

DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS, COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTES DEL POLEN DE LAS ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

Gloria Montenegro R.

Laboratorio de Botánica,
Depto. Ciencias Vegetales,
Facultad de Agronomía e
Ingeniería Forestal, PUC.

Enrique Mejías B.

Doctor en Ciencias
de la Agricultura,
Facultad de Agronomía e
Ingeniería Forestal, PUC.

La caracterización de las proteínas, capacidades antioxidantes y concentración de compuestos fenólicos de los pólenes colectados en los predios en estudio, se realizó con el objeto de identificar los más promisorios para su diferenciación y potencial comercialización con alto valor agregado. Estos resultados contribuyen a valorizar los subproductos de la polinización de especies frutales, respondiendo a una demanda internacional creciente por productos naturales, con propiedades y orígenes específicos que además puedan certificar su alto valor nutritivo y/o su capacidad antioxidante y/o de pigmentos.

Los Protocolos ajustados por el equipo de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC) para el proyecto INNOVA Chile de CORFO y utilizados en el análisis de las muestras de polen de las colmenas en los huertos frutales en estudio, fueron los siguientes:

1. Se parte con 1 gramo de polen en un tubo de ensayo o tubo Falcon de 20-25 ml de capacidad.

2. Para la obtención de **compuestos fenólicos**, se añade 10 ml de una mezcla de alcohol con agua acidificada a pH=2 con HCl. Para la obtención de **pigmentos carotenoides**, se añade 5 ml de acetona. Se agita vigorosamente para disgregar completamente las corbículas de polen.
3. El tubo se pone en un sonicador por 60 minutos.
4. Se centrifuga a alta velocidad (10.000 rpm) por 10 min, para separar completamente los restos de polen del extracto sobrenadante.
5. En caso de extraer compuestos fenólicos, el sobrenadante se colecta en un tubo limpio, quedando listo para su análisis posterior. Una variación sería concentrar el extracto hasta sequedad en rotoevaporador, a 45°C, para luego resuspender el concentrado en agua destilada, etanol o metanol y proceder a su análisis en pruebas de actividad biológica (resuspendido con agua o etanol), análisis vía HPLC (resuspendido con etanol o metanol) o almacenaje. El almacenaje debe ser bajo cero (idealmente a -20° C).
6. En caso de extraer **carotenoides**, el sobrenadante se pone en un embudo de decantación y se le agregan 5 ml de éter de petróleo. A continuación se agrega 10 ml cada una, suavemente y dejándola resbalar por las paredes del embudo. Se agita suavemente, y una vez que se forman dos fases, se elimina la fase inferior (acetona-agua). Este proceso se repite dos veces más, dejando salir una pequeña parte de la fase superior en la tercera repetición para asegurar la salida de toda la fase inferior.
7. Se añade 5 ml de metanol acuoso al 92 %, se mezcla energicamente (se debe destapar el embudo para que salgan gases) y se deja formar las dos fases. La fase superior (éter de petróleo) es colectada en un tubo limpio, quedando listo para su análisis posterior. El almacenaje debe ser en frío (4°C o menos).

PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PÓLENES MEDIANTE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO CON DPPH (1,1-DIPHENYL-2-2PICRYLHYDRAZYL)

Fórmula: C₁₈H₁₂N₅O₆

Peso molecular DPPH:

394,3 gr/mol (1 mmol = 0,3943 gr = 394,3 mg).

El DPPH, es un compuesto que es considerado un radical libre, y en solución presenta una marcada coloración violeta. Cuando se encuentra con un compuesto antioxidante, se estabiliza y pierde su coloración, por lo cual la disminución de la absorbancia de una solución de DPPH al añadirle un compuesto cualquiera, indicará la capacidad antioxidante de éste, que será mayor mientras mayor y más rápida sea la pérdida de coloración de la solución de DPPH. Para medir la capacidad antioxidante de un extracto de polen con este método, se siguió el siguiente protocolo:

1. Se preparó una solución de DPPH en metanol, con una absorbancia (DO) de entre 0,6 y 0,7 a 517 nm.
2. Se estableció una línea base a 517 nm, haciendo "autocero" contra un blanco de metanol.
3. En una cubeta de cuarzo o vidrio de 1 ml de capacidad, se pone 950 µl de la solución de DPPH, y se mide su absorbancia (ésta debe encontrarse entre 0,6 y 0,7).
4. El espectrofotómetro, se programó para que mida la absorbancia cada 5 segundos, de modo de hacer una curva de cinética. Se sacó la cubeta y se le agregó 50 µl del extracto de miel cuya capacidad antioxidante se mide. Se mezcla y se devuelve al espectrofotómetro tan rápido como sea posible.

