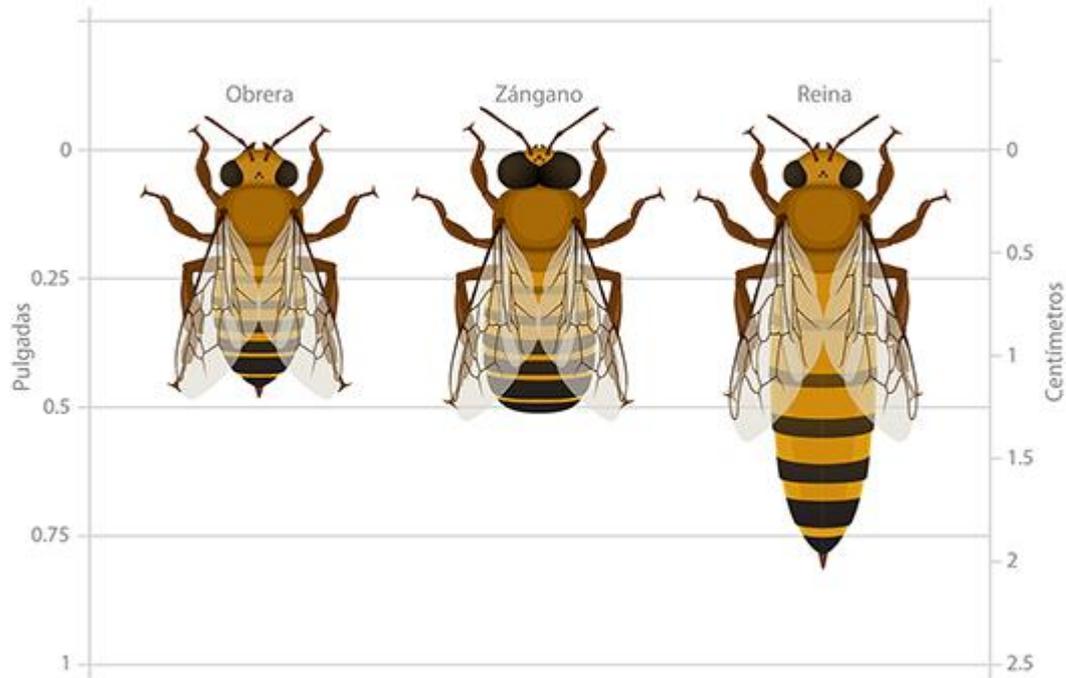


Figura 3: Tamaño de las diferentes clases de abejas.

La apicultura es una actividad humana muy antigua. Se han encontrado pinturas rupestres de más de 8000 años en la que se plasman escenas de recolección de miel en colmenas. También un estudio asegura que alrededor del año 2400 a.C los humanos intentaron cuidar una colmena de abejas en un tronco y en vasijas de cerámica. Existen evidencias de que los egipcios, los griegos y los romanos tenían conocimientos apícolas y de la recolección de miel y cera.

La palabra apicultura proviene del latín *Apis* (*abeja*) y *Cultura* (*cultivo*), es decir, la actividad humana que se dedica a la cría de abejas.

En la actualidad existen dos tipos de apicultura:

- Apicultura sedentaria: La colmena se encuentra siempre en la misma ubicación, necesitando las abejas ser alimentadas en algunas épocas del año. Dependen de las condiciones del medio en el que se desarrollan.
- Apicultura trashumante: La ubicación de la colmena varía buscando la zona geográfica en la que las abejas se adapten mejor, es decir, aprovechan las floraciones y las condiciones climatológicas más beneficiosas. [1,9]



Figura 4: Abeja polinizando una flor.

3.3. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes se pueden definir como sustancias que se oponen a la oxidación o inhiben las reacciones promovidas por el oxígeno o los peróxidos. Estas sustancias se suelen utilizar como conservantes en diversos productos ya que son capaces de preservarlos retardando su deterioro, ranciedad y formación de compuestos tóxicos. También pueden considerarse como moléculas que eviten la oxidación por parte de otras moléculas (como pueden ser los radicales libres) y que tienen beneficios para la salud humana. [10,11]

El estrés oxidativo en la salud humana tiene efectos desfavorables que se han convertido en un serio problema ya que bajo estrés el organismo produce más especies reactivas de oxígeno (ROS) (radicales hidroxilos, peróxido de hidrógeno y anión superóxido) que antioxidantes enzimáticos (como la superóxido dismutasa (SOD)) y antioxidantes no enzimáticos (como la Vitamina C, la vitamina E, carotenoides y flavonoides). Esto causa enfermedades como la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, la inflamación crónica, la diabetes y algunos tipos de cáncer, por lo que necesitamos antioxidantes que contrarresten el estrés oxidativo. [12,13]

Existen diversas formas de producir antioxidantes. Cuando los antioxidantes son sintetizados por microorganismos, hongos y plantas los denominamos antioxidantes

naturales. Últimamente ha aumentado el interés por ellos, aunque algunos tienen aplicaciones limitadas y necesitan de más pruebas de seguridad. Luego están los antioxidantes sintéticos que son los que se producen por la síntesis o biosíntesis de los antioxidantes en la industria. Estos se han producido en beneficio de la humanidad, para incorporarlos en dietas o añadirlos a los alimentos. Aunque su seguridad ha sido probada para proteger a los consumidores, los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) o el butilhidroxianisol (BHA) están muy controlados ya que pueden estar detrás de daños hepáticos, reacciones alérgicas y origen de cánceres. Existen un tercer grupo de antioxidantes que combinan ventajas de los antioxidantes naturales y sintéticos, denominados antioxidantes idénticos a la naturaleza. Son antioxidantes idénticos a los naturales, pero han sido sintetizados en la industria. Suelen ser más fáciles de obtener, más baratos y de propiedades reproducibles. [12,14]

A los antioxidantes también se les conoce como inhibidores de la oxidación ya que son captadores de radicales libres. El antioxidante choca con un radical libre, le cede un electrón oxidándose, transformándose en un radical libre no tóxico. Los radicales libres se producen por generación endógena (mecanismos como la respiración mitocondrial o mecanismos de defensa) o agentes exógenos (a través de la dieta, del alcohol o del humo del tabaco). Un radical libre es un intermedio químico con uno o varios electrones desapareados de existencia independiente, pero muy reactivo y que tiene una vida media corta. Estos radicales atacan lípidos, moléculas de ADN, proteínas y carbohidratos, participando en las enfermedades ya comentadas anteriormente (enfermedades neurodegenerativas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc.). Los radicales más frecuentes son los radicales superóxidos (O_2^-), hidroxilo ($OH\cdot$), peróxido ($ROO\cdot$) o el óxido nítrico ($NO\cdot$). También hay algunos que no son radicales propiamente dicho como el ozono (O_3), algunos ácidos (HClO, HBrO) e iones como el catión nitrilo (NO_2^+) o el peroxonitrilo ($ONOO^-$).

Hay estudios que demuestran que hay una relación inversa entre la aparición de enfermedades humanas y la incorporación de alimentos ricos en antioxidantes en la dieta. Las principales fuentes de antioxidantes naturales en la dieta humana son los cereales, vegetales, frutas, bebidas (como té y café) y el polen. Los antioxidantes naturales más habituales en el polen son los ácidos fenólicos y los flavonoides. [10,11,12,13,14]

En los sistemas biológicos se encuentran al menos cuatro fuentes principales de antioxidantes:

- Enzimas: Superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa.
- Hormonas: melatonina, angiotensina o estrógenos.
- Moléculas pequeñas: ácido ascórbico, ácido úrico, carotenoides o polifenoles.
- Macromoléculas: ferritina, albúmina o ceruloplasmina. [15]

3.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y SU DETERMINACIÓN

La función antioxidante es la capacidad que tiene un compuesto para disminuir la degradación oxidativa. Suele expresarse como acción, actividad, poder, actividad o capacidad antioxidante (AC). [13]

En la actualidad, está aumentando el interés de las propiedades antioxidantes tanto para los profesionales médicos y nutricionistas, como para los propios consumidores, por sus beneficios en la salud humana. Hay que tener precaución en la manera de procesar los alimentos, para mantener las propiedades antioxidantes en las comidas.

Los mecanismos de actuación de los antioxidantes son muy diversos y dependen de factores como el tipo de antioxidante, la matriz y las condiciones de reacción. Además, la respuesta de los antioxidantes depende del tipo de radical con el que reaccionen. [16]

Un buen estudio de la capacidad antioxidante debería reflejar varios ensayos, ya que ningún método es capaz de reflejar con exactitud los diferentes antioxidantes o las distintas fuentes de radicales por sí solo. [13]

Los diferentes métodos para evaluar la capacidad antioxidante se pueden clasificar según su mecanismo de reacción: [13,15]

- Métodos basados en mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT): Este método mide la capacidad de un antioxidante de captar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno, formando compuestos estables. Las reacciones HAT suelen ser rápidas e independientes del pH y de los disolventes. Dentro de los métodos HAT se incluyen el método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity), TOSC (Total oxidant scavenging capacity), TRAP (Total radicaltrapping antioxidant parameter) y métodos de quimioluminiscencia y fotoquimioluminiscencia, método del β -caroteno y la oxidación de LDL (lipoproteínas de baja densidad).
- Métodos basados en mecanismos de transferencia de un único electrón (SET): determinan la capacidad de un antioxidante de transferir un electrón para reducir cualquier compuesto (incluidos metales, carbonilos y radicales). Estas reacciones son más lentas que las HAT y de larga duración. Se incluyen el método FRAP (Ferric reducing antioxidant power) y el método Cuprac (Cupric ion reducing antioxidant capacity).

- Métodos que pueden usar ambos mecanismos: Los métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) son métodos que pueden actuar por mecanismo HAT y SET. Los radicales pueden ser captados por transferencia de átomos de hidrógeno o neutralizados por transferencia de electrones. Ambos mecanismos pueden ocurrir a la vez, siendo uno más dominante que otro en función de las propiedades de antioxidantes y radicales, de las condiciones del medio y de la reacción.

