



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

**“AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN
DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS
MAYORITARIOS DEL POLEN COLECTADO POR LA
ABEJA *Melipona beecheii*”**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

ROSA ISELA CÁCERES CHAN

ASESOR:

DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ

COASESOR:

DR. ALEJANDRO YAM PUC

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

28/02/2020



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO.

Instituto Tecnológico de Mérida

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.

No. DE OFICIO: X-292/20

Mérida, Yucatán, 05/Octubre/2020

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

C. ROSA ISELA CÁCERES CHAN
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LOS ALIMENTOS Y BIOECNOLOGIA
PRESENTE.

De acuerdo al fallo emitido por su directora Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, el codirector Jesús Alejandro Yam Puc y la comisión revisora integrada por Jesús Manuel Ramón Sierra y Carolina Escobedo Martínez, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**"AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS DEL POLEN
COLECTADO POR LA ABEJA *Melipona Beecheii*"**

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica.


HERMILA ANDREA ULIBARRÍ BENÍTEZ
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
HAUB/EOV/zac



S.E.P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MERIDA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P 911

C. P 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-50-00, Ext. 12601, 12602

e-mail: depi_merida@tecnm.mx <http://www.itmerida.mx>



*Dedico este trabajo a mis padres **Rosalía** y **Hernán** por siempre creer en mí, brindarme su amor y apoyo incondicional en todo momento, por todos sus sacrificios y esfuerzos para que pudiera llegar hasta aquí, a mis hermanos **Isabel**, **Hernán** y mi sobrino **Alejandro**, por hacerme reír, darme ánimos y palabras de aliento, a mi novio **Martín** por ser un gran apoyo, por darme su comprensión y estar a mi lado siempre alentando mis pasos, a **Tere** y **Merly** por su invaluable amistad y por estar ahí siempre para mí, al **Dr. Alejandro Yam** por su apoyo, paciencia y dedicación, a todas las personas que formaron parte de este trabajo y por último pero no menos importante a ti, **Dios**, por darme salud y guiar mis pasos.*

Quiero agradecer a la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez por la oportunidad y el apoyo incondicional que me ha brindado para el desarrollo de este trabajo, por todas sus enseñanzas y conocimiento transmitido, por la amabilidad, comprensión, confianza, paciencia y tiempo. Muchas gracias Dra. Elizabeth.

Al M.C Jesús Ramón Sierra, por todas sus enseñanzas, porqué en las dificultades siempre ha estado ahí para brindarme su apoyo. Gracias Jesús.

A la Dra. carolina Escobedo que a pesar de la distancia siempre ha estado presente en el desarrollo de este trabajo y gracias por todas sus aportaciones para el enriquecimiento del mismo.

Al Dr. Jesús Alejandro Yam Puc, porque sin usted este trabajo no hubiera sido posible, Gracias Dr. Alex por toda la paciencia y dedicación que me brindó, gracias por ser un excelente maestro y ser humano, por orientarme, apoyarme y ayudarme siempre, por todas las aportaciones que hizo para el enriquecimiento de este trabajo, por su apoyo y amistad, por todo, gracias.

A mis amigos Yuli, Daniel y Lupita por todos los momentos que compartimos durante esta travesía y por su apoyo incondicional.

Quiero darles las gracias a mis amigos del Laboratorio de Microbiología Aplicada y Molecular, que sin ustedes la estancia en el laboratorio no hubiese sido la misma, a todos gracias por sus atentos tratos, consejos y la amistad que me brindaron.

Al consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY en especial a la Dra. Rocío Borges Argáez y a la QBB. Mirbella Cáceres Farfán.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 FLORA DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.....	6
2.2 VEGETACIÓN MELÍFERA Y POLINÍFERA DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN	6
2.3 LA ABEJA	9
2.4 LOS MELIPONINOS EN YUCATÁN.....	10
2.5 <i>MELIPONA BEECHEII</i> Y SU IMPORTANCIA EN YUCATÁN.....	11
2.6 LOS PRODUCTOS DE LA COLMENA	12
2.7 LA MIEL.....	12
2.8 LA CERA	12
2.9 EL PROPÓLEO	12
2.10 EL POLEN DE LA COLMENA	12
2.11 EL POLEN DE LAS FLORES	12
2.12 PRODUCTOS NATURALES Y METABOLITOS SECUNDARIOS	13
2.13 EL POLEN DE LA COLMENA	16
2.14 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL POLEN DE ABEJA	17
2.15 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL POLEN DE ABEJA.....	18
2.15.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL POLEN DE ABEJA	18
2.15.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL POLEN DE ABEJA.....	19
2.16 METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN EL POLEN DE ABEJA	19
2.16.1 POLIFENOLES	19
2.16.2 LOS ÁCIDOS FENÓLICOS	20
2.16.3 LOS FLAVONOIDES	21
2.16.4 LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS	24
2.17 COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN EL POLEN DE ABEJA <i>MELIPONA RUFIVENTRIS</i>	28
2.18 JUSTIFICACIÓN.....	29
2.18.1 OBJETIVO GENERAL	29
2.18.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	29
CAPÍTULO III	30

3.	MATERIALES Y METODOS.....	31
3.1	PROCEDIMIENTOS GENERALES	31
3.2	OBTENCIÓN DEL POLEN COLECTADO POR LA ABEJA <i>MELIPONA BEECHEII</i>	31
3.3	EVALUACIÓN PROXIMAL DEL POLEN COLECTADO POR LA ABEJA <i>MELIPONA BEECHEII</i>	33
3.3.1	DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD	33
3.3.2	DETERMINACIÓN DE CENIZAS.....	33
3.3.3	DETERMINACIÓN DE GRASAS.	34
3.3.4	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA (NITRÓGENO).	34
3.4	EXTRACCIÓN DEL POLEN DE ABEJA <i>M. BEECHEII</i>	35
3.5	FRACCIONAMIENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO DEL EXTRACTO METANÓLICO CRUDO DEL POLEN DE <i>M. BEECHEII</i> POR POLARIDAD ASCENDENTE	36
3.6	PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA (IC-2A) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA AL VACÍO (VLC).....	36
3.7	PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IC-3D POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA POR GRAVEDAD.....	37
3.8	PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES IC-4C E IC-4D POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA POR GRAVEDAD.....	38
3.9	PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN RC-5B POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA POR GRAVEDAD.....	39
3.10	PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN CLOROFORMICA IC-2B POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA POR GRAVEDAD	40
3.11	PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIÓNES IC-7A E IC-7B POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE GRAVEDAD.	40
3.12	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	43
	CAPÍTULO IV	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1	EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL.....	45
4.1.1	HUMEDAD	45
4.1.2	CENIZAS	46
4.1.3	GRASAS	46
4.1.4	PROTEÍNAS	47
4.1.5	EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO (ELN)	47
4.2	PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE POLEN DE <i>MELIPONA BEECHEII</i>	48
4.3	ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES SEMIPURAS (I-VII) POR CG-EM, IR E IDENTIFICACIÓN DE LO METABOLITOS PRESENTES.	49
4.3.1	ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN I POR CG-EM	49
4.3.1.1	IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO PALMÍTICO (1)	49