5. Si el espectrofotómetro no tiene capacidad de almacenamiento de datos, se debe anotar cada nueva medición, y se grafica la absorbancia v/s tiempo, para así obtener la curva de cinética de la reacción. Pasados 3 minutos, se considera finalizada la reacción (los equipos modernos constan con memoria interna y pantalla donde pueden almacenarse los datos y dibujar la curva, respectivamente).
6. El descenso en la absorbancia de la solución (decoloración), indica estabilización del DPPH y la magnitud y la velocidad de dicha caída estarán directamente relacionados con la capacidad antioxidante del extracto. Los resultados se expresan en mmol de DPPH consumido por ml de extracto.

RESULTADOS DE PIGMENTOS

Para cada muestra (cultivares de Cerezo y Manzano), se determinó el origen botánico de las especies vegetales presentes en ellas. Cada especie identificada fue separada y caracterizada desde el punto de vista de los pigmentos que esta poseía (Betacaroteno y Licopeno). Una vez obtenido tales resultados, se determinó el real aporte de pigmentos que cada una de estas especies entregaba a la muestra total tanto de Cerezo como de Manzano, sometida a análisis. Dicha estimación se efectuó considerando el porcentaje encontrado de cada especie, tras el análisis del origen botánico practicado a cada muestra (**Cuadro 1**).

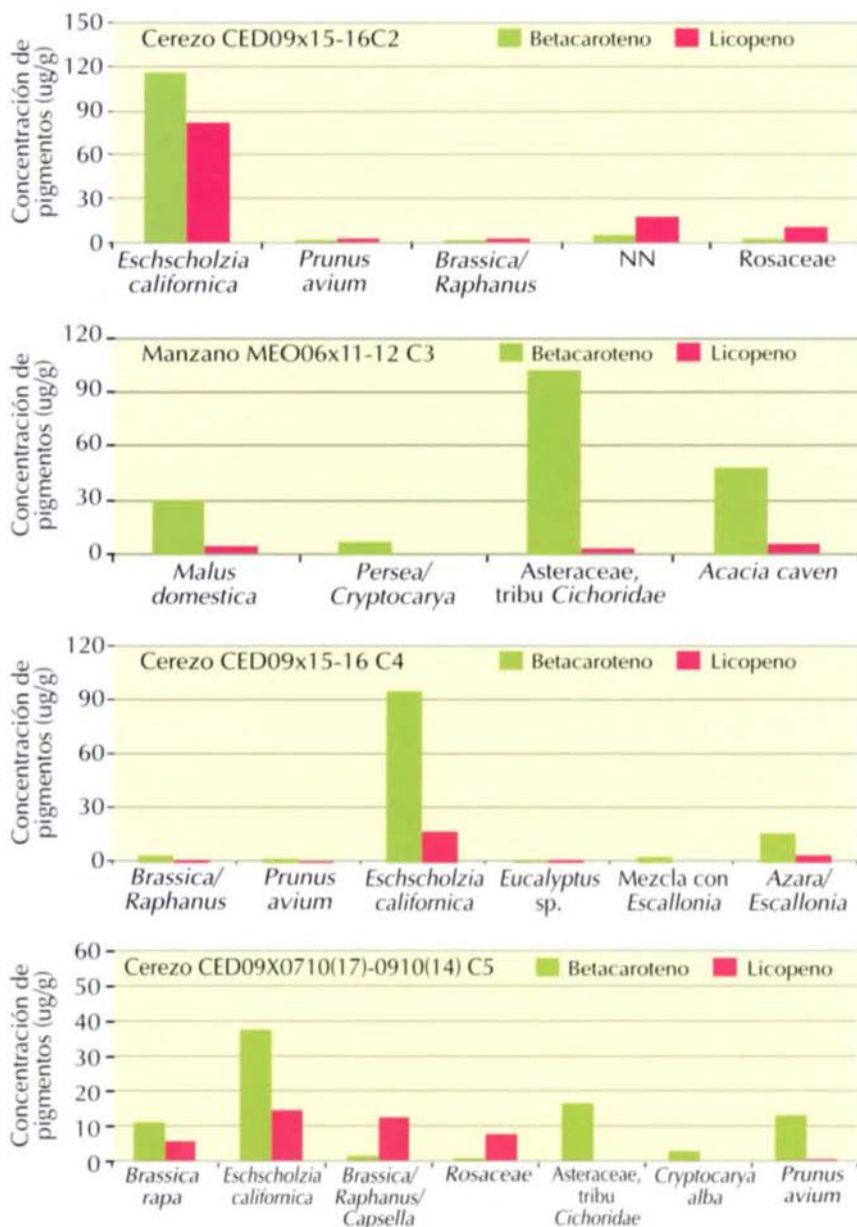
Las **Figuras 1, 2, 3 y 4**, comparan el aporte de Betacaroteno y Licopeno, de cada especie de polen encontrada en cada muestra de Cerezo y/o Manzano.

