

# RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE POLEN DE DISTINTO ORIGEN FLORAL

MEDINA A, <sup>1</sup> CHAILLOU L.,<sup>1</sup> NAZARENO MA<sup>1,2</sup>

(1) Instituto de Ciencias Químicas. Facultad de Agronomía y Agroindustrias-Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina. (2) INQUINOA-CONICET- Avda Belgrano 1912 (S), Santiago del Estero, Argentina. Tel.: 0385 4509528 int.:1617; Fax: 0385 4509585 Email: [lchaillo@yahoo.com](mailto:lchaillo@yahoo.com)

## 1. Resumen

El polen de abejas es el resultado de la mezcla que elaboran las abejas *Apis mellifera* L. a partir de polen colectado de diversas flores con néctar y secreciones salivares. En su composición se destacan polisacáridos, lípidos, proteínas y una variedad de productos secundarios tales como polifenoles, carotenoides, esteroides, etc. Los compuestos polifenólicos, principalmente flavonoides poseen valiosas propiedades antioxidantes, biocidas y terapéuticas. El propósito de este trabajo fue determinar la actividad antioxidante de extractos de polen de distinto origen floral en relación con su contenido de polifenoles totales y flavonoides.

Los compuestos polifenólicos totales y flavonoides se cuantificaron con el método de Folin-Ciocalteu y el de formación de complejos con  $AlCl_3$  al 2%, respectivamente. Para determinar la actividad antioxidante de los extractos se utilizaron las técnicas de decoloración del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) y del radical catión del ácido 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>) para medir la actividad antirradicalaria y la técnica de la co-oxidación, inducida por lipoxigenasa de soja, del sistema micelar  $\beta$ -caroteno- ácido linoleico.

El contenido de polifenoles totales osciló en un rango de 14,0 a 31,5 mg/g y el de flavonoides 1,5 a 2,7 mg/g. Los valores de actividad antirradicalaria de los extractos fueron muy variables y dependientes del origen floral. Las mayores actividades antirradicalarias se encontraron en extractos de polen de origen monofloral, específicamente procedente de *Schinopsis quebracho colorado* y *Schinus fasciculatus*, presentando con sus contenidos de compuestos polifenólicos correlaciones lineales moderadamente fuertes  $R=0,7$  para la capacidad atrapadora de radicales DPPH<sup>•</sup>, y  $R=0,8$  para el radical catión ABTS<sup>•+</sup>. No se encontró correlación para esta actividad y el contenido de flavonoides. Por otra parte, la actividad antioxidante sobre el sistema micelar  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico no presenta correlación con el contenido de compuestos polifenólicos pero es notable la que existe con el contenido de flavonoides ( $R=0,8$ ). La mayor actividad antioxidante se determinó en polen de origen multifloral, mientras que los monoflorales presentaron actividad moderada.

Los resultados de estos ensayos indican que un mayor contenido de estos compuestos implica una mayor actividad antirradicalaria. Mientras que su actividad antioxidante esta vinculada estrechamente al contenido de flavonoides. Extractos de este producto apícola pueden utilizarse como un suplemento dietario efectivo y funcional debido a su notable contenido de polifenoles y a su significativa actividad antirradicalaria y antioxidante.

## 2. Introducción

Los productos naturales y sus preparados como alimentos y como suplementos dietarios han ganado considerable atención durante los últimos años. Entre ellos, los productos apícolas (miel, polen, propóleos) se utilizan desde tiempos ancestrales en medicina, alimentación y suplementación dietaria debido a sus valiosas propiedades fisiológicas y nutricionales (Kroyer y Hegedus, 2001).