4.3.1.2	IDENTIFICACIÓN DEL ESTEROL (B/T-SITOSTEROL) (2).....	53
4.3.1.3	ANÁLISIS POR IR DE LA FRACCIÓN I.....	56
4.3.2	ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN II POR CG-EM.....	57
4.3.2.1	IDENTIFICACIÓN DEL ÁCIDO MIRÍSTICO (3).....	57
4.3.2.2	ANÁLISIS POR IR DE LA FRACCIÓN II.....	59
4.3.3	ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN III POR CG-EM.....	60
4.3.3.1	IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN III.....	61
4.3.3.2	ANÁLISIS POR IR DE LA FRACCIÓN III.....	75
4.3.3.3	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.....	75
4.3.3.4	DISCUSION GENERAL.....	77
	CAPÍTULO V.....	81
5	CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	82
	REFERENCIAS.....	83

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 2.1	EJEMPLOS REPRESENTATIVOS DE PRODUCTOS NATURALES.....	15
FIGURA 2.2.	POLEN DE ABEJA <i>M. BEECHEII</i>	17
FIGURA 2.3	ESTRUCTURAS BÁSICAS DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....	20
FIGURA 2.4	ESTRUCTURA BÁSICA DEL ESQUELETO FLAVONÓLICO.....	22
FIGURA 2.5	METABOLITOS AISLADOS DEL POLEN COLECTADO POR LA ABEJA SIN AGUIJÓN <i>MELIPONA RUFIVENTRIS</i>	28
FIGURA 3.1	UBICACIÓN DEL MUNICIPIO DE MANÍ, YUCATÁN.....	32
FIGURA 3.2	VISTA INTERNA DE UN JABÓN (POCILLOS DE POLEN Y MIEL) DE <i>M. BEECHEII</i>	32
FIGURA 3.3	A) POLEN COLECTADO POR LA ABEJA <i>M. BEECHEII</i> . B) EXTRACCIÓN DEL POLEN COLECTADO POR LA ABEJA <i>M. BEECHEII</i> POR MACERACIÓN CON METANOL. C) FILTRACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL POLEN. D) EXTRACTO METANÓLICO CRUDO DEL POLEN.....	35
FIGURA 3.4	A) SEPARACIÓN DE LA FASE ORGÁNICA. B) MONITOREO DE LA FRACCIÓN IC-2A POR TLC. C) MONITOREO DE LAS FRACCIONES IC-2B E IC-2C POR TLC.....	36
FIGURA 3.5	PURIFICACIÓN POR VLC DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA (RC-2A).....	37
FIGURA 3.7	MONITOREO POR TLC DE LAS FRACCIONES IC-3A-E.....	37
FIGURA 3.8	A) PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IC-3D POR CROMATOGRAFÍA COLUMNA DE GRAVEDAD. B) MONITOREO POR TLC DE LAS FRACCIONES IC-4A-E.....	38

FIGURA 3.9	A) PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES IC-4C Y IC-4D POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA POR GRAVEDAD. B) MONITOREO POR TLC DE LAS FRACCIONES IC-5A-D	39
FIGURA 3.10	A) PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IC-5B POR CROMATOGRAFÍA POR COLUMNA POR GRAVEDAD. B) MONITOREO POR TLC DE LAS FRACCIONES IC-6A-C	39
FIGURA 3.11	A) PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IC-2B POR CROMATOGRAFÍA POR COLUMNA DE GRAVEDAD. B) MONITOREO POR TLC DE LAS FRACCIONES IC-7A-I	40
FIGURA 3.12	A) PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IC-7A Y IC-7B POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA POR GRAVEDAD. B) MONITOREO POR TLC DE LAS FRACCIONES IC-8A-G	41
FIGURA 3.13	ESQUEMA DE PURIFICACIÓN DEL POLEN DE <i>M. BEECHEII</i> Y LA OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES SEMIPURAS (I-VII)	42
FIGURA 4.1	CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA DE LAS FRACCIONES SEMIPURAS OBTENIDAS DE LA PURIFICACIÓN DEL POLEN DE ABEJA <i>M. BEECHEII</i> . A) FRACCIÓN HEXÁNICA (I Y II) B) FRACCIÓN CLOROFÓRMICA (III, IV, V, VI Y VII)	48
FIGURA 4.2	PERFIL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LA FRACCIÓN I	49
FIGURA 4.3	ESPECTRO DE MASAS DEL ÁCIDO PALMÍTICO (1)	50
FIGURA 4.4	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL ÁCIDO PALMÍTICO (1)	52
FIGURA 4.5	FORMACIÓN DEL ION FRAGMENTO A m/z 60 POR EL REORDENAMIENTO DE TIPO MCLAFFERTY EN EL ÁCIDO PALMÍTICO (1)	52
FIGURA 4.6	RUPTURA EN A CARACTERÍSTICA EN EL ÁCIDO PALMÍTICO (1). FORMACIÓN DEL ION FRAGMENTO A m/z 239 POR PÉRDIDA DE 17 UNIDADES DE MASA	52
FIGURA 4.7.	ESPECTRO DE MASAS DE B-SITOSTEROL (2A) O Γ -SITOSTEROL (2B) (2) ...	53
FIGURA 4.8	REACCIÓN DE RETRO DIELS-ALDER	54
FIGURA 4.9	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE B-SITOSTEROL O Γ -SITOSTEROL (2)	55
FIGURA 4.9	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE B-SITOSTEROL O Γ -SITOSTEROL (2)	56
FIGURA 4.11	PERFIL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LA FRACCIÓN II	57
FIGURA 4.12	ESPECTRO DE MASAS DEL ÁCIDO MIRÍSTICO (3)	58
FIGURA 4.13	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL ÁCIDO MIRÍSTICO (3)	59
FIGURA 4.14	FORMACIÓN DEL ION FRAGMENTO A m/z 60 POR EL REORDENAMIENTO DE TIPO MCLAFFERTY EN EL ÁCIDO MIRÍSTICO (3)	59
FIGURA 4.15	ESPECTRO INFRARROJO DE LA FRACCIÓN II	60
FIGURA 4.16	PERFIL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LA FRACCIÓN III	61
FIGURA 4.17	ESPECTRO DE MASAS DEL 5-(<i>E</i>)-OCTADECENO (4)	62
FIGURA 4.18	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL 5-(<i>E</i>)-OCTADECENO (4)	62