Cuadro 1. Análisis de contenido de pigmentos en cada muestra de Cerezo y Manzano, considerando la proporción de polen de cada especie vegetal identificada en ellas.

Muestra	Especie	ug Beta-caroteno en 1 g muestra	Betacaroteno por muestra	ug Licopeno en 1 g muestra	Licopeno por muestra
MUESTRA 1	<i>Eschscholzia californica</i>	116,20	128,57	31,0	35,26
Muestra CED09X15-16 C2	<i>Prunus avium</i>	2,35		0,5	
Cerezo	<i>Brassica/Raphanus</i>	2,20		0,6	
	NN	4,68		2,3	
	Rosaceae	3,14		0,8	
MUESTRA 2	<i>Brassica/Raphanus</i>	4,67	122,80	1,6	24,76
Muestra CED09X15-16 C4	<i>Prunus avium</i>	2,77		0,7	
Cerezo	<i>Eschscholzia californica</i>	94,36		17,0	
	<i>Eucalyptus</i> sp.	0,83		1,7	
	Mezcla con <i>Escallonia</i>	3,77		NR	
	<i>Azara/Escallonia</i>	16,39		3,8	
MUESTRA 3	<i>Brassica rapa</i>	11,12	84,85	5,8	39,18
Muestra CED09X0710 (17)-0910(14) C5	<i>Eschscholzia californica</i>	37,41		14,0	

Continuación Cuadro 1.

Muestra	Especie	ug Beta-caroteno en 1 g muestra	Betacaroteno por muestra	ug Licopeno en 1 g muestra	Licopeno por muestra
Cerezo	<i>Brassica/Raphanus/Capsella</i>	2,10		12,0	
	Rosaceae	1,51		7,2	
	Asteraceae, tribu <i>Cichoridae</i>	16,41		NR	
	<i>Cryptocarya alba</i>	3,62		NR	
	<i>Prunus avium</i>	12,67		0,1	
MUESTRA 4 Muestra MEO02X15-16 C1 Manzano	<i>Malus domestica</i>	56,62	56,62	8,24	8,24
MUESTRA 5 Muestra MEO02X16-17 C1 Manzano	<i>Malus domestica</i>	167,00	219,53	59,85	59,85
	<i>Brassica/Raphanus</i>	52,54			
MUESTRA 6 Muestra MEO30IXVi(17) -Ma(10) C1 Manzano	<i>Malus domestica</i>	142,91	142,91	5,78	5,78
MUESTRA 7 Muestra MEO06X11-12 C3 Manzano	<i>Malus domestica</i>	31,58	190,25	5,29	16,23
	<i>Persea/Cryptocarya</i>	7,38		NR	
	Asteraceae, tribu <i>Cichoridae</i>	101,71		4,17	
	<i>Acacia caven</i>	49,58		6,77	



Figuras 1, 2, 3 y 4. Presencia de pigmentos de cada especie vegetal presente en 1g de muestra de polen de cerezo o manzano (VI Región, temporada 2008-2010).

A partir de las figuras anteriores, se puede concluir que las especies que predominan en cada muestra, son aquellas que entregan el mayor aporte de betacaroteno y licopeno. Un análisis de la muestra completa sin separar los pólenes apícolas por especie vegetal, da un valor semejante al determinado en este estudio para ambos pigmentos. De esta forma, se concluye que para los análisis posteriores se caracterizó la presencia de pigmentos en la muestra completa. Es importante destacar, que la presencia de licopeno no es constante a lo largo de las muestras analizadas. En todas se encontró presencia de betacaroteno no así el licopeno que es su precursor.

Esto sugiere que en muchas de estas especies vegetales, la síntesis de pigmentos estaría enfocada principalmente a la formación de betacaroteno, permaneciendo en cantidades más bien residuales, el precursor químico de este compuesto. El rol protector del betacaroteno como antioxidante en el grano de polen, sería una de las razones por las cuales la presencia de este compuesto predomina en las muestras analizadas.