Como se ha comentado con anterioridad, es necesario utilizar más de un método para calcular la capacidad antioxidante. En este trabajo se decidió utilizar los métodos DPPH y ABTS, los cuales se explican a continuación. El DPPH es un método más sensible y simple. Sus resultados son altamente reproducibles y comparables con otros métodos como el ABTS. Los resultados obtenidos tienen algunas diferencias ya que en el DPPH la forma reducida se obtiene al mezclar el compuesto con los compuestos antioxidantes, mientras que para el ABTS la forma reducida se tiene constantemente como $ABTS^{\cdot+}$

3.4.1 MÉTODO DPPH

En 1958 M.S Blois introdujo el método del DPPH al analizar el tiol contenido en la cisteína. Es un método muy utilizado a la hora de estudiar antioxidantes naturales. [17]

Se basa en la neutralización del radical DPPH por parte de moléculas antioxidantes donadoras de hidrógenos, observándose una disminución en la absorbancia de dicho radical.

El radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) es un radical de nitrógeno orgánico estable por la deslocalización del electrón libre de la molécula, lo que produce también su color púrpura intenso. Se encuentra preparado, por lo que no es necesario generarlo antes del ensayo. En el ensayo del DPPH se mide la capacidad reductora de los antioxidantes frente al DPPH, antioxidantes que al mezclarse con el radical lo reducen a la hidracina de color amarillo pálido debido a la pérdida de la deslocalización. [13,15,18]

3.4.2 MÉTODO ABTS

El primer ensayo para producir el catión radical ABTS [2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] fue realizado por Miller y Rice-Evans activando la metamioglobina con peróxido de hidrógeno con el ABTS, en presencia o ausencia de antioxidantes. Este ensayo fue muy criticado ya que los antioxidantes de reacción rápida pueden reducir el radical ferril mioglobina. Posteriormente, se encontró una técnica mejor, que se basa en la decoloración, donde el radical ABTS se genera directamente de forma más o menos estable antes de que reaccione con antioxidantes.

El radical ABTS tiene una coloración azul intenso con una banda de absorción en torno a los 734 nm. La capacidad antioxidante se mide con la disminución de la absorbancia a esa longitud de onda. [13,15,20]

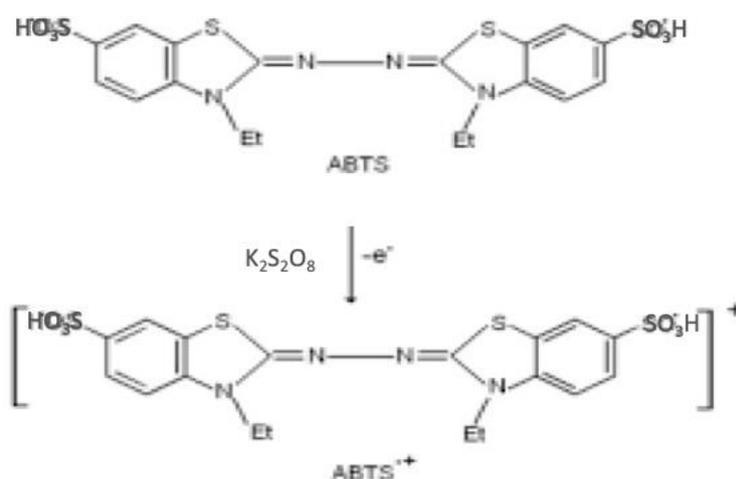


Figura 6: Reacción general entre el ABTS y los compuestos antioxidantes.

El radical ABTS: se puede formar por reacciones enzimáticas o químicas: [13,15,21]

- Reacciones químicas: con dióxido de manganeso (MnO_2), persulfato potásico ($K_2S_2O_8$) o radicales peroxil generados en la termólisis aeróbica del AAPH. Requieren tiempos elevados y altas temperaturas.
- Reacciones enzimáticas: con peroxidasas o mioglobina. Son más rápidas y con condiciones más suaves.

En las reacciones químicas los oxidantes que más se utilizan son MnO_2 , $K_2S_2O_8$ y AAPH ya que son los que menos interferencias presentan en la formación del radical. [13,15]

En casi todos los experimentos encontrados se usa persulfato potásico para la formación del radical. Para ello, se mezcla una disolución de ABTS 7 mM en agua con persulfato potásico, siendo la concentración final 2,45 mM. Esta mezcla se deja que reaccione en la oscuridad y a temperatura ambiente entre 12 y 16 horas. Así, el radical $ABTS^{\cdot+}$ estaría formado y listo para su uso. [20,22]

De esta manera, la estabilidad del radical con persulfato aumentará cuanto mayor sea la relación ABTS/persulfato, valor entre 2 y 3. También dependerá del oxidante y las condiciones en las que reaccione y se almacene, pero según varios autores la estabilización es mayor si se forma el radical a temperatura ambiente y posteriormente se almacena en la nevera a unos 5°C. De esta manera, conseguimos que el radical formado dure hasta dos días. [20,21]

Con el radical formado, la disolución se diluye en etanol o tampón fosfato hasta que el valor de la absorbancia sea de 0.7 ($\pm 0,02$) a 734 nm, pudiendo usarse para calcular la capacidad antioxidante, cuyos resultados se expresarán en TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox). [20,23]

Este método tiene una serie de ventajas e inconvenientes. Es un método simple y se puede usar en un amplio rango de pH. Además, el radical $ABTS^{\cdot+}$ es soluble en disolventes acuosos y orgánicos y reacciona con los antioxidantes muy rápido.

Entre las limitaciones del método destaca que el intervalo en el que se puede usar es muy pequeño, ya que si hay una elevada concentración de antioxidante se necesitaría mucho ABTS dando lugar a concentraciones grandes, mientras que, si hay una concentración pequeña de antioxidantes, la absorbancia disminuiría tan poco que no podría medirse. [15]

3.5 MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

El contenido fenólico total (TFC) se puede analizar por diversos métodos. El procedimiento más utilizado es el ensayo de Folin-Ciocalteu (FC), un método colorimétrico que se fundamenta en las reacciones de transferencia de electrones entre el reactivo Folin-Ciocalteu y los compuestos fenólicos. En este ensayo el contenido fenólico se puede expresar respecto a diferentes patrones (siendo el más habitual el ácido gálico). [11,24,25]

El método de Folin-Ciocalteu fue determinado en 1927 por Otto Folin y Vintila Ciocalteu y surgió para optimizar el ensayo de Folin y Denis que se usaba para el

análisis de proteínas calculando su concentración total a través del contenido en tirosina (contiene un grupo fenol). [25,26]

Durante años este método ha sufrido distintas modificaciones. Se destaca la de V.L. Singleton y J.A. Rossi Jr. en 1965, los cuales adaptaron este ensayo para poderlo aplicar a la determinación de fenoles totales en vino. También desarrollaron que los resultados han de ser expresados en equivalentes de ácido gálico (mg ácido gálico por 100 g muestra). [27]

La naturaleza química del reactivo Folin-Ciocalteu (FC) aún no se ha analizado con exactitud, pero numerosos estudios indican que está formado por heteropolifosfowolframatos-molibdatos que dan el color amarillo intenso de la disolución. La reacción se produce entre el reactivo y los polifenoles, dando un compuesto de color azul intenso. La complejidad de esta reacción hace que lo único que sepamos de ella es que se produce por secuencias reversibles de reacciones de reducción. Se cree que el molibdeno es más fácil de reducir, por lo que la transferencia de electrones se produce entre el molibdato (VI) (oxidante) y los polifenoles (reductor).[24]

El ensayo de Folin-Ciocalteu no está delimitado para la determinación del contenido fenólico total. Algunos compuestos no fenólicos como la Vitamina C o los azúcares reductores pueden provocar resultados erróneos. Es por ello por lo que se añade el carbonato sódico, para tener un pH en torno a 10 (básico), produciéndose el anión fenolato el cual reduce el reactivo Folin-Ciocalteu.

El método de Folin-Ciocalteu es un método sensible, reproducible y preciso, y que por su simplicidad se usa regularmente en el análisis de distintos tipos de matrices, incluyendo el polen apícola. [11]

4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo ha sido evaluar la capacidad antioxidante de diferentes tipos de polen apícola multifloral, procedente de supermercados de Valladolid y de polen de abeja monofloral proveniente de colmenares experimentales de Guadalajara. Empleando los métodos DPPH y ABTS. Además, se ha determinado el contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteu (FC).

Se plantean como objetivos secundarios:

- Una correcta preparación de muestras de polen apícola para su posterior análisis y manejo del material del laboratorio para dicho fin.
- La correcta utilización del espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis y su interpretación una vez finalizado el análisis.
- La obtención de la concentración equivalente en Trolox (mg Trolox/g muestra) de la capacidad antioxidante y de la concentración equivalente en ácido gálico (mg ácido gálico/g muestra) del contenido fenólico total de cada muestra.
- Conclusión y explicación de los datos obtenidos.

El plan de trabajo seguido fue el siguiente:

- Revisión de antecedentes bibliográficos relacionados con el tema para obtener la máxima información acerca de las técnicas a utilizar.
- Determinación de la capacidad antioxidante de las muestras tanto por el método DPPH como por el método ABTS.
- Comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos.
- Determinación del contenido fenólico total de todas las muestras mediante el método Folin-Ciocalteu.
- Comprobar la posible correlación entre el contenido fenólico total obtenido para cada muestra, y su capacidad antioxidante.

5. EXPERIMENTAL

5.1 EQUIPO

Para el desarrollo de este trabajo se ha utilizado el espectrofotómetro V-650 de Jasco Corporation (Tokio, Japón):



Figura 7: Espectrofotómetro V-650 de Jasco Corporation.