FIGURA 4.19	ESPECTRO DE MASAS DEL 9-(<i>E</i>)-OCTADECENO (5)	63
FIGURA 4.20	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL 9-(<i>E</i>)-OCTADECENO (5)	63
FIGURA 4.21	ESPECTRO DE MASAS DEL ÉSTER METÍLICO DEL ÁCIDO 14-METILPENTADECÍLICO (6)	64
FIGURA 4.22	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL ÉSTER METÍLICO DEL ÁCIDO 14-METILPENTADECÍLICO (6)	65
FIGURA 4.23	RUPTURA EN A CARACTERÍSTICA EN EL ÉSTER METÍLICO DEL ÁCIDO 14-METILPENTADECÍLICO (6). FORMACIÓN DEL ION FRAGMENTO A m/z 59 POR PÉRDIDA DE 211 UNIDADES DE MASA	65
FIGURA 4.24	FORMACIÓN DEL ION FRAGMENTO A m/z 74 POR EL REORDENAMIENTO DE TIPO MCLAFFERTY EN EL ÉSTER METÍLICO DEL ÁCIDO 14-METILPENTADECÍLICO (6)	65
FIGURA 4.25	ESPECTRO DE MASAS DEL ÉSTER 1,1-DIMETILETÍLICO DEL ÁCIDO PALMÍTICO (7)	66
FIGURA 4.26	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL ÉSTER 1,1-DIMETILETÍLICO DEL ÁCIDO PALMÍTICO (7)	67
FIGURA 4.27	RUPTURA EN A CARACTERÍSTICA EN EL ÉSTER 1,1-DIMETILETÍLICO DEL ÁCIDO PALMÍTICO (7). FORMACIÓN DEL ION FRAGMENTO A m/z 239 POR PÉRDIDA DE 73 UNIDADES DE MASA	67
FIGURA 4.28	FORMACIÓN DE LOS IONES FRAGMENTO A m/z 285 Y 116 POR EL REORDENAMIENTO DE TIPO MCLAFFERTY EN EL ÉSTER 1,1-DIMETILETÍLICO DEL ÁCIDO PALMÍTICO (7)	68
FIGURA 4.29	ESPECTRO DE MASAS DEL DOTRIACONTANO (8)	69
FIGURA 4.30	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL DOTRIACONTANO (8)	69
FIGURA 4.31	ESPECTRO DE MASAS DEL HEPTADECANO (9)	70
FIGURA 4.32	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL HEPTADECANO (9)	70
FIGURA 4.33	ESPECTRO DE MASAS DEL ÉSTER BUTÍLICO DEL ÁCIDO ESTEÁRICO (10)	71
FIGURA 4.34	RUPTURA EN A CARACTERÍSTICA ÉSTER BUTÍLICO DEL ÁCIDO ESTEÁRICO (10). FORMACIÓN DE LOS IONES FRAGMENTO A m/z 267 Y 101 POR PÉRDIDAS DE 73 Y 239 UNIDADES DE MASA, RESPECTIVAMENTE	72
FIGURA 4.35	FORMACIÓN DE LOS IONES FRAGMENTO A m/z 116 Y 285 POR EL REORDENAMIENTO DE TIPO MCLAFFERTY EN EL ÉSTER BUTÍLICO DEL ÁCIDO ESTEÁRICO (10)	73
FIGURA 4.36	ESPECTRO DE MASAS DEL 2-METILTETRACOSANO (11)	74
FIGURA 4.37	FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL 2-METILTETRACOSANO (11)	74
FIGURA 4.38	ESPECTRO INFRARROJO DE LA FRACCIÓN III	75

FIGURA 4.39 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA <i>E. COLI</i> ATCC 25922 DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DEL POLEN DE ABEJA <i>M. BEECHEII</i>	76
FIGURA 4.40 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DURANTE 74 H ..	77
FIGURE 4.41 COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN EL POLEN DE <i>M. BEECHEII</i>	79
TABLA 2.1 PRINCIPALES PLANTAS NECTARÍFERAS Y POLINÍFERAS DE LA ABEJA XUNAN KAB (<i>M. BEECHEII</i>) EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN; LAS ESPECIES ESTÁN ENLISTADAS EN ORDEN DECRECIENTE DE IMPORTANCIA	8
TABLA 2.2 ESPECIES DE ABEJAS SIN AGUIJÓN DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN	11
TABLA 3.1 COMPOSICIÓN DE LAS FASES MÓVILES UTILIZADAS DURANTE LA VLC	37
TABLA 4.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS DEL POLEN COLECTADO POR LA ABEJA <i>M. BEECHEII</i>	45
TABLA 4.2 COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN EL POLEN DE ABEJA <i>M. BEECHEII</i>	82

RESUMEN

El polen es un conjunto de células reproductoras masculinas producidas en las anteras de los espermatofitos y desempeña un papel esencial en el ciclo de vida de las plantas con flores. Los granos de polen son excelentes fuentes de carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales necesarios para el crecimiento, desarrollo y fusión de las plantas con un gameto femenino. Varios estudios han mostrado que el polen recolectado por las abejas melíferas es muy selectivo y que la mayor parte del polen proviene sólo de unas pocas plantas. El polen de abeja es uno de los alimentos naturales más ricos y puros tiene valor nutricional y medicinal. Estas propiedades del polen de abeja son atribuidas a algunos compuestos bioactivos presentes en el polen que justifican su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades. Las abejas sin aguijón comprenden un grupo diverso de abejas eusociales, especialmente diversificadas en los trópicos y son consideradas uno de los polinizadores más importantes y también, los más relevantes como proveedores de servicios ecosistémicos en varios ecosistemas tropicales. Las abejas sin aguijón constituyen un componente importante en las complejas redes de polinizadores de la mayoría de los ecosistemas forestales tropicales. Además, las abejas sin aguijón se consideran poliléticas debido a su capacidad para recolectar polen y néctar de una variedad de plantas no relacionadas. Saber cómo se alimentan estas abejas en los bosques tropicales es una prioridad para garantizar su conservación y los servicios que brindan estos insectos. La tribu Meliponini es una especie de grupo de abejas que se encuentran en todo el mundo y se caracterizan por tener un carácter social y una picadura atrofiada y no funcional, lo que justifica su popular nombre de abejas sin aguijón. Estas son abejas tropicales, entre las cuales Trigona y Melipona son las más conocidas. La abeja *Melipona beecheii* es la única especie que los mayas han domesticado desde tiempos inmemoriales y es una abeja sin aguijón, conocida como "xunan kab" (en lengua maya). Como resultado de este trabajo, se identificaron once metabolitos, ácido palmítico (1), β/γ -sitosterol (2), ácido mirístico (3), 5-(E)-octadeceno (4), 9-(E)-octadeceno (5), éster metílico del ácido 14-metilpentadecílico (6) éster 1,1-dimetileílico del ácido palmítico (7), dotriacontano (8), 1-heptadeceno (9), éster butílico del ácido esteárico (10) y 2-metil tetracosano (11), fueron identificados en extracto metanólico del polen de abeja *M. beecheii*.

ABSTRACT

Pollen is the male reproductive cells produced in the anthers of the spermatophytes and plays an essential role in the life cycle of flowering plants. Pollen grains are excellent sources of carbohydrates, proteins, lipids, vitamins, and minerals necessary for plant growth, development, and fusion with a female gamete. Various studies have showed that the pollen collected by honey bees is very selective and the bulk of pollen comes from a few plants only. Bee pollen is one of the richest and purest natural foods and has nutritional and medicinal value. These important properties of bee pollen are due to some medicinally important bioactive compounds present in pollen which justify its use in traditional medicine for the treatment of different diseases. Stingless bees comprise a diverse group of eusocial bees, especially diversified in the tropics and they are considered one of the most important pollinators and also, the most relevant as ecosystem service providers in several tropical ecosystems. Stingless bees constitute an important component in the complex pollinator networks of most tropical forest ecosystems. Additionally, stingless bees are considered polylectic because of their ability to collect pollen and nectar from an array of nonrelated plants. To know how these bees forage in tropical forests is a priority to guarantee their conservation and services these insects provide. The Meliponini tribe is a bee group species encountered around the world and they are characterized as having social and bearing an atrophied and non-functional sting, which justifies their popular name of stingless bees. The Meliponini tribe, belongs to the Apidae family, and Meliponinae subfamily. These are tropical bees, among which *Trigona* and *Melipona* are the most well-known. The bee *Melipona beecheii* is the only species that the Mayas have domesticated since time immemorial and it is a stingless bee, known as “xunan kab” (in mayan language). As a result of this research, eleven metabolites, palmitic acid (**1**), β/γ -sitosterol (**2**), myristic acid (**3**), 5-(*E*)-octadecene (**4**), 9-(*E*)-octadecene (**5**), pentadecylic acid, 14-methyl, methyl ester (**6**), palmitic acid, 1,1-dimethylethyl ester (**7**), dotriacontane (**8**), heptadecane (**9**), stearic acid butyl ester (**10**), and 2-methyltetracosane (**11**) were identified in the methanol extract from *M. beecheii* pollen bee.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El polen es el conjunto de las células sexuales masculinas de las plantas con flores. Se forma en el interior de los estambres y, una vez maduro, es liberado. Su función biológica es alcanzar la parte femenina de una flor y hacer posible la fecundación de la ovocélula (Belmonte & Roure, 2002). Las abejas desempeñan un papel importante como polinizadores, ya que transfieren el polen del estambre de una flor al estigma (parte femenina) de las mismas o de diferentes flores (Ellis, 2017). El polen de abeja es un aglomerado de polen de flores de varias fuentes vegetales que son recogidos por las abejas y mezclados con néctar y secreciones de las glándulas hipofaríngeas (Carpes *et al.*, 2008). Debido a su origen floral, el polen de abeja puede tener una composición química variable dependiendo de la región o estación (Rebelo *et al.*, 2016). Las abejas requieren polen para su crecimiento y desarrollo, lo utilizan como fuente de alimentación para todas las etapas de desarrollo en la colmena (Ellis *et al.*, 2010; Morais *et al.*, 2011). En su composición química, el polen presenta nutrientes valiosos como aminoácidos libres, minerales, oligoelementos, carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, carotenoides, flavonoides y fitoesteroles (Abouda *et al.*, 2011; Aloisi & Ruppel, 2014; Carpes *et al.*, 2008). El polen de abeja es un producto de la colmena muy apreciado por la medicina natural debido a sus propiedades: antimicótica, antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria y nutricional (Ellis *et al.*, 2010; Komosinska *et al.*, 2015).