ANÁLISIS REALIZADOS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MUESTRAS DE POLEN EN COLMENAS DE FRUTALES

Protocolos utilizados

1. Medición de compuestos fenólicos hidrosolubles totales:
Técnica Folin Ciocalteu.
2. Medición de capacidad antioxidante:
Técnica FRAP
3. Medición de actividad antirradicalaria:
Técnica DPPH

Codificación de las muestras

Muestra 1: Muestra Control: Miel de *Schinus latifolius*.

Muestra 2: Muestra Polen Fundo San Francisco de Pelumpen; colmena A1C2. Cultivo de Palto con presencia de *Schinus Latifolius*.

Muestra 3: Muestra de Polen MCH07X10-11; Zona de colecta: Choapino – Cultivo Manzano con presencia de *Acacia caven*. Fecha colecta 07.10.2008.

Muestra 4: Muestra de Polen CLL15XL (17) – MI(10)C11; Zona de colecta: La Lechería. Cultivo de Cerezos con presencia de *Acacia caven*. Fecha colecta 15.10.2008.

Las muestras fueron analizadas en triplicado. Los resultados presentados corresponden al valor promedio de las mediciones.

- Medición de **compuestos fenólicos** hidrosolubles totales mediante técnica Folin Ciocalteu (**Figura 5**).

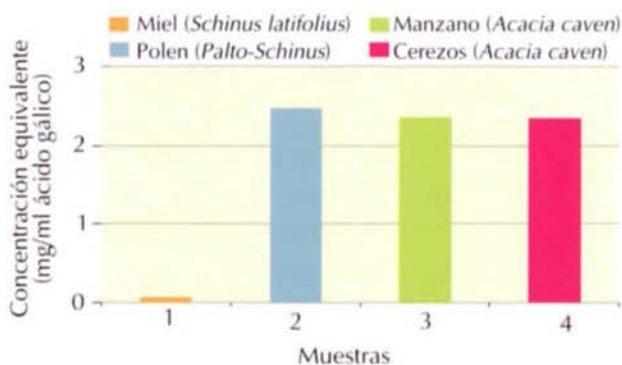


Figura 5. Medición de compuestos fenólicos hidrosolubles totales mediante técnica Folin Ciocalteu.

- Medición de Actividad Antioxidante mediante técnica FRAP (Figura 6).

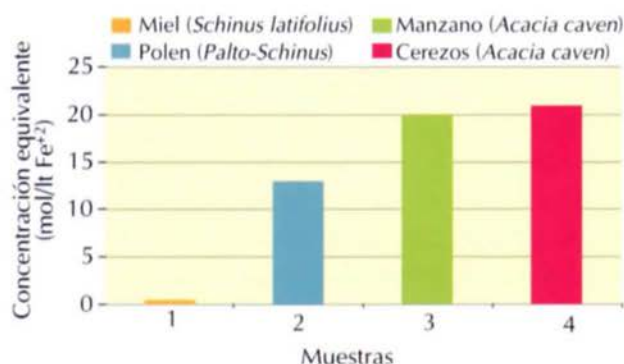


Figura 6. Medición de actividad antioxidante mediante técnica FRAP.

- Medición de Actividad Antirradicalaria mediante técnica DPPH (Figura 7).

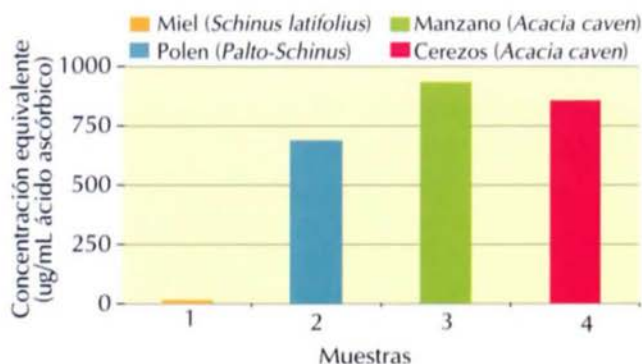


Figura 7. Medición de actividad antirradicalaria mediante técnica DPPH.

En una conclusión general, es posible afirmar que dichos pólenes requieren ser caracterizados de forma amplia, con el fin de establecer en un futuro próximo, si efectivamente, existe algún grado de relación entre las propiedades biológicas aquí mencionadas.