Este espectrofotómetro determina el espectro de absorción molecular de las muestras en un rango de longitud de onda de 190 a 900 nm. Tiene dos lámparas, una de ellas de deuterio (D_2) para la región del UltraVioleta (de 187 a 350 nm) y una lámpara halógena para la región del Visible/Infrarrojo (de 330 a 900 nm).

5.2 MATERIAL Y REACTIVOS

El material y equipos adicionales empleados fueron los siguientes:

- Balanza analítica de precisión Mettler AE-240 (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España).

- Agitador oscilante Vibromatic de Selecta (Barcelona, España).
- Centrífuga Eppendorf 5810R (Hamburgo, Alemania).
- Ultra Turrax IKA T18 Basic.
- Baño de ultrasonidos de J.P Selecta (Barcelona, España).
- Pipetas y micropipetas Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania).
- Molinillo Carrefour Home.
- Molinillo Taurus Aromatic.
- Tubos de centrifuga graduados con tapón.
- Material de laboratorio de uso general (vasos de precipitados, matraces aforados, espátula, pipetas Pasteur, probetas, tubos de ensayo, gradillas, pesasustancias, vidrios de reloj, embudos, ...).

Los reactivos y disolventes empleados en este estudio fueron:

- Etanol absoluto (Reag. USP, Ph. Eur) for análisis, ACS, ISO, (EtOH), Panreac Applichem ITW Reagents – 99,8% pureza (Barcelona, España).
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) de Sigma Aldrich (Madrid, España).
- ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) de Sigma Aldrich (Madrid, España).
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico) de Sigma Aldrich (Madrid, España).
- Persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) de E. Merck (Darmstadt, Alemania).

5.3 PATRONES

Para la cuantificación de la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total en las diferentes muestras de polen se utilizaron patrones de Trolox y de ácido gálico.

Para llevar a cabo la determinación de la capacidad antioxidante empleando el método DPPH se preparó una disolución de concentración 750 mg/l de trolox en etanol puro y a partir de ella se obtuvieron disoluciones de concentraciones comprendidas entre 30 y 225 mg/l.

Para llevar a cabo la determinación de la capacidad antioxidante empleando el método ABTS se preparó una disolución de concentración 500 mg/l en etanol puro y a partir de ella se obtuvieron disoluciones de concentraciones comprendidas entre 10 y 90 mg/L.

Para la determinación del contenido fenólico total por el método de Folin Ciocalteu se utilizó como patrón el ácido gálico ($C_7H_6O_5$). Se preparó una disolución de concentración 1000 mg/l en agua ultrapura y a partir de ella se obtuvieron disoluciones de concentraciones comprendidas entre 25 y 300 ppm.

5.4 MUESTRAS

Se analizaron tres muestras comerciales de polen apícolas obtenidos de supermercados de Valladolid y tres muestras procedentes de colmenares situados en Guadalajara y proporcionados por el Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA) de Marchamalo, que a diferencia de las comerciales eran monoflorales de maíz, castaño y girasol; origen determinado al realizar un análisis del contenido polínico.

Análisis de muestras y pretratamiento:

Para calcular la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total fue necesario llevar a cabo un pretratamiento de muestra que consistió en disminuir el tamaño de partícula del polen con el uso de un molinillo para facilitar la extracción. Posteriormente se elimina la humedad mediante estufa a 30°C durante 2 o 3 días hasta que el peso sea constante. A continuación, se coloca en desecadora hasta su análisis.



Figura 8: Muestra de polen en granos y en la desecadora.

Tratamiento de muestra: Extracción sólido- líquido (SLE)

Teniendo en cuenta la experiencia que posee el grupo de investigación TESEA en procedimientos similares, se decidió comenzar el estudio llevando a cabo una extracción sólido-líquido (SLE) como tratamiento de muestra. El estudio se llevó a cabo con un polen multifloral. Para establecer las mejores condiciones de extracción para llevar a cabo la determinación de la capacidad antioxidante y el contenido fenólico se realizaron una serie de pruebas modificando la naturaleza del extractante y el modo y tiempo de agitación. Dicho estudio se realizó mediante el método DPPH, fijando la cantidad de muestra en 2 gramos y cada variable se estudió manteniendo el resto constante.

En la siguiente figura se muestra un esquema de los pasos que se siguieron al realizar la extracción sólido-líquido.

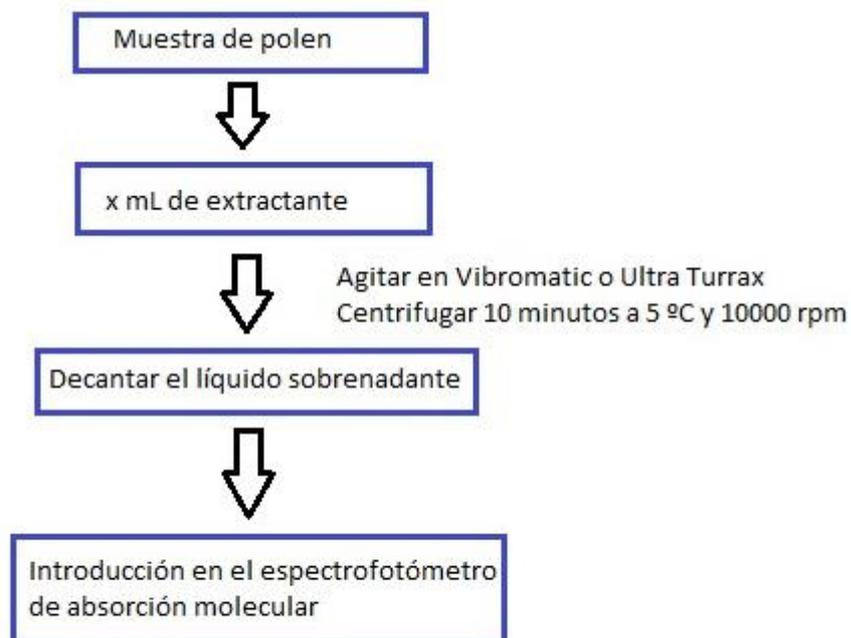


Figura 9: Esquema del procedimiento de extracción sólido-líquido.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE POLEN APÍCOLA

En primer lugar, se pesa la cantidad de muestra que se desea analizar. Se añade el volumen de extractante y se agita en el Vibromatic o en el Ultra Turrax durante un tiempo determinado. Posteriormente, se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 5°C y a 10000 rpm en la centrifugadora y se decanta el líquido sobrenadante. De esta manera ya tendremos los extractos de polen para analizar.

Con ambos métodos de agitación se realizó un estudio de las diferentes variables que influyen en la extracción: naturaleza del extractante y tiempo de agitación.

Inicialmente se eligieron unos parámetros y se procedió a modificar cada una de las variables manteniendo el resto constantes. Los parámetros elegidos inicialmente fueron: 2 gramos de muestra y 30 mL de extractante.

6.1.1. METODO DPPH

Se determinará la capacidad antioxidante por el método DPPH. Antes de nada, se obtuvo el espectro de absorción molecular con una disolución de DPPH 1mM en etanol entre 300 y 700 nm, observándose la absorbancia máxima a 520 nm. Posteriormente, debemos conocer el tiempo de reacción entre el radical y los antioxidantes. Para ello, se realizó una cinética con los pólenes, mezclando 0,3 mL de cada polen con 0,5 mL de DPPH 1 mM y se enrasó a 5 mL con etanol puro. Se mide la disminución de la absorbancia a lo largo del tiempo a 520 nm. Como se puede observar en la Figura 10, a partir de los 30 minutos la variación de la absorbancia con el tiempo era muy pequeña, inferior al 5%, por lo que se fijó el tiempo de incubación en 30 minutos.

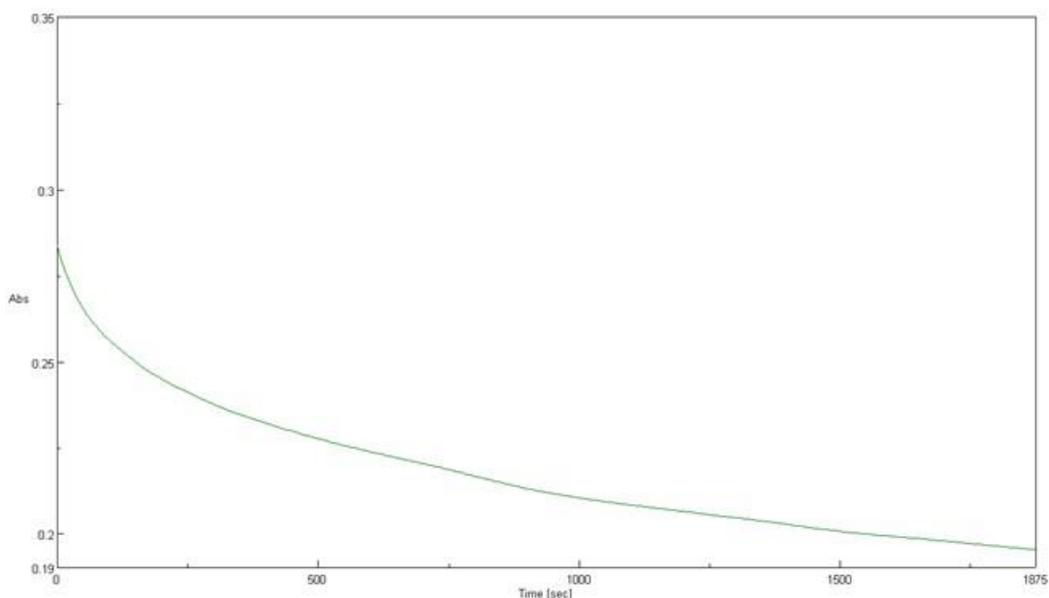


Figura 10: Cinética para el polen monofloral de Girasol con DPPH a 520 nm.

Para la línea de calibrado se mezcló 0,3 mL de cada disolución patrón de Trolox con 0,5 mL de una disolución de DPPH 1 mM (en etanol puro) y se enrasó a 5 mL con etanol puro. Se dejó reaccionar la mezcla en la oscuridad y a temperatura ambiente (25°C) durante 30 minutos y se midió la disminución de la absorbancia a 520,0 nm (longitud de onda de máxima absorción determinada para el DPPH).