El polen de abejas es un producto natural resultado de la aglutinación de polen colectado de diversas flores por las abejas *Apis mellifera* L. con néctar y secreciones salivares. Lo almacenan en la colmena, separado de las celdas de néctar puesto que constituye la fuente más importante de proteínas para estos insectos (Almeida-Muradian y col., 2005). En su composición se destacan polisacáridos, lípidos, proteínas aminoácidos y una variedad de productos secundarios tales como polifenoles, carotenoides, esteroides, vitaminas, etc. (Sarmiento Silva y col. 2006). Los compuestos polifenólicos, principalmente flavonoides, poseen valiosas actividades antioxidante, antiinflamatoria, antiespasmolítica, antibacteriana, antifúngica, analgésica, inhibidora de enzimas, citotóxica, antitumoral, hepatoprotectora (Harborne y Williams, 2000).

El estudio de las reacciones oxidativas se ha incrementado en los últimos años debido a que la oxidación de los componentes celulares por acción de radicales libres así como otros factores ha sido reconocida como la causa de procesos como el envejecimiento celular y de numerosas enfermedades tales como cáncer, mal de Parkinson, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares (Soler-Rivas y col., 2000; Fukumoto y Mazza, 2000). Además las reacciones de oxidación causan serios problemas en la industria alimentaria debido a que los lípidos presentes en los alimentos son oxidados durante la peroxidación, produciendo cambios totales o parciales en sus propiedades sensoriales y en su valor nutritivo puesto que se pierden vitaminas, ácidos grasos esenciales y proteínas (Larson, 1997). Por ello los antioxidantes naturales presentes en granos, vegetales, frutas, propóleos y polen han recibido considerable atención por sus potenciales aplicaciones en la mejora de la calidad y seguridad de alimentos así como también en la prevención de numerosas enfermedades (Yu y col., 2003; Kroyer y Hegedus, 2001).

Los objetivos de este trabajo fueron: estudiar la relación entre el contenido de polifenoles y flavonoides totales de polen de distinto origen floral y su actividad antioxidante y antirradicalaria.

## 3. Materiales y Métodos

Se recolectaron muestras de polen de aproximadamente 100 g, de colmenas ubicadas en distintas localidades de la provincia de Santiago del Estero, Argentina. Se clasificaron según el origen floral en polen multifloral, polen de *Schinopsis quebracho colorado* (quebracho colorado) y *Schinus fasciculatus* (molle). Se almacenaron en el laboratorio, refrigeradas, y al abrigo de la luz. Se prepararon extractos etanólicos de polen (EEP) al 1% con etanol de 96°. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 3.1. Contenido de compuestos polifenólicos y flavonoides

Los compuestos polifenólicos totales se cuantificaron por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como referencia (Singleton y col., 1999). Para cuantificar los flavonoides se determinó la absorbancia, a 428 nm del complejo flavonoides-aluminio, obtenido por reacción del extracto polínico con una solución metánolica de  $\text{AlCl}_3$  al 2%. Quercetina fue utilizada como compuesto de referencia.

### 3.2. Determinación de actividad antirradicalaria

La actividad antirradicalaria se determinó utilizando las técnicas de decoloración de los radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo ( $\text{DPPH}^\bullet$ ) y del radical catión del ácido 2,2'-Azinobis-(3-etibenzotiazolin-6-sulfónico) ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ).

Para la primera técnica, se midió, en espectrofotómetro UNICAM UV-Visible UV2, la absorbancia a 517 nm, durante 10 min, de una solución de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo ( $\text{DPPH}^\bullet$ ) en metanol de concentración inicial  $33,6\mu\text{g/mL}$  luego del agregado de  $60\mu\text{L}$  de EEP. La actividad antirradicalaria (AAR) se calculó, mediante la ecuación:

$$\text{AAR (\%)} = 100 \left[ 1 - \frac{A_m^\infty}{A^0} \right] \quad (1)$$

Donde:

$A^0$ : absorbancia al tiempo 0 sin el agregado de muestra

$A_m^\infty$ : absorbancia de la muestra en estado estacionario obtenida mediante el ajuste de los perfiles cinéticos a tiempo infinito.