La creciente aparición de cepas con resistencia a los antimicrobianos representa un peligro para la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie cada vez mayor de infecciones causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos, lo cual representa una amenaza importante para la salud pública mundial (OMS, 2017). Con base en lo mencionado anteriormente se ha impulsado la búsqueda de tratamientos alternativos provenientes de fuentes naturales como el polen de abeja, debido a que diversos estudios han demostrado tener efecto inhibitorio contra diversos agentes bacterianos. El objetivo de este trabajo es aislar, purificar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto del polen colectado por la abeja *Melipona beecheii*.

CAPÍTULO II

2. ANTECEDENTES

2.1 FLORA DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

La península de Yucatán forma parte de la Provincia Biótica Península de Yucatán conformada por los estados mexicanos de Campeche, Quintana Roo y Yucatán y los Departamentos del norte de Belice y el Departamento del Petén de Guatemala, se puede concebir como un área de rocas fundamentalmente calizas, con elevaciones menores de 350 m (usualmente por debajo de 250 m y por debajo de 200 m en el estado de Yucatán) (Fernández *et al.*, 2012).

La península de Yucatán cuenta con una hidrografía superficial escasa (escasos ríos, en especial en este estado), con temperaturas medias anuales de entre 25 y 28 °C, precipitaciones que no exceden los 2,200 mm al año (en Yucatán hasta 1,100 mm en la parte sur y por debajo de 700 mm en la parte norte). La geología cárstica, asociada a los substratos calizos, impone sistemas de drenaje subterráneos, con las típicas formaciones de grutas y cenotes (Fernández *et al.*, 2010). La Península de Yucatán se originó por movimientos tectónicos de levantamiento que ocurrieron en el Mioceno y Plio-Pleistoceno y consta de una gran plataforma caliza de origen marino (Fernández *et al.*, 2012). La mayor parte de la superficie del estado de Yucatán, y en menor proporción en Campeche y Quintana Roo, está cubierta por selvas bajas caducifolias. Cerca de la costa se desarrolla la vegetación halófila, la duna costera, el matorral de duna costera, manglares, la marisma y los petenes. Otro tipo de vegetación bastante frecuente son las selvas bajas inundables (Pérez & Duno, 2015). Actualmente, se reconocen 2,300 especies distribuidas en 956 géneros y 161 familias como nativas o asilvestradas presentes en la península de Yucatán. La flora de esta zona tiene un considerable interés florístico ya que incluye un 5.17 % de especies endémicas. Además, parte de la diversidad florística mexicana está representada por especies que sólo crecen en la península de Yucatán que es considerada el área del país que cuenta con el mayor número de especies sólo compartidas con las Antillas (Fernández *et al.*, 2012).

2.2 VEGETACIÓN MELÍFERA Y POLINÍFERA DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

La península de Yucatán se ha caracterizado por su flora diversa, lo cual se debe a las condiciones climáticas y topográficas de la región que permiten una amplia distribución y

densidad de plantas. El néctar y el polen son dos de las recompensas que las plantas ofrecen a los polinizadores. A este tipo de vegetación se le denomina flora néctar-polinífera y se clasifican en nectaríferas (las que secretan el néctar que será recolectado y transformado por las abejas en miel), poliníferas (plantas con poco néctar, pero mucho polen), nectaríferas-poliníferas; y otras plantas que secretan resinas utilizadas por las abejas para la producción de propóleos (Villanueva, 2002; Flores, 2010; INEGI, 2012).

Villanueva y colaboradores en 2005 mencionan a las plantas nectaríferas y poliníferas de importancia para el crecimiento de la abeja sin aguijón *M. beecheii* entre estas plantas podemos mencionar al chaca (*Bursera simaruba*), el tzitzilché (*Gymnopodium floribundum*), já'abín (*Piscidia piscipula*) y tsalam (*Lysiloma latisiliquum*). Algunas hierbas y arbustos como el tajonal (*Viguiera dentata*), xtabentún (*Turbina corymbosa*), silclimuch (*Solanum lanceifolium*), susub yuk (*Croton campechianus*), sak kaatsim (*Mimosa bahamensis*) y la vergonzosa o x-wene xiw (*Mimosa pudica*) que han sido reportadas como importantes fuentes alimenticias para la abeja *M. beecheii*.

A continuación, en la Tabla 2.1 se enlistan los principales recursos nectaríferos y poliníferos de la *M. beecheii* en la península de Yucatán.

Tabla 2.1. Principales plantas nectaríferas y poliníferas de la abeja Xunan kab (*M. beecheii*) en la península de Yucatán; las especies están enlistadas en orden decreciente de importancia.

No.	Nombre Común	Nombre Científico	Familia	Forma de vida	Recurso que proveen
1	Tzitzilché	<i>Gymnopodium floribundum</i>	Polygonaceae	Árbol	Néctar y polen
2	Chechem	<i>Metopium brownei</i>	Anacardiaceae	Árbol	Néctar y polen
3	Chaka, Chak chakaj	<i>Bursera simaruba</i>	Burseraceae	Árbol	Néctar y polen
4	Tajonal	<i>Viguiera dentada var. helianthoides</i>	Asteraceae (Compositae)	Hierba	Néctar y polen
5	X-k'an lol, Ek k'ixil	<i>Cydista potosina</i>	Bignoniaceae	Bejuco	Néctar y polen
6	Xtabentún, Campanilla	<i>Turbina corymbosa</i>	Convolvulaceae	Hierba	Néctar
7	Flor de San Diego, Campanilla, chak loolmakal	<i>Antigonon leptopus</i>	Polygonaceae	Bejuco	Néctar
8	Ja'abin	<i>Piscidia piscipula</i>	Fabaceae (Leguminosae)	Árbol	Néctar
9	Botoncillo, Tabche'	<i>Conocarpus erectus</i>	Combretaceae	Árbol	Néctar
10	Guayabillo, X-pichi' che	<i>Psidium sartorianum</i>	Myrtaceae	Árbol	Polen
11	Tsalam, Boox tsalam	<i>Lysiloma latisiliquum</i>	Fabaceae (Leguminosae)	Árbol	Néctar y polen
12	Ya axnik	<i>Vitex gaumeri</i>	Verbenaceae	Árbol	Néctar y polen
13	Pixoy, guacima	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Sterculiaceae	Árbol	Néctar
14	Pichi che, Sak loob	<i>Eugenia buxifolia</i>	Myrtaceae	Árbol	Néctar y polen
15	Ich juju, kiis yuuk	<i>Eugenia axillaris</i>	Myrtaceae	Árbol	Néctar y polen
16	Silclimuch	<i>Solanum lanceifolium</i>	Solanaceae	Hierba	Polen
17	Ts'iuhe'	<i>Pithecellobium dulce</i>	Fabaceae (Leguminosae)	Árbol, arbusto	Néctar y polen
18	Susub yuk	<i>Croton campechianus</i>	Euphorbiaceae	Arbusto	Néctar y polen
19	Almendro	<i>Terminalia catappa</i>	Combretaceae	Árbol	Néctar y polen
20	Ya'ax che'	<i>Ceiba pentandra</i>	Bombaceae	Árbol	Polen