Figura 11: Línea de calibrado con Trolox para el DPPH

Con los resultados obtenidos para los diferentes pólenes y de la línea de calibrado se determinó la concentración (mg/L) equivalente en Trolox por interpolación y se expresó la capacidad antioxidante de cada muestra como mg Trolox/g muestra. Todas

las muestras de polen se analizaron por triplicado y los resultados representados son las medias de las tres réplicas.

A continuación, se llevó a cabo un estudio de la influencia de diferentes variables en el proceso de extracción sólido-líquido. Dicho estudio se realizó empleando dos modos de agitación: vibromatic y ultra Turrax.

RESULTADOS EMPLEANDO VIBROMATIC:

Naturaleza del extractante:

Se quiso determinar qué extractante conseguía extraer la máxima cantidad de capacidad antioxidante. El extractante más utilizado en bibliografía fue el etanol puro. Por este motivo, en primer lugar, se llevó a cabo el proceso de extracción empleando este disolvente. Por otro lado, también se empleó como extractante agua ultrapura y etanol al 60% en agua ultrapura, para comparar resultados.

Tiempo de agitación:

El tiempo de agitación es otro de los factores que influye en la extracción. Se hicieron ensayos modificando este parámetro, agitando durante 2, 5, 15 y 30 minutos en el Vibromatic.

Resultados:

A continuación, se muestran los resultados obtenidos utilizando Vibromatic como modo de agitación y modificando las distintas variables.

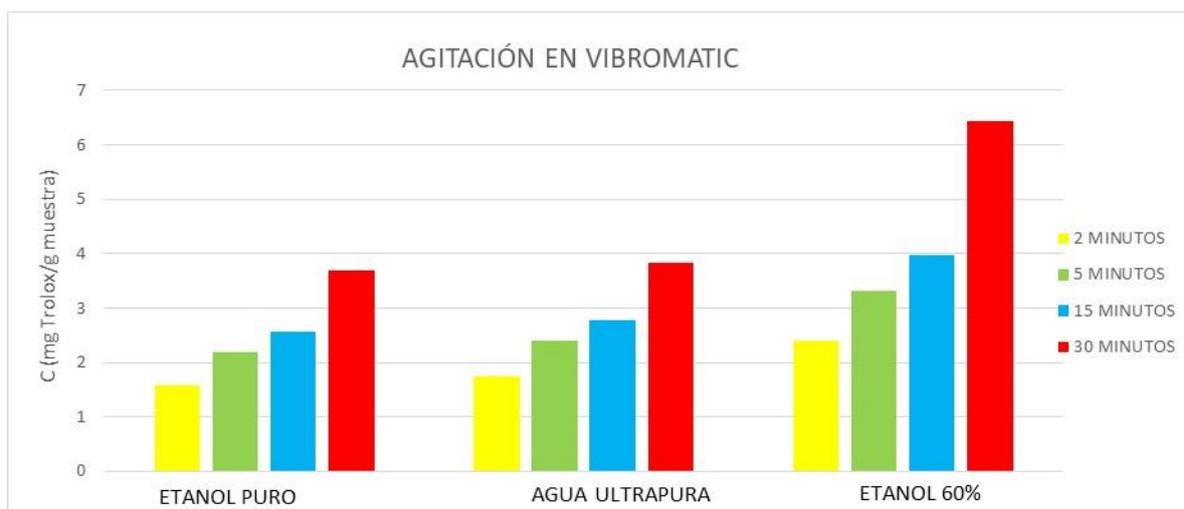


Figura 12: Diferencia con el tiempo y la naturaleza del extractante cuando se utiliza el Vibromatic.

Como se puede observar en la gráfica, a medida que aumentamos el tiempo de agitación, se aumenta la capacidad antioxidante para los tres tipos de extractante. Para el etanol puro y el agua ultrapura se obtienen prácticamente los mismos valores de capacidad antioxidante para todos los tiempos de agitación. Sin embargo, el etanol al 60% tiene mayores valores que los otros dos extractante. Esta diferencia se hace mucho mayor cuando agitamos 30 minutos en el Vibromatic.

RESULTADOS EMPLEANDO ULTRA TURRAX

De manera análoga, se realizaron los mismos ensayos empleando Ultra Turrax como método de agitación. En este caso también se eligieron unos parámetros iniciales y se procedió a modificar cada una de las variables manteniendo el resto constante. Los parámetros elegidos en primer lugar fueron: 2 gramos y 30 mL de extractante.

También se emplearon como extractante etanol puro, agua y etanol al 60%, y como tiempos de agitación en este caso se hicieron ensayos con 2, 5 y 15 minutos en el Ultra Turrax (no se hicieron ensayos con 30 minutos de agitación ya que es un tiempo demasiado elevado).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos utilizando Ultra Turrax como modo de agitación y modificando las distintas variables.

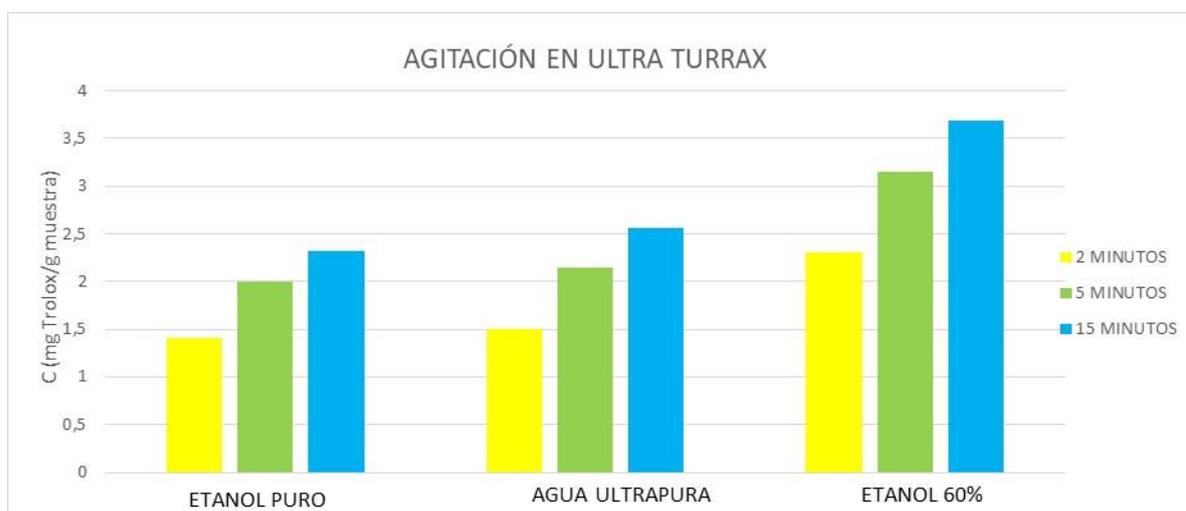


Figura 13: Diferencia con el tiempo y la naturaleza del extractante cuando se utiliza el Ultra Turrax.

Como se puede observar en la gráfica, a medida que aumentamos el tiempo de agitación, se aumenta la capacidad antioxidante para los tres tipos de extractante. Al igual que para el Vibromatic, los valores obtenidos para el etanol puro y el agua ultrapura son muy similares para cualquier tiempo de agitación, mientras que los

valores para el etanol al 60% son mucho mayores que para los anteriores. La diferencia más clara se obtiene agitando 15 minutos.

Para los dos modos de agitación, utilizando como extractante etanol al 60% se obtienen mayores resultados de capacidad antioxidante que cuando se usa agua o etanol puro. También, a medida que aumentamos el tiempo de extracción, aumenta la capacidad antioxidante en ambos modos de agitación, siendo los valores muy similares, siendo ligeramente superiores cuando se empleó como agitación Vibromatic, además la diferencia es que utilizando Ultra Turrax tenemos que ir muestra por muestra, limpiando entre agitaciones. Sin embargo, en el Vibromatic podemos agitar hasta 8 muestras a la vez, lo que acorta mucho el tiempo de preparación de muestras, algo que también es importante.

Por todo ello, se eligió el Vibromatic como modo de agitación con 30 minutos como tiempo de agitación y como extractante la mezcla de etanol al 60%, para llevar a cabo el análisis de las diferentes muestras de polen

A continuación, se llevó a cabo un estudio de la influencia de la cantidad de polen apícola (0,5, 1 y 2 gramos) y volúmenes de extractante (25, 30, 35 y 40 mililitros) a fin de probar cuales son las mejores condiciones para conseguir la mayor capacidad antioxidante. Dicho estudio se realizó para todos los pólenes anteriormente mencionados.

Primeramente, se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante de las especies de polen apícola mencionadas con 0,5, 1 y 2 gramos de cada especie en 30 mL de una mezcla etanol/agua al 60%. Mantenemos el mismo volumen para comprobar las diferencias entre las distintas masas del polen, para posteriormente probar los diferentes volúmenes.

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante, expresados en mg Trolox/gr muestra:

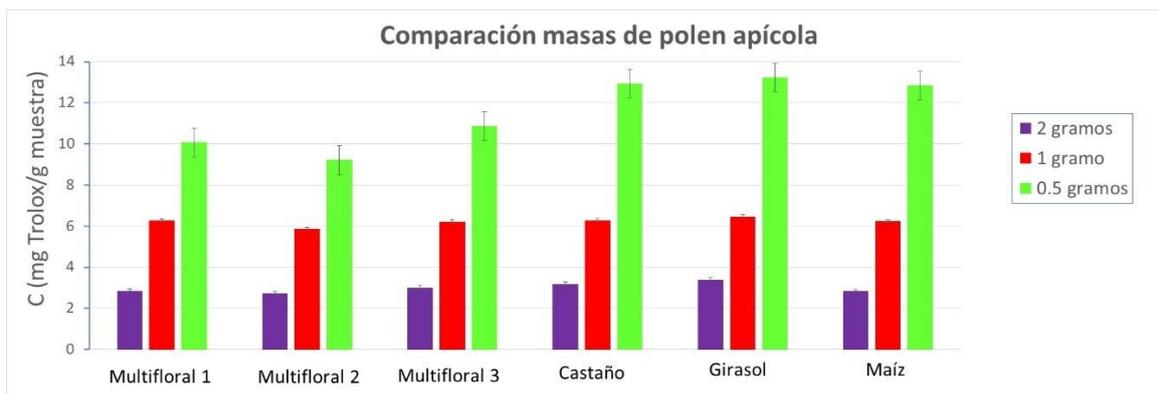


Figura 14: Variación de la capacidad antioxidante con la masa de los diferentes pólenes apícolas para el método DPPH.