Para la segunda técnica se generó el radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  mezclando una solución stock del ácido 2,2'-Azinobis-(3-etibenzotiazolin-6-sulfónico) con persulfato de potasio. La mezcla se colocó en oscuridad durante 16 h hasta lograr la estabilidad del reactivo. Luego se diluyó con buffer fosfato (pH 7) hasta una absorbancia de  $0,70 \pm 0,01$  (Rice-Evans y col., 1996). Se determinó la absorbancia, a 734 nm, durante 10 min de la solución de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  luego del agregado de  $35\mu\text{L}$  de EEP. El cálculo se realizó utilizando la ecuación (1), ajustando también los perfiles cinéticos a tiempo infinito.

### 3.3. Determinación de la actividad antioxidante

Se prepararon soluciones de  $\beta$ -caroteno y ácido linoleico utilizando Tween 20 y buffer borato de sodio (pH 9). Alícuotas de estas soluciones se mezclaron y se adicionan  $100\mu\text{L}$  de EEP. A continuación se agregó una solución de lipoxigenasa de soja para inducir la oxidación y se leyó la absorbancia, durante 10 min, a 460 nm (Chaillou y Nazareno, 2006). La actividad antirradicalaria (AAO) se calculó, mediante la ecuación sugerida por Burda and Oleszek (2001):

$$\% \text{AOA} = 100 \times \left[ 1 - \frac{(A_m^0 - A_m^t)}{(A_c^0 - A_c^t)} \right] \quad (2)$$

Donde:

$A_m^0$  : es la absorbancia de la muestra a 0 min  $A_c^0$  : es la absorbancia del control a 0 min,  
 $A_c^t$  and  $A_m^t$  son las absorbancias del control y de la muestra, respectivamente, para un tiempo de 10 min.

#### 4. Resultados y Discusión

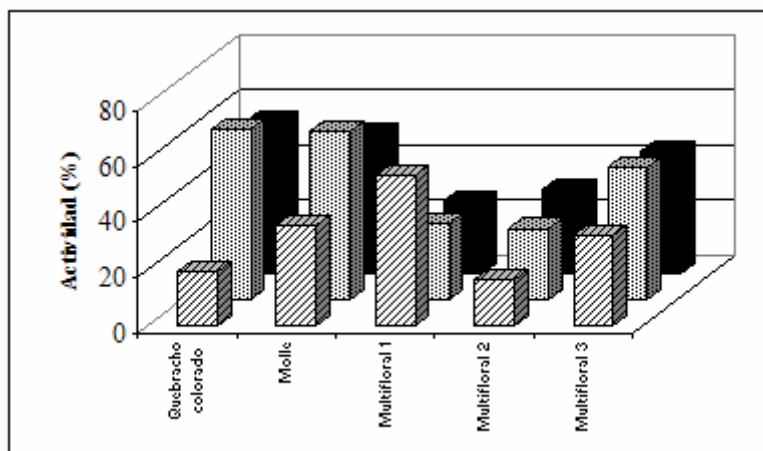
La Tabla 1 muestra el origen floral y el contenido de polifenoles y flavonoides totales de las muestras estudiadas.

**TABLA 1.** Compuestos polifenólicos y flavonoides totales de polen

Origen floral	Contenidos	
	Polifenoles (mg/g)	Flavonoides (mg/g)
<i>Schinopsis quebracho colorado</i> (quebracho colorado)	31,5±0,4	1,5±0,3
<i>Schinus fasciculatus</i> (molle)	20±0,2	2,0±0,2
Multifloral 1	14±0,2	2,6±0,2
Multifloral 2	17,9±0,3	1,8±0,1
Multifloral 3	15,6±0,1	2,7±0,2

El contenido promedio de compuestos fenólicos en polen, de diferentes regiones de España (12,4 mg/g), reportado por Serra Bonvehi y col. (2001), y el informado para pólenes europeos, por Kroyer y Hegedus (2001) son notablemente inferiores al encontrado en polen de Santiago del Estero, mientras que el de flavonoides es superior al cuantificado en las muestras analizadas. Estas diferencias son atribuibles a las diferentes especies vegetales que las abejas utilizan como fuente para la elaboración de estos subproductos.