21	Siricote	<i>Cordia dodecandra</i>	Boraginaceae	Árbol	Néctar y polen
22	K'atal oox, Corazón azul	<i>Swartzia cubensis</i>	Fabaceae (Leguminosae)	Árbol	Néctar y polen
23	Sak mul, Sak pok' tees, Box pool	<i>Alternanthera ramo-sissima</i>	Amaranthaceae	Hierba	Polen
24	Cocotero	<i>Cocos nucifera</i>	Arecaceae (Palmae)	Árbol	Néctar y polen
25	Katsin eek'	<i>Pithecellobium keyense</i>	Fabaceae (Leguminosae)	Árbol	Néctar
26	X-koke, Santa Maria, X- kojkan ak'	<i>Smilax spinosa</i>	Smilacaceae	Arbusto	Néctar y polen
27	Subinche', Granadillo	<i>Platymiscium yucatanum</i>	Fabaceae (Leguminosae)	Árbol	Néctar
28	Balché'	<i>Lonchocarpus longistylus</i>	Fabaceae (Leguminosae)	Árbol	Néctar y polen
29	Chiit, palma	<i>Thrinax radiata</i>	Arecaceae (Palmae)	Árbol	Polen
30	K'anchunuup	<i>Thouinia canesceras</i>	Sapindaceae	Árbol	Néctar
31	Chém pe'ek, X-ch'emak'	<i>Serjania yucatanensis</i>	Sapindaceae	Hierba	Néctar
32	Boob, Sak Boob, Boobchi'ich'	<i>Coccoloba cozumelensis</i>	Polygonaceae	Árbol	Néctar
33	Vergonzosa, X-wene xiw, X-mu'uts	<i>Mimosa pudica</i>	Fabaceae (Leguminosae)	Hierba	Polen
34	Sak-kaatsim	<i>Mimosa bahamensis</i>	Fabaceae (Leguminosae)	Árbol, arbusto	Polen

(Roldán, 1985; Villanueva & Ucán, 2003; Villanueva *et al.*, 2005).

2.3 LA ABEJA

Existen aproximadamente 20,000 especies de abejas en el mundo. Si bien, las diversas especies varían en tamaño, forma y estilo de vida, la característica común a todas ellas es su dependencia de las flores para abastecimiento de energía (néctar) y proteína (polen) (Acereto & Euán, sf). Las abejas son insectos del orden de los *Hymenopteros* son “insectos sociales”, viven en grandes sociedades llamadas colonias perfectamente organizadas, pueden estar constituidas por alrededor de 40,000 individuos y que se reparten de forma muy ordenada la comida y el trabajo. En cada colonia hay tres tipos de individuos: reina, abejas obreras y

zánganos, donde cada individuo realiza una función determinada de acuerdo a su edad y desarrollo físico (Herrero, 2004).

2.4 LOS MELIPONINOS EN YUCATÁN

Los meliponinos (tribu Meliponini) son abejas que, a diferencia de la mayoría de las especies que se conocen, viven en colonias permanentes con una reina y varias docenas o miles de obreras. Son abejas altamente sociales y su característica más importante es la carencia de aguijón funcional. Actualmente se conocen alrededor de 400 especies de abejas sin aguijón, las cuales se ubican en unos 50 géneros. En México se reporta la existencia de al menos 46 especies, de las cuales 17 se localizan en la península de Yucatán (Tabla 2.2). Su distribución se limita a las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Aparentemente, la reducida capacidad para regular la temperatura de sus nidos ha restringido la colonización de áreas templadas. La península de Yucatán corresponde a la provincia fisiográfica denominada planicie costera del Golfo de México y se caracteriza por ser una superficie sensiblemente plana, su uniformidad y características climáticas le permiten ser el sitio de mayor concentración de meliponicultura tradicional (Acereto, 2012). Algunas de las especies de abejas sin aguijón que habitan en la península de Yucatán son de amplia distribución en el país, como *M. beecheii*, *Plebeia frontalis*, *Nannotrigona perilampoides*, *Trigona nigra*, *Trigona fulviventris* y *Trigonisca pipioli*. Las demás especies de abejas sin aguijón que se registran en Yucatán son de distribución tropical menos amplia comparada con las anteriores: *Cephalotrigona zexmeniae*, *Lestrimelitta niitkib* (es la única especie cleptobiótica en nuestra región), *Partamona orizabaensis*, *Plebeia moureana* (Acereto & Euán, sf). Las abejas sin aguijón representan “salud ambiental” para los ecosistemas donde habitan y equilibrio en la medida que participan activamente en los procesos de polinización de la mayoría de las plantas con flores. Además, estas abejas son el soporte de la cadena alimentaria que le da sentido al complejo y frágil equilibrio de la vida en selvas y bosques tropicales y subtropicales (Acereto, 2012).

Tabla 2.2. Especies de abejas sin aguijón de la península de Yucatán.

Especie	Nombre Maya
<i>M. beecheii</i> Bennett	Xunaan-Kab
<i>M. yucatanica</i>	Tsets
<i>Cephalotrigona zexmeniae</i>	Tajkab, Ejool
<i>Lestrimelitta niitkib</i>	Niitkib, Limón kab
<i>Partamona bilineata</i>	Chooch, Xnuk
<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	Kantsak
<i>Nannotrigona Perilampoides</i>	Mehenbol, Bol
<i>Trigona (Frieseomelitta) nigra nigra</i>	Sak Xik, Xic
<i>T. (Trigona) fulviventris</i>	Muul Kab
<i>T. (Trigona) fuscipennis</i>	Kuris-Kab
<i>T. (Trigona) corvina</i>	Kuris kab
<i>Plebeia (Plebeia) frontalis</i>	Us kab, Yaaxich
<i>P. (Plebeia) moureana</i>	Us kab, Yaaxich
<i>P. (Plebeia) parkeri</i>	Us kab, Yaaxich
<i>P. (Plebeia) pulchra</i>	Us kab, Yaaxich
<i>T. (Trigonisca) maya</i>	Puup, Chachem
<i>T. (Trigonisca) pipioli</i>	Puup, Chachem

2.5 *Melipona beecheii* Y SU IMPORTANCIA EN YUCATÁN

Desde tiempos inmemorables, los grupos mayas de Yucatán se desarrollaron exitosamente en el arte de criar abejas. La abeja *M. beecheii* es la única especie que ellos domesticaron; pertenece a la familia Meliponinae o meliponinos, y se trata de un insecto sin aguijón, conocido como "xunan kab" (en lengua maya). Estas abejas hacen sus nidos en troncos huecos de árboles llamados "jobones" y se desarrollan en el área de Centroamérica y México. En nuestro país se concentran principalmente en la península de Yucatán, y en una escala poco significativa en Puebla y Veracruz, donde algunos grupos indígenas también practican la meliponicultura (Nieto, 2005).

M. beecheii se describe como una abeja robusta, parecida a *Apis mellifera*, de talla grande de aproximadamente 9.7 a 10.7 mm de largo, de color negro en la mayor parte del cuerpo y anaranjado, con franjas amarillas en el abdomen; mechones muy densos de pelos anaranjado-rojizos, patas de color negro, alas transparentes menor que la longitud del abdomen, se

destacan por ser excelentes polinizadores de la flora nativa, ayudando así a la producción de frutos y semillas y a la conservación de la vegetación (Guzmán *et al.*, 2011).

2.6 LOS PRODUCTOS DE LA COLMENA

Las abejas producen una gama muy variada de productos necesarios para su supervivencia y que el hombre ha sabido monopolizar para su propio beneficio. Todos los productos tienen un beneficio económico, alimenticio y medicinal para el ser humano (Manual básico de apícola, SAGARPA, 2014).

2.7 LA MIEL

Sustancia azucarada producida a partir del néctar que las abejas recogen de las flores. Es el alimento básico y la fuente de energía necesaria para desarrollar todas las actividades de la colonia.

2.8 LA CERA

Es producido por las glándulas cereras de las abejas entre sus 13-18 días de edad. Se utiliza para construir los panales sobre los cuales la reina pondrá los huevos, las obreras almacenarán miel y polen, y sellar las celdillas. Las abejas necesitan de 6 - 7 Kg de miel para producir 1 Kg de cera. El hombre utiliza la cera para hacer velas, aceites y artesanías en general.

2.9 EL PROPÓLEO

Es un conjunto de resinas que las abejas recogen del tronco de algunos árboles. Es un producto muy importante para la colmena, ya que a través de él se asegura el calor y se mantiene una perfecta higiene. En algunos países se utilizan extractos de propóleo en el campo de la medicina como cicatrizante, bactericida y fungicida.

2.10 EL POLEN DE LA COLMENA

Se define como el elemento masculino de las flores, recogido por las abejas obreras depositado en la colmena y aglutinado en granos y mezcladas con sustancias elaboradas por las mismas abejas (Codex alimentario argentino).

2.11 EL POLEN DE LAS FLORES

Es el elemento masculino de la flor. Aunque el polen por sí solo no es un producto elaborado por las abejas, es de suma importancia para el crecimiento y la reproducción, ya que, gracias

a él, las abejas obtienen los elementos necesarios para formar sus músculos, órganos vitales, alas, pelos y reponer los tejidos desgastados. Es rico en proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. Sin embargo, la recolección de polen por parte de las abejas es un proceso más complejo de lo que se piensa, transformando este recurso al adicionar otras sustancias y secreciones propias, llevándolo a ser un producto peculiar del comportamiento de la abeja (SAGARPA, 2014).

2.12 PRODUCTOS NATURALES Y METABOLITOS SECUNDARIOS

Los productos naturales son compuestos orgánicos sintetizados por los organismos vivos con múltiples propósitos, entre ellos el de la supervivencia. Todos los organismos poseen la capacidad de transformar e interconvertir un diverso grupo de compuestos orgánicos e inorgánicos con el fin de utilizarlos como fuente de energía y como moléculas de construcción para estructuras celulares. Los compuestos cuya presencia es ubicua en todos los organismos y juegan un papel central en el metabolismo y reproducción son conocidos como metabolitos primarios, comprendidos por aminoácidos, ácidos grasos, nucleósidos y carbohidratos (Hanson, 2003; Morrissey, 2009). Mientras que el papel de los metabolitos primarios para la supervivencia de las especies es evidente, la razón por la cual la presencia de ciertos compuestos sin un papel aparente en la economía interna de los organismos no está del todo clara. Estas pequeñas moléculas de composición orgánica con una diversidad estructural y con una distribución taxonómicamente limitada entre las especies son los metabolitos secundarios, los cuales se consideran capaces de proporcionar ventajas en la supervivencia de los organismos que los sintetizan (Alday Noriega, 2012).

Los organismos que no poseen un sistema inmunológico como las plantas, hongos, algas o microorganismos generalmente muestran una alta abundancia en estos compuestos. El término productos naturales es usualmente empleado de manera intercambiable con el concepto de metabolitos secundarios, los cuales han atraído el interés debido a sus efectos biológicos en otros organismos (Hanson, 2003). Existen varios programas para la detección de metabolitos bioactivos en múltiples especies, los cuales han permitido el desarrollo de nuevos fármacos, como el taxol, compuesto ampliamente utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer (Boik, 2001). Los productos naturales muy frecuentemente tienen un papel ecológico en la regulación de las interacciones entre plantas, microorganismos,

insectos y animales. Éstos pueden ser sustancias empleadas para defensa, con la finalidad de ahuyentar a los organismos predadores, o para favorecer la reproducción y distribución de la especie por medio de la atracción de insectos polinizadores, también estas moléculas biológicas juegan un papel en la comunicación química actuando como feromonas (Morrissey, 2009). Aunque algunos metabolitos secundarios se encuentran en animales, la gran mayoría de los productos naturales de interés son de origen vegetal (Ringuelet & Viña, 2013).

Los productos naturales han sido utilizados desde la prehistoria para múltiples funciones como extractos de plantas y algunas recetas medievales se siguen utilizando en la actualidad. Su uso va desde medicinas para aliviar el dolor o los síntomas de diversas enfermedades, hasta venenos para la caza, agentes para la eutanasia y la aplicación de la pena capital, narcóticos, alucinógenos, estimulantes, perfumes y ambientadores, especias, etc. Algunos ejemplos representativos se indican en la Figura 2.1 (Claramunt *et al.*, 2013).

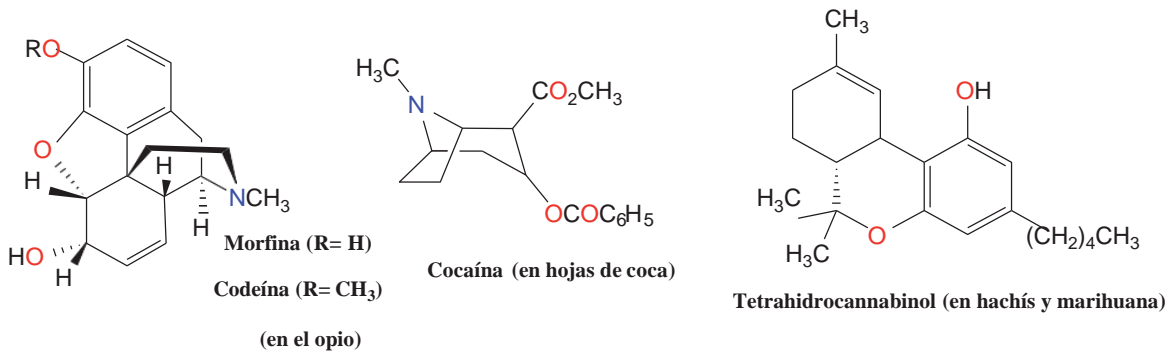
Las estructuras de los metabolitos secundarios pueden parecer desconcertantemente diversas. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos pertenecen a una de varias familias, cada una de las cuales tiene características estructurales particulares que surgen de la forma en que se construyen en la naturaleza, es decir, de su biosíntesis. Las clases de metabolitos secundarios son:

- Policétidos y ácidos grasos
- Terpenoides y esteroides
- Fenilpropanoides
- Alcaloides
- Carbohidratos y péptidos especializados