Como se puede observar (Figura 14), al aumentar la masa del polen apícola, disminuyó la capacidad antioxidante del polen, de modo que en todas las variedades de polen apícola se observó una disminución cuando se pasó de 0,5 gramos a 1 gramo, y de este a 2 gramos. Esto puede ser debido a que, aunque añadamos más muestra, solo se puede extraer una parte de los componentes con ese volumen de extractante. No hay apenas diferencias entre los distintos tipos de pólenes con 1 y 2 gramos de polen. Cuando se emplearon 0,5 gramos se puede ver una variación pequeña pero destacable entre los pólenes multiflorales de supermercado y los pólenes monoflorales. Estos últimos tienen capacidades antioxidantes más altas que los multiflorales. Dentro de los pólenes monoflorales, el polen con mayor capacidad antioxidante es el polen monofloral de Girasol con 13,23 mg Trolox/g muestra, seguido del polen monofloral de Castaño con 12,94 mg Trolox/g muestra y luego el monofloral de Maíz con 12,84 mg Trolox/g muestra. Con una menor capacidad antioxidante encontramos los pólenes multiflorales, siendo el polen Multifloral 2 el que menos capacidad antioxidante obtiene.

Una vez hemos comprobado que con 0,5 gramos de polen se obtienen los mejores resultados para la capacidad antioxidante, variaremos los volúmenes para ver las consecuencias que se producen. Se ensayaron diferentes volúmenes de extracción (25, 30, 35 y 40 mL) para ver si al aumentar el volumen de extracción aumentaba la capacidad antioxidante. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante para los diferentes volúmenes de extracción.

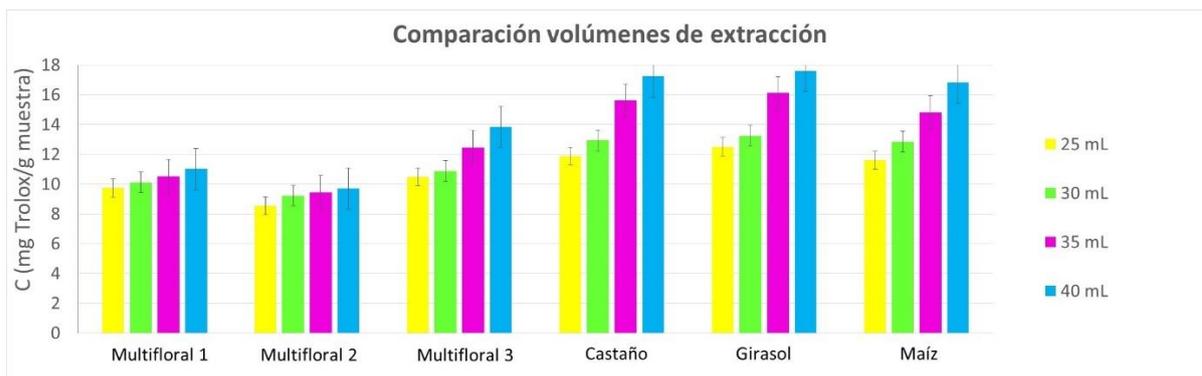


Figura 15: Variación de la capacidad antioxidante con el volumen de extractante de los diferentes pólenes apícolas para el método DPPH.

Como se puede observar (Figura 15), al aumentar el volumen en el que se extraen las muestras, aumenta la capacidad antioxidante del polen apícola. Los mayores contenidos en actividad antioxidante se obtuvieron para los pólenes monoflorales empleando un volumen de 40 mL. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 2.

Tabla 2: Valores capacidad antioxidante obtenidos con el método DPPH expresados en mg Trolox/g muestra \pm SD (n=3)

Tipo de polen	Capacidad antioxidante (mg Trolox/g muestra)
Multifloral 1	11.03 \pm 0.06
Multifloral 2	9.69 \pm 0.08
Multifloral 3	13.84 \pm 0.35
Castaño	17.21 \pm 0.04
Girasol	17.79 \pm 0.12
Maíz	16.54 \pm 0.21

Como se observa, el polen de girasol es el que posee una mayor capacidad antioxidante con este método obteniendo resultados de 17.79 \pm 0,12 mg Trolox/g muestra, mientras que los extractos de los pólenes multiflores fueron los que presentaron menores capacidades antioxidantes.

Para comprobar si las aparentes diferencias encontradas entre las distintas variedades eran significativas, se realizó un análisis de varianza para la capacidad antioxidante en

función del tipo de polen analizado. Obteniéndose de valores de F experimental mayores que F crítico, rechazándose la hipótesis nula (la variedad de polen no influye en la cantidad antioxidante). El valor obtenido para la significación (p-valor) fue de 0,0097, por lo que se pudo concluir que los valores medios eran significativamente diferentes (p-valor<0.05) teniendo en cuenta la variedad del polen.

6.1.2. MÉTODO ABTS

En el método del ABTS fue necesario preparar el radical. Se preparó una disolución con 245 mL de $K_2S_2O_8$ 24'5 mM, enrasando a 25 mL con ABTS 7 mM. Se deja que reaccione entre 12 y 16 horas en la oscuridad y a temperatura ambiente. De esta manera se obtiene el radical $ABTS^{\cdot+}$ que es de color azul verdoso muy oscuro. Una vez formado el radical, para medir su absorbancia hubo que diluir el radical 1:100 con agua destilada, ya que los valores de la absorbancia eran elevados, y de esta manera se conseguía que la absorbancia estuviera en un valor de $0'7 \pm 0,02$, determinándose la longitud de onda de máxima absorción a 729 nm. La formación de este radical tuvo que realizarse de esta manera ya que es la forma más estable en agua. El único inconveniente que había es que se tuvo que preparar el radical cada 48 horas, debido a su alta inestabilidad. Una vez preparado el radical diluido ya estaba listo para ser utilizado en la determinación de la capacidad antioxidante de los diferentes pólenes apícolas.

Antes de determinar la capacidad antioxidante se tuvo que calcular el tiempo de reacción entre el radical y los antioxidantes. Realizamos una cinética con los pólenes apícolas, tomando 0,3 mL de cada muestra, enrasando a 5 mL con la disolución que preparamos de radical ABTS. Como en el método DPPH, se midió la disminución de la absorbancia con el tiempo a 729 nm. Como se puede observar en la Figura 16, a partir de los 30 minutos la variación de la absorbancia con el tiempo era muy pequeña, inferior al 5%, por lo que se fijó el tiempo de incubación en 30 minutos.

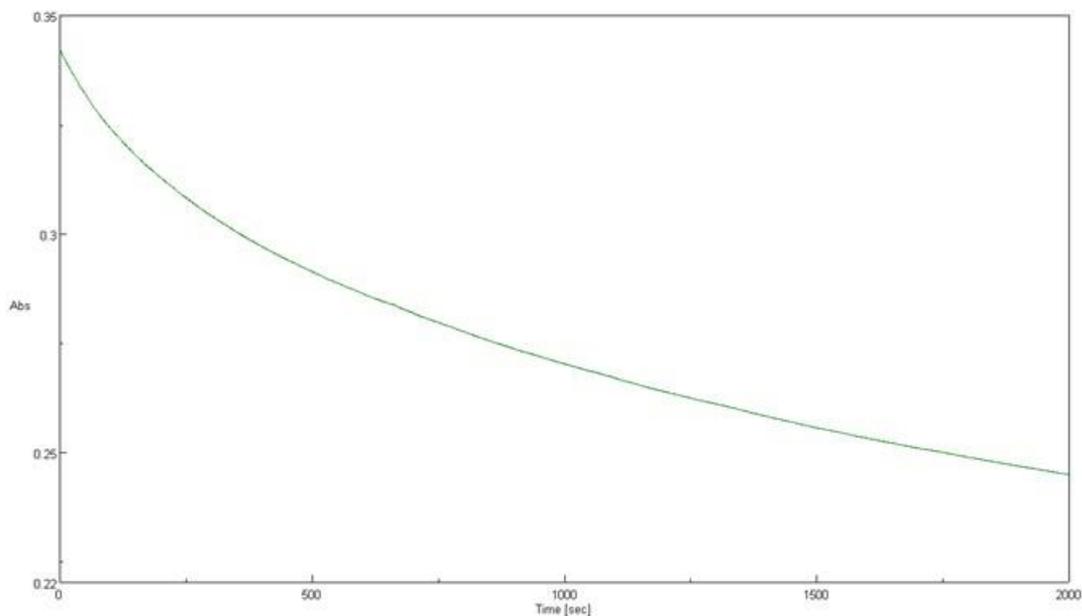


Figura 16: Cinética para el polen monofloral de Girasol con ABTS a 729 nm.

Para la línea de calibrado se mezcló 0,3 mL de cada disolución patrón de Trolox, enrasando a 5,0 mL con la disolución del radical ABTS. Se dejó reaccionar la mezcla en la oscuridad y a temperatura ambiente (25°C) durante 30 minutos y se midió la disminución de la absorbancia a 729 nm (longitud de onda de máxima absorción determinada para el ABTS).



Figura 17: Línea de calibrado con Trolox para el ABTS.