En la Figura 1 se presenta un gráfico de las actividades antirradicalaria y antioxidante de los diferentes extractos etanólicos.



**FIGURA 1.** Actividad antirradicalaria y antioxidante de extractos polínicos  
 Actividad: ▨ Antioxidante; ▩ Antirradicalaria (DPPH\*); ■ Antirradicalaria (ABTS\*<sup>+</sup>)

Los valores de actividad antirradicalaria de los extractos, para las dos técnicas utilizadas, pueden dividirse en dos grupos, uno constituido por los extractos de polen multifloral con actividades que oscilan entre 25 a 48% y otro constituido por extractos monoflorales de *Schinopsis quebracho colorado* y *Schinus fasciculatus*, con valores superiores al 50%, muy semejantes a la actividad de promedio (53%) reportada por Kroyer y Hegedus (2001).

Los extractos monoflorales presentaron un mayor contenido de compuestos polifenólicos que poseen notable capacidad atrapadora de radicales libres. Se encontraron correlaciones lineales moderadamente fuertes entre el contenido de compuestos polifenólicos y la capacidad atrapadora de DPPH• (R=0,7) y entre estos compuestos y la decoloración de ABTS<sup>•+</sup> (R=0,8). No se encontró correlación para esta actividad y el contenido de flavonoides. Se encontró correlación lineal directa (R=0,98) entre la actividad antirradicalaria sobre los radicales libres DPPH• y ABTS<sup>•+</sup>, indicando que es similar el mecanismo de acción para atrapar estas especies para los extractos polínicos estudiados.

Con respecto a la actividad antioxidante presentada por las muestras sobre el sistema micelar  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico pueden distinguirse dos grupos, uno de actividad baja de 16 a 32 % y un grupo de actividad moderada de 35 a 54%. A diferencia de la actividad antirradicalaria, la capacidad antioxidante no presenta correlación con el contenido de compuestos polifenólicos pero es notable la relación que existe con el contenido de flavonoides (R=0,8). La mayor actividad antioxidante se determinó en extractos polen de origen multifloral, mientras que los monoflorales presentaron actividad moderada.

## 5. Conclusiones

Todas las muestras de polen analizadas presentaron moderada actividad antirradicalaria y antioxidante. Existe correlación lineal directa entre el contenido de polifenoles y la capacidad atrapadora de radicales libres. Sin embargo, la actividad antioxidante es moderada para estos extractos y se relaciona directamente con el contenido de flavonoides.

Extractos de este producto apícola pueden utilizarse como un suplemento dietario efectivo y funcional debido a su contenido de polifenoles y a su significativa actividad antirradicalaria y antioxidante que tendrían notables implicancias fisiológico-nutricionales que se traducirían en un efecto benéfico sobre la salud.

## 6. Referencias

- Almeida-Muradian, L.B.; Pamplona, L. C.; Coimbra, S.; Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 105-111.
- Chaillou, L. L.; Nazareno, M. A. (2006) New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8397-8402.
- Fukumoto, L.; Mazza, G. (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Harborne, J. B; Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. Review. *Phytochemistry* 55, 481-504.

- Kroyer, G.; Hegedus, N. (2001) Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, 171-174.
- Larson, R. (1997). *Naturally Occurring Antioxidants*. Ed 1<sup>era</sup>. USA. Lewis Publishers.
- Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- Sarmiento Silva, T. M.; Camara, C. A.; da Silva Lins, A. C.; Barbosa-Filho, J. M.; Sarmiento da Silva, E. M.; Freitas, B. M.; Ribeiro dos Santos, F. (2006) Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 507-511.
- Serra Bonvehi, J.; Soliva Torrento, M; Lorente, C. (2001) Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1848-1853.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-178.
- Soler-Rivas, C.; Espín, J.C.; Wichers, H. (2000) An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 11, 330-338.
- Yu, L.; Perret, J.; Harris, M.; Wilson, J.; Haley, S. (2003) Antioxidant properties of bran extracts from “Akron” wheat grown at different locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1566-1570.