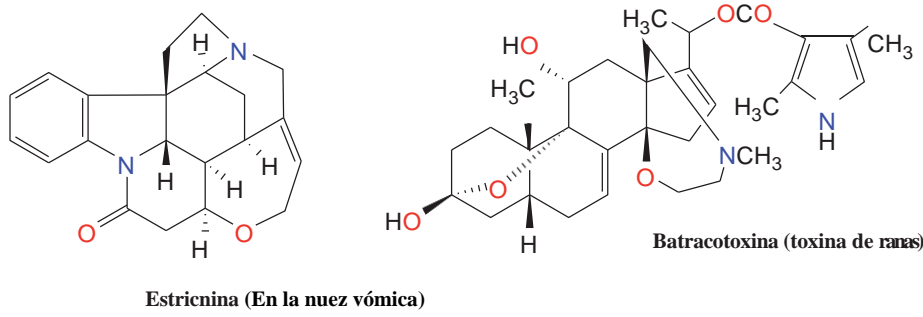
En cuanto a sus características, los policétidos están formados por la condensación lineal de unidades de acetato, las cuales son derivadas de Acetil-Coenzima A. Los terpenoides y esteroides son ensamblados en la naturaleza a partir de isoprenoides derivados de isopentenil pirofosfato, compuesto de 5 carbonos que se enlazan a manera de cabeza-cola y tienen una estructura ramificada característica (Hanson, 2003; Morrissey, 2009). Los fenilpropanoides

son compuestos aromáticos que poseen una cadena de tres carbonos unida al anillo, y éstos son los precursores de los flavonoides.

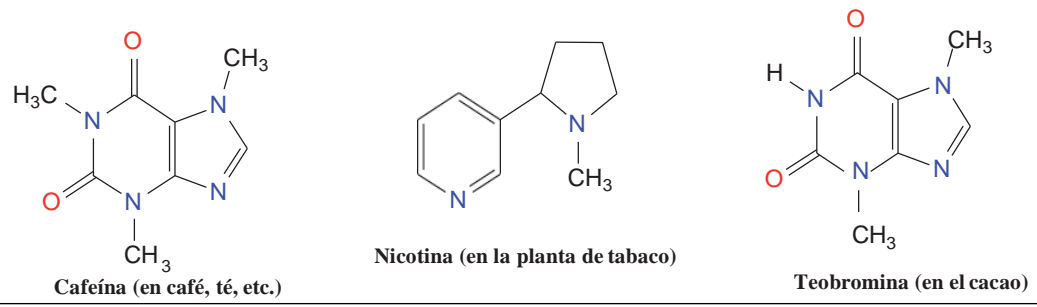
Narcóticos y alucinógenos



Venenos



Estimulantes



Medicamentos

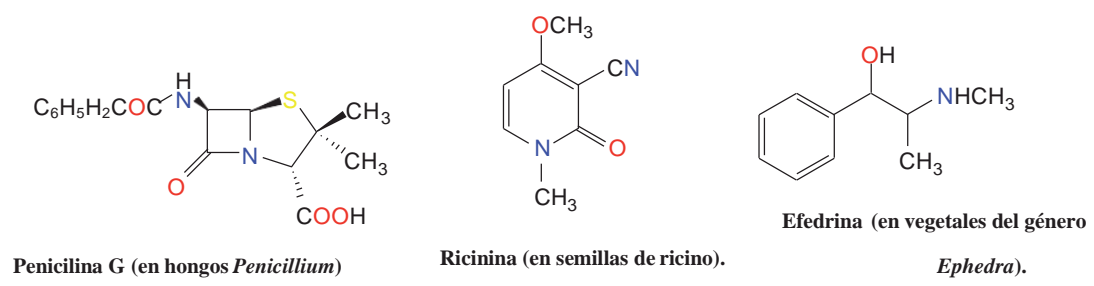


Figura 2.1 Ejemplos representativos de productos naturales.

Los aminoácidos son los monómeros de construcción para péptidos y proteínas, sin embargo, existen aminoácidos inusuales restringidos a ciertas especies, estos aminoácidos dan lugar a la formación de compuestos con actividades biológicas relevantes como la penicilina, un agente antimicrobiano. Los alcaloides son un grupo diverso de productos naturales que contienen nitrógeno. Las porciones nitrogenadas de los alcaloides están derivadas de aminoácidos como ornitina, lisina, tirosina y triptófano. Aunque los carbohidratos como la glucosa son metabolitos primarios típicos, existen otros carbohidratos con distribución restringida en ciertas especies, algunos de estos carbohidratos poco comunes están unidos a otros productos naturales como parte glucósida. La porción que no es carbohidrato en la molécula es conocida como aglicona, y puede ser un terpenoide, alcaloide o policétido (Boik, 2001; Hanson, 2003; Morrissey, 2009 & Alday, 2012).

2.13 EL POLEN DE LA COLMENA

El polen de abeja es un alimento producido de la fermentación láctica del polen de las flores que las abejas colectan, es una fuente principal de nutrientes y alta proteína (Chmielewski, 2003), y sirve para el desarrollo y mantenimiento de la colonia. Las abejas transportan las cargas de polen adheridas a sus patas, específicamente a la canasta de polen (corbículas) (Pereira *et al.*, 2013) y, una vez en la colmena, almacenan las cargas de polen dentro de los alvéolos para su posterior consumo. Las abejas visitan alrededor de 200 flores para producir una carga de polen de abeja, recolectan cientos e incluso miles de granos de polen y usan secreciones salivales, néctar y / o miel para aglutinarlos, formando cargas que generalmente varían entre 1.4 y 4 mm de tamaño (Brazil, 2001; Campos *et al.*, 2008; Saavedra *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 1997; Bogdanov, 2012; Komosinska *et al.*, 2015). Esta mezcla se somete a diferentes procesos químicos debido a la acción de diferentes enzimas, microorganismos, humedad y temperatura (35-36 °C) y después de 2 semanas se llama pan de abeja o polen de abeja. El polen de abeja es la principal fuente de proteínas, lípidos, microelementos y vitaminas, y es el alimento más nutritivo para las abejas. La composición del polen de abeja difiere ligeramente de la del polen colectado de las flores, esto se debe a que posee mayor acidez debido a la presencia de ácido láctico y una mayor cantidad de vitamina K (Nagai *et al.*, 2004). El polen de abeja es rico en flavonoides y otros compuestos saludables y constituye una fuente natural de antioxidantes tales como ácidos fenólicos y flavonoides, que son responsables de su actividad biológica. Se sabe que los flavonoides poseen varios efectos

sobre la salud, como propiedades antialérgicas, antioxidantes y antiinflamatorias (Denisow & Denisow, 2016).



Figura 2.2. Polen de abeja *M. beecheii*.

2.14 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL POLEN DE ABEJA

La composición química del polen de abeja varía significativamente, de acuerdo con el origen botánico y geográfico de los granos de polen que componen las cargas de polen. La composición de los granos, a su vez, sufre la influencia del suelo y las condiciones climáticas, la edad y el estado nutricional de la planta durante el desarrollo del grano. En la misma especie de planta puede haber variaciones en la composición del polen según la región, la estación del año e incluso entre años (Funari *et al.*, 2003; Almeida, *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009; Silveira, 2012). Los principales componentes del polen de abeja incluyen proteínas (5-60 %), aminoácidos esenciales, azúcares reductores (1-55 %), lípidos (4-7 %), ácidos nucleicos (especialmente ARN) y fibra bruta (0.3-20 %). Los componentes menores son minerales como Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, vitaminas como la provitamina A (β -caroteno), vitamina E (tocoferol), niacina, tiamina, biotina y ácido fólico, enzimas o coenzimas. Incluyen sustancias bioactivas importantes como los ácidos grasos insaturados/saturados (1-10 %), fosfolípidos (1.5 %), fitosteroles (1.1 %) y terpenos. Además, los polifenoles, principalmente flavonoides (3-8 %) son relevantes. En el grupo de flavonoides, las catequinas, kaempferol, quercetina e isorhamnetina son los más frecuentes. El polen de abeja también es rico en pigmentos orgánicos de carotenoides como el licopeno y la zeaxantina (Denisow & Denisow, 2016).