Con los resultados obtenidos para los diferentes pólenes y de la línea de calibrado se determinó la concentración (mg/L) equivalente en Trolox por interpolación y se

expresó la capacidad antioxidante de cada muestra como mg Trolox/g muestra. Todas las muestras de polen se analizaron por triplicado y los resultados representados son las medias de las tres réplicas.

Primeramente, se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante de las especies de polen apícola mencionadas con 0,5, 1 y 2 gramos de cada especie en 30 mL de una mezcla etanol/agua al 60%. Mantenemos el mismo volumen para comprobar las diferencias entre las distintas masas del polen, para posteriormente probar los diferentes volúmenes.

En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante, expresados en mg Trolox/gr muestra:

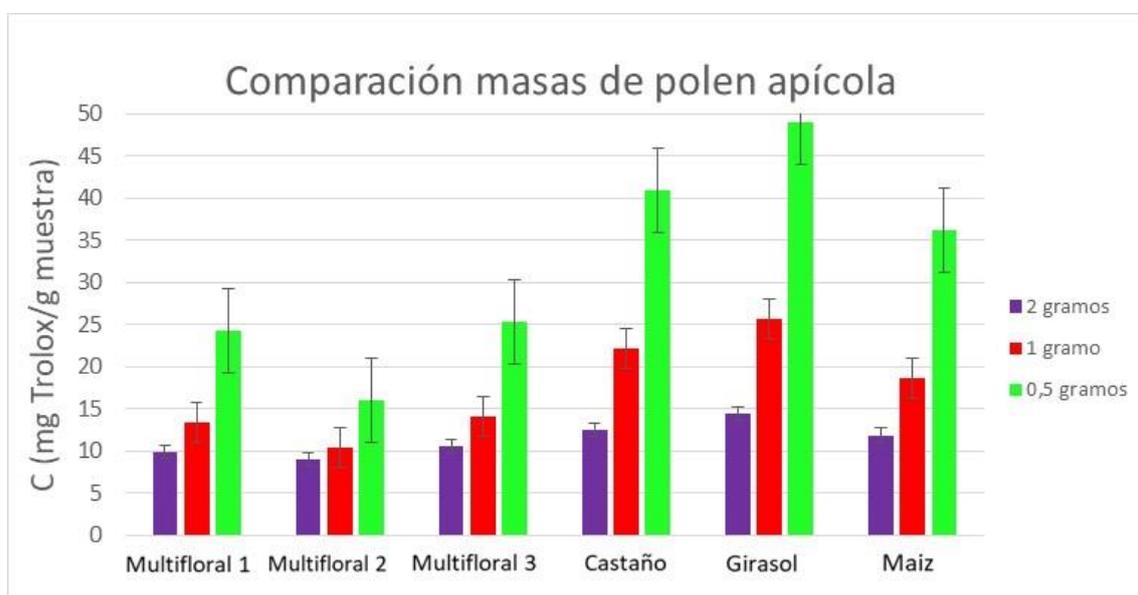


Figura 18: Variación de la capacidad antioxidante con la masa para los diferentes pólenes apícolas para el método ABTS.

Como se puede observar en la figura 18, al igual que para el método DPPH, al aumentar la masa del polen apícola, disminuyó la capacidad antioxidante del polen, de modo que en todas las variedades de polen apícola se observó una disminución cuando se pasó de 0,5 gramos a 1 gramo, y de este a 2 gramos. Esto es debido a que, aunque añadamos más muestra, solo se puede extraer una parte de los componentes con ese volumen de disolvente. En este ensayo los valores obtenidos son más altos que para el ensayo DPPH, siendo mayores las diferencias entre los pólenes monoflorales y los multiflorales.

Dentro de los pólenes monoflorales, se sigue el mismo orden que con el método DPPH, siendo el monofloral de Girasol el polen con mayor capacidad antioxidante con 48,97 mg Trolox/g muestra, seguido del polen de Castaño con 40,82 mg Trolox/g muestra y por último el polen de Maíz, con 36,24 mg Trolox/g muestra.

Para los pólenes multiflorales ocurre lo mismo, el polen con mayor capacidad antioxidante es el multifloral 3 con 25,30 mg Trolox/g muestra, seguido del polen multifloral 1 con 24,27 mg Trolox/g muestra (prácticamente mismo valor que el multifloral 3) y por último el polen multifloral 2 con 15,95 mg Trolox/g muestra. Para este ensayo, los pólenes multifloral 3 y multifloral 1 tienen valores muy similares, pero hay una clara diferencia respecto al polen multifloral 2, con valores muy pequeños.

Una vez hemos comprobado que con 0'5 gramos de muestra se obtienen los mejores resultados para la capacidad antioxidante, variaremos los volúmenes para ver las consecuencias que se producen. Se ensayaron diferentes volúmenes de extracción (25, 30, 35 y 40 mL) para ver si al aumentar el volumen de extracción aumentaba la capacidad antioxidante. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante para los diferentes volúmenes de extracción.

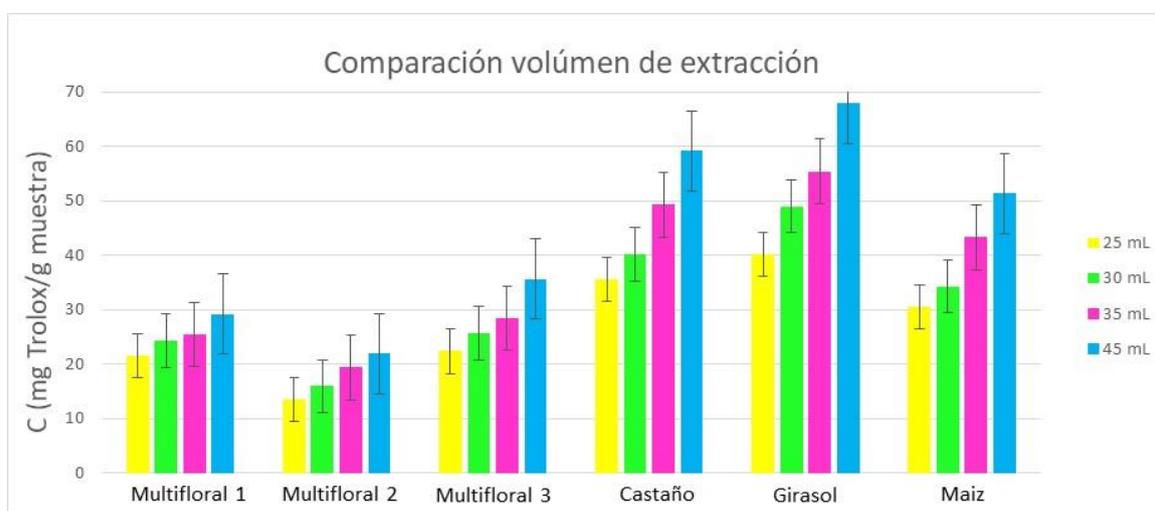


Figura 19: Variación de la capacidad antioxidante con el volumen de extractante en los diferentes pólenes apícolas para el método ABTS.

Al igual que para el método DPPH, al aumentar el volumen en el que se extraen las muestras, aumenta la capacidad antioxidante del polen apícola. En este caso, los valores de la capacidad antioxidante son más elevados que para el método DPPH, pero el orden es el mismo. Los pólenes monoflorales tienen valores mucho más elevados

que los multiflorales, siendo esta una diferencia más clara al aumentar el volumen. Con 25 mL de extractante, la diferencia ya es apreciable, pero centrándonos en la capacidad antioxidante con 40 mL de extractante, el polen monofloral de Girasol vuelve a ser el que mayor capacidad antioxidante tiene con $67,98 \pm 0.46$ mg Trolox/g muestra, seguido del polen de Castaño con $59,14 \pm 0.13$ mg Trolox/g muestra y del polen de Maíz con $51,36 \pm 0.65$ mg Trolox/g muestra. Las muestras de polen multifloral tienen valores más altos que para el método DPPH, pero sin llegar a los valores del polen monofloral. El orden es igual que para el método DPPH, siendo esta diferencia mayor cuanto más volumen de extractante tenemos. El polen multifloral 2 vuelve a ser el que menos capacidad antioxidante tiene con $21,89 \pm 0.18$ mg Trolox/g muestra con 40 mL de extractante.

Al igual que en el caso del DDPH, se hizo una comparación entre las diferentes variedades mediante un análisis de varianza, observando diferencias significativas entre las muestras polen, en el que el p-valor fue 0,0035, (p-valor<0.05).

Con el fin de tener una comparación más fiable algunos autores han definido el término RRAI (índice de actividad antioxidante relativa), se usa para comparar ambos métodos de tal forma que se considera al valor obtenido más alto en cada caso como el 100% expresando los demás valores en función de éste. Representando los valores que hemos obtenido de esta forma se obtiene la Figura 20.

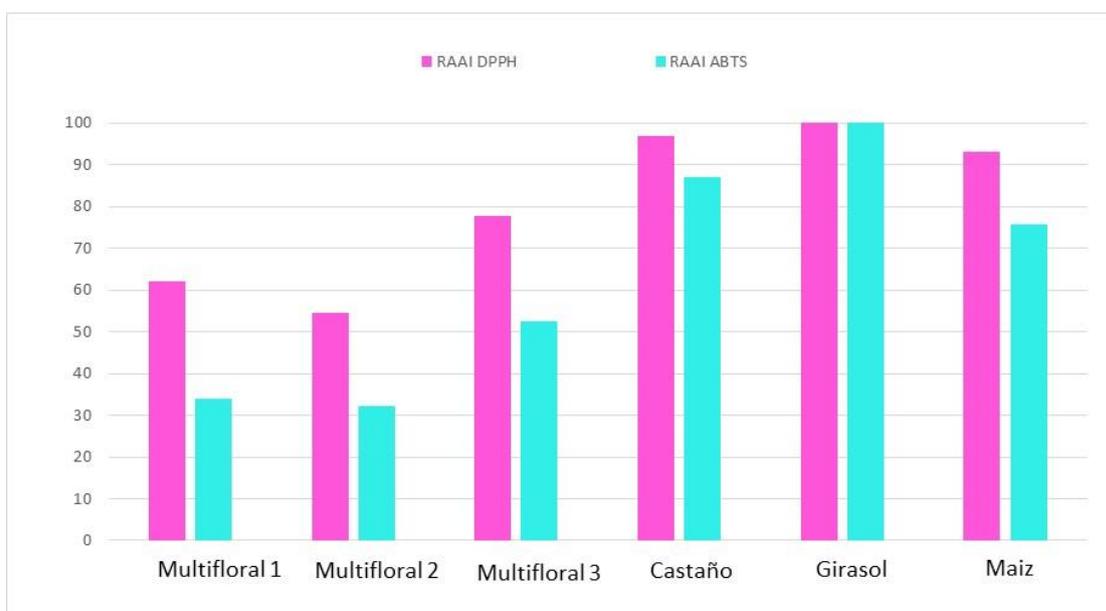


Figura 20: AC por los métodos DPPH y ABTS referida en términos de % RAAI.