2.15 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL POLEN DE ABEJA

Los beneficios para la salud asociados con el polen de abeja están relacionados con la presencia de compuestos con potencial biológico para inhibir el crecimiento de microorganismos y ayudar en la prevención del estrés oxidativo, identificado como una de las causas del desarrollo de enfermedades degenerativas crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y degeneración neuronal (Uttara *et al.*, 2009 y Álvarez, 2017).

2.15.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL POLEN DE ABEJA

Los antibacterianos se pueden definir como compuestos que, a bajas concentraciones, son capaces de inhibir selectivamente el desarrollo de bacterias o desactivarlas (Cunha & Roque, 2009). El polen de abeja contiene compuestos que inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La actividad varía según el potencial de los compuestos presentes en cada producto (Morais *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2012; Cabrera & Montenegro, 2013; Fatrcová *et al.*, 2013). Las sustancias responsables de la capacidad antibacteriana de este alimento actúan desactivando las enzimas, promoviendo alteraciones en la permeabilidad de las membranas y la pérdida de material celular o, además, desactivando o destruyendo el material genético de las células bacterianas (Borguini, 2006).

Los compuestos fenólicos son los principales agentes antibacterianos del polen de abeja (Carpes *et al.*, 2008), pero no son los únicos, los ácidos grasos y los derivados de espermidina, una poliamina, también tienen un potencial antibacteriano considerable y se han identificado en el polen de abeja (Melo, 2015; Barbosa *et al.*, 2006).

En el polen de abeja brasileño, hubo una correlación positiva entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la inhibición del crecimiento bacteriano Gram-negativo y Gram-positivo (Melo, 2015). Hasta donde se puede ver, la acción no está relacionada con la totalidad, sino con compuestos fenólicos específicos (Campos *et al.*, 2008; Carpes *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2011; Pascoal *et al.*, 2014; Melo, 2015). Graikou y colaboradores en 2011 probaron la acción de flavonoides aislados de extractos de polen de abeja a través de cromatografía líquida de alta eficiencia. Los flavonoides ejercieron una fuerte actividad contra las bacterias Gram-positivas, lo que llevó a los autores a asociar una parte significativa de esta acción a la presencia de estos metabolitos.

2.15.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL POLEN DE ABEJA

El polen de abeja contiene compuestos de gran capacidad antioxidante en cantidades variables. El potencial de este producto es mayor que el que se encuentra en la miel (Morais *et al.*, 2011), y similar al que se encuentra en las frutas rojas, que se reconocen como alimentos con una elevada capacidad antioxidante (Sousa *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012).

Los compuestos fenólicos, especialmente los ácidos fenólicos y los flavonoides, parecen ser los principales agentes de la capacidad antioxidante del polen de abeja (Campos *et al.*, 2003; Carpes *et al.*, 2008; LeBlanc *et al.*, 2009; Mărghitas *et al.*, 2009; Negri *et al.*, 2011; Freire *et al.*, 2012). Estas sustancias son capaces de donar átomos de hidrógeno a las especies reactivas, por lo que son estables (Angelo & Jorge, 2007). Campos y colaboradores en 2003 evaluaron extractos etanólicos del polen de abeja de *Eucalyptus globulus* y descubrieron que la fracción fenólica era la más activa, aunque no representaba sólo la acción total. Otros antioxidantes, como el β -caroteno (provitamina A) y las vitaminas E y C, son responsables de parte de la acción antioxidante del polen de abeja (Campos *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2009). El tipo y contenido de cada antioxidante está asociado con su origen botánico (Carpes *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2008; Melo, 2015). Incluso se produce variación entre el polen de abeja monofloral de la misma especie botánica (Melo, 2015), lo que indica que las diferencias agrícolas o genotípicas, las condiciones climáticas, como la temperatura, el estrés hidrológico y la intensidad de la luz, así como las condiciones del suelo, pueden afectar la composición del grano de polen por la planta (Daoud *et al.*, 2015).

2.16 METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN EL POLEN DE ABEJA

2.16.1 POLIFENOLES

Son compuestos que presentan más de un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos bencénicos (Ringuelet & Viña, 2013). Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos polifenoles son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales, otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos. La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos. Existen

varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos (Quiñones *et al.*, 2012). De acuerdo con su estructura, los compuestos polifenólicos en el polen de abeja pueden diferenciarse en flavonoides y ácidos fenólicos y su contenido asciende a 3 % - 5 % (Rzepecka *et al.*, 2015).

2.16.2 LOS ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos son componentes bioactivos del polen de abeja con estructuras y propiedades variadas y su contenido asciende en promedio a 0.19 %. Sus moléculas contienen un anillo aromático y un grupo carboxilo y entre ellos, podemos diferenciar ácidos benzoicos (1), ácidos fenilacéticos (2) y ácidos cinámicos (3) (Figura 2.3).

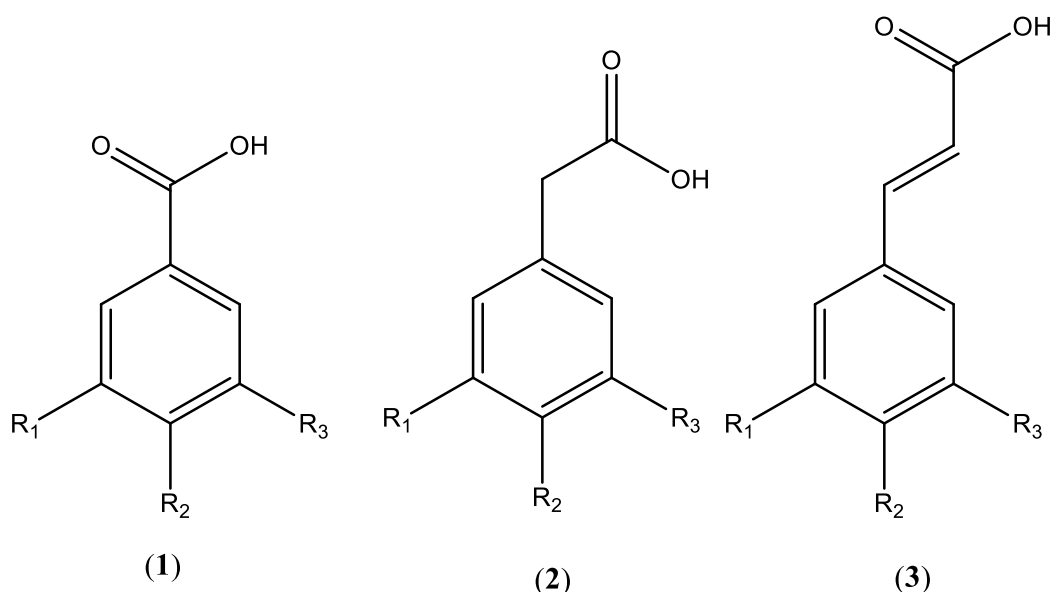