Está claro que el polen de girasol es el que presenta mayores valores de la capacidad antioxidante, tanto si se realiza por el método del ABTS como por el del DPPH.

Además, se calculó la correlación lineal de Pearson entre los valores obtenidos por los métodos DPPH y ABTS, obteniéndose un valor de $r=0,9741$ ($p\text{-valor}=0,0009$), por lo que se pudo deducir que existía una correlación significativa entre los valores obtenidos por ambos métodos. (La hipótesis nula se debería rechazar y en este caso la hipótesis nula que se planteo fue que no existía relación entre ambos métodos.)

6.2 CONTENIDO FENÓLICO TOTAL (TFC) DEL POLEN APÍCOLA

Para determinar el contenido fenólico de las distintas muestras de polen se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (FC). Para estos ensayos se utilizaron las muestras con 0,5 gramos en 40 mL de la mezcla etanol/agua al 60%, puesto que eran las condiciones en las que se obtenía mayor capacidad antioxidante tanto por el método DPPH como para el método ABTS.

Se utilizó como patrón de referencia ácido gálico, el cual, al reaccionar con el reactivo, presenta un máximo de absorbancia de 760,4 nm.

Para la línea de calibrado se mezcló 0,3 mL de cada disolución patrón de ácido gálico con 0,3 mL del reactivo Folin-Ciocalteu en un matraz de 5 mL y se dejó reaccionar durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se enrasaron los matraces con carbonato sódico al 5% (en agua ultrapura). Se dejó reaccionar la mezcla en la oscuridad y a temperatura ambiente (25°C) durante una hora y media antes de medir su absorbancia a 760,4 nm.

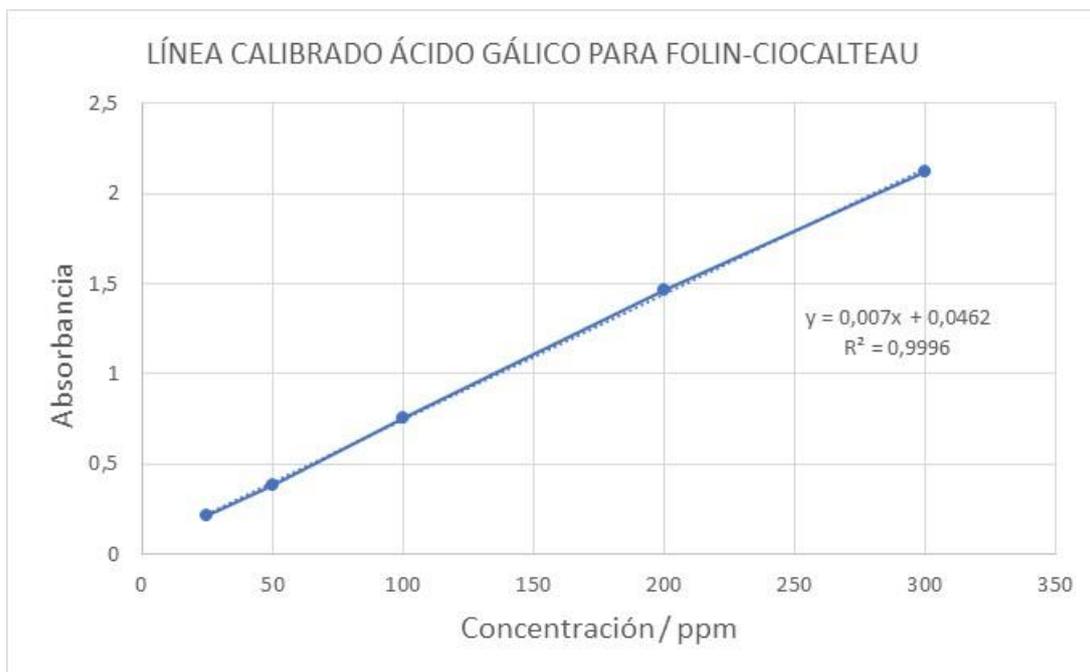


Figura 21: Línea de calibrado con ácido gálico para el método Folin-Ciocalteu

Con los resultados obtenidos para las diferentes muestras de polen más la línea de calibrado, se determinó la concentración (mg/L) equivalente en ácido gálico por interpolación y se expresó el contenido fenólico total como mg ácido gálico/g muestra. Todas las muestras de polen se analizaron por triplicado y los resultados representados son la media de las tres réplicas. En la figura 21 se puede observar los resultados obtenidos:

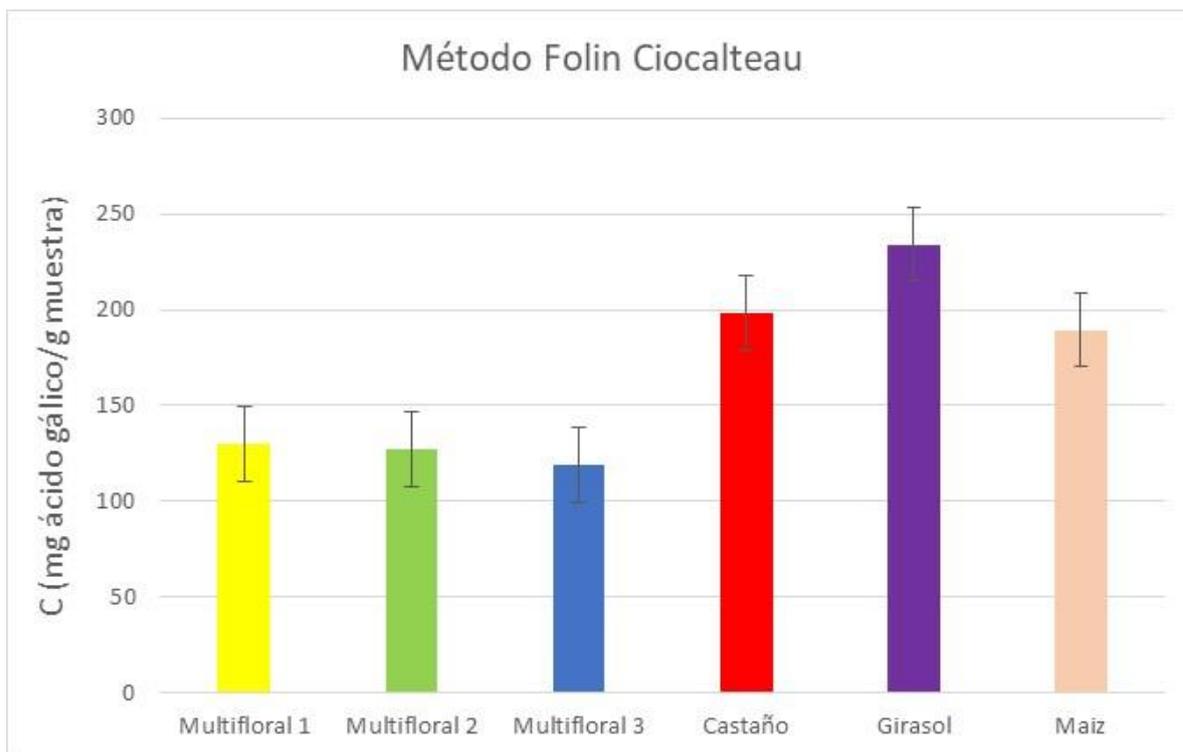


Figura 22: Variación del contenido fenólico total por el método de Folin- Ciocalteu.

En este gráfico se puede observar que los pólenes monoflorales tienen mayor contenido fenólico total que los pólenes multiflorales. Dentro de los pólenes monoflorales, el polen monofloral de Girasol posee un mayor contenido fenólico total con $234,15 \pm 0,38$ mg ácido gálico/g muestra, lo que coincide con los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante en los que para ambos métodos el polen de mayor capacidad antioxidante era este. Sin embargo, en este análisis el polen multifloral 3 fue el que menor contenido fenólico obtuvo ($118,82 \pm 0,57$ mg ácido gálico/g muestra).

Algunos autores consideran que la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total están relacionados, sin embargo, otros piensan que esta relación no existe debido a que los compuestos fenólicos pueden tener diferentes respuestas en función a su estructura y los extractos vegetales pueden tener gran cantidad de compuestos antioxidantes además de polifenoles. Por lo tanto, no se puede predecir la capacidad antioxidante a partir de su contenido fenólico. [28]

Por ello se estudió la posible correlación entre cada uno de los métodos (DPPH y ABTS) con el contenido fenólico total. Se obtuvo un valor para la correlación de Pearson de $r=0,8708$ (p -valor= 0,023) para la pareja DPPH y FCT y un valor de $r=0,9488$ (p -valor=0,0005) para el ABTS con FCT. Por lo tanto, se deduce que existe correlación entre ambos métodos y el contenido fenólico total para un nivel de confianza del 95% (p -valor < 0,05), siendo algo mayor que la correlación existente entre el método ABTS y

el contenido fenólico total que entre el del DPPH y contenido en fenólico total. Destacar que la correlación obtenida para la capacidad antioxidante determinada por ambos métodos es mayor que la que se ha obtenido entre cada uno de los métodos para determinar la capacidad antioxidante y la determinación del contenido fenólico total.

7. CONCLUSIONES

- La extracción del polen se ha realizado empleando la extracción sólido-líquido (SLE), comparando como método de agitación Vibromatic y Ultra Turrax, variando la naturaleza del extractante y el tiempo de agitación. Se han obtenido los mejores resultados con un tiempo de agitación de 30 minutos en el Vibromatic y con etanol al 60% en agua ultrapura como extractante.
- Se ha determinado la capacidad antioxidante de distintas muestras de polen apícola por dos métodos: Método DPPH y método ABTS. Se han obtenido mayores valores por el método del ABTS que por el método del DPPH, presentando siempre los pólenes monoflorales mayor capacidad antioxidante que los pólenes multiflorales. Los extractos de los pólenes presentaron una capacidad antioxidante comprendida entre 9.69 y 17.79 mg de trolox/ g muestra para el caso del DPPH y para el caso del ABTS valores comprendidos entre 21.89 y 67.89 mg de Trolox/g muestra. El polen monofloral de girasol es el que mayor valor obtuvo. y el polen multifloral 2 el que menos.
- Se ha determinado el contenido fenólico total del polen apícola mediante el método Folin-Ciocalteu, observándose que al igual que en el caso de la capacidad antioxidante, los pólenes monoflorales obtuvieron valores más elevados que los pólenes multiflorales. El polen monofloral de Girasol obtuvo los valores más elevados, sin embargo, ahora el polen multifloral 3 es el que menores valores obtiene.
- Se ha comprobado la correlación existe entre la capacidad antioxidante determinada por ambos métodos, así como la correlación entre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante por ambos métodos.

8. ANEXOS

8.1. ABREVIATURAS

AAPH: 2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro

ABTS: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AC: Capacidad antioxidante

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de la Varianza

BHA: Butil-hidroxianisol

BHT: Butil-hidroxitolueno

CIAPA: Centro de Investigación Apícola y Agroalimental

CUPRAC: Cupric ion reducing antioxidant capacity

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EtOH: Etanol

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FC: Folin-Ciocalteu

HAT: Transferencia de átomos de hidrógeno

ISO: International Organization for Standardization

LDL: lipoproteínas de baja densidad

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SET: Transferencia de un único electrón

SLE: Extracción sólido-líquido

SOD: Superóxido dismutasa

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente en Trolox

TESEA: Grupo de Técnicas de Separación y Análisis Aplicado

TFC: Contenido fenólico total

TOSC: Total oxidant scavenging capacity

TROLOX: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-carboxílico

ORAC: Oxygen radical absorbance capacity

UV-Vis: Ultravioleta-Visible

8.2 LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: El polen apícola	3
Figura 2: Propiedades terapéuticas del polen apícola:	6
Figura 3: Tamaño de las diferentes clases de abejas.	8
Figura 4: Abeja polinizando una flor.....	9
Figura 5: Reacción general entre el radical DPPH y los compuestos antioxidantes....	13
Figura 6: Reacción general entre el ABTS y los compuestos antioxidantes.	14

Figura 7: Espectrofotómetro V-650 de Jasco Corporation.	18
Figura 8: Muestra de polen en granos y en la desecadora.....	20
Figura 9: Esquema del procedimiento de extracción sólido-líquido.....	21
Figura 10: Cinética para el polen monofloral de Girasol con DPPH a 520 nm.	23
Figura 11: Línea de calibrado con Trolox para el DPPH	23
Figura 12: Diferencia con el tiempo y la naturaleza del extractante cuando se utiliza el Vibromatic.	24
Figura 13: Diferencia con el tiempo y la naturaleza del extractante cuando se utiliza el Ultra Turrax.....	25
Figura 14: Variación de la capacidad antioxidante con la masa de los diferentes pólenes apícolas para el método DPPH.	27
Figura 15: Variación de la capacidad antioxidante con el volumen de extractante de los diferentes pólenes apícolas para el método DPPH.	28
Figura 16: Cinética para el polen monofloral de Girasol con ABTS a 729 nm.....	30
Figura 17: Línea de calibrado con Trolox para el ABTS.	30
Figura 18: Variación de la capacidad antioxidante con la masa para los diferentes pólenes apícolas para el método ABTS.....	31
Figura 19: Variación de la capacidad antioxidante con el volumen de extractante en los diferentes pólenes apícolas para el método ABTS.	32
Figura 20: AC por los métodos DPPH y ABTS referida en términos de %RAAI.	33
Figura 21: Línea de calibrado con ácido gálico para el método Folin-Ciocalteau	35
Figura 22: Variación del contenido fenólico total por el método de Folin- Ciocalteau.	36

8.3 LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Composición del polen apícola y requerimientos nutricionales humanos.	5
Tabla 2: Valores capacidad antioxidante obtenidos con el método DPPH expresados en mg Trolox/g muestra \pm SD (n=3).....	28

9. BIBLIOGRAFÍA

[1] M. Vicente, «Análisis virológico y epidemiológico del síndrome de despoblación de las colmenas en España: estudio de causas y consecuencias» Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2018.

[2] S. Konzmann, S. Koethe y K. Lunau, «Pollen grain morphology is not exclusively responsible for pollen collectability in bumble bees» *Scientific Reports*, 9:4705, 2019.

[3] B. Denisow y M. Denisow-Pietrzyk, «Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review» *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 13, pp. 4303-4309, 2016

[4] X. Xi, J. Li, S. Guo, Y. Li, F. Xu, M. Zheng, H. Cao, X. Cui, H. Guo y C. Han «The potential of using bee pollen in cosmetics: a review» *Journal of Oleo Science*, vol. 1, 67, (9): pp. 1071-1082, 2018

[5] P.V. Aliosi y S. Ruppel, «Propiedades bioactivas y nutricionales del polen apícola de la provincia de Chubut, Argentina» *Revista de investigaciones Agropecuaria*, vol. 40, pp. 297-302, 2014

[6] E.W. Herbert Jr y H. Shimanuki, «Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen» *Apidologie*, Springer Verlag, vol. 9, pp. 33-40, 1978

[7] FAO. Bees and their role in forest livelihoods. *Food and Agriculture organization of the United Nations*, 2009.

[8] Reyes C. José, Cano R. Pedro. Manual de polinización Apícola. Coordinación general de ganadería. Programa Nacional para el control de la abeja africana. México p. 27-32

[9] A. Cepero, «Monitorización de los principales patógenos de las abejas para la detección de alertas y riesgos sanitarios» Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2016

[10] A. Moure, J.M. Cruz, D. Franco, J.M. Dominguez, J. Sineiro, H. Dominguez, M.J. Núñez y J.C. Parajó, «Natural Antioxidants from residual sources,» *Food Chemistry*, vol. 72, pp. 145-171, 2001.

[11] D. Huang, B. Ou y R.L. Prior, «The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pp. 1841-1856, 2005.

- [12] D. Krishnaiah, R. Sarbatly y R.Nithyanandam, «A review of the antioxidant potential of medicinal plant species,» *Food and Bioproducts Processing*, vol.89, pp. 217-233, 2011.
- [13] A.Karadag, B. Ozcelik y S.Saner, «Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities,» *Food Analytical Methods*, vol. 2, pp. 41-60, 2009.
- [14] J. Pokorny, «Are natural antioxidants better-and safer- tan synthetic antioxidants?» *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 109, pp. 629-642, 2007.
- [15] R.L. Prior, X. Wu y K. Schaich, «Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.53, pp. 4290-4302, 2005.
- [16] E.M. Gioti, Y. C. Fiamegos, D.C. Skalkos, C.D. Stalikas, «Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece »*Food Chemistry*, vol. 117, pp. 398-404, 2009.
- [17] M.S. Blois, «Antioxidant determinations by the use of a stable free radical» *Nature*, vol.181, pp. 1199-1200, 1958
- [18] P. Molineux, «The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity» *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, vol. 26, pp. 211-219, 2004
- [19] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier y C.Berset, «Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity» *Lebensmittel-Wissenschaft und technologie- Food Science and Technology*, vol. 28, pp. 25-30, 1995
- [20] R.Re, N.Pellegrini, A. Pannala, M. Yang, y C.Rice Evans «Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decoloration Assay», *Free Radical Biology and Medicine*, vol.26, pp. 1231-1237, 1999
- [21] C. Henriquez, C. Aliaga y E. Lissi, «Formation and Decay of the ABTS Derived Radical Cation: A Comparision of Different Preparation Procedures» *International Journal of Chemicla Kinetics*, vol. 34, pp. 659-665, 2002
- [22] P.Pietta, P. Simonetti, C. Gardana y P. Mauri, «Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechis metabolites» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol 23, pp. 223-226, 2000
- [23] S. Li, S.-K. Li, R.-Y. Gan, F.-L. Song, L. Kuang y H.-B. Li «Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants» *Industrial Crops and Products*, vol. 51, pp. 289-298, 2013

- [24] J.C. Sánchez-Rangel, J. Benavides, J. Heredia, L.Cisneros-Zevallos y D.A. Jacobo-Velázquez «The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination» *Analytical Methods*, vol. 5, pp. 5990-5999, 2013
- [25] O. Folin y V. Ciocalteu «On tirosine and tryptophane determinations in proteins» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 73, pp. 627-650, 1927
- [26] O. Folin y W. Denis «On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 12, pp. 239-243, 1912
- [27] V.L. Singleton y J.A. Rossi Jr «Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents» *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, pp. 144-158, 1965
- [28] E. Arnáiz, J.Bernal, M.T. Martín, J.C. Diego, J.L. Bernal y L. Toribio «Optimisation of the Supercritical Fluid Extraction of Antioxidants from Broccoli Leaves» *Food Analytical Methods*, vol. 9, pp. 1231-1237, 2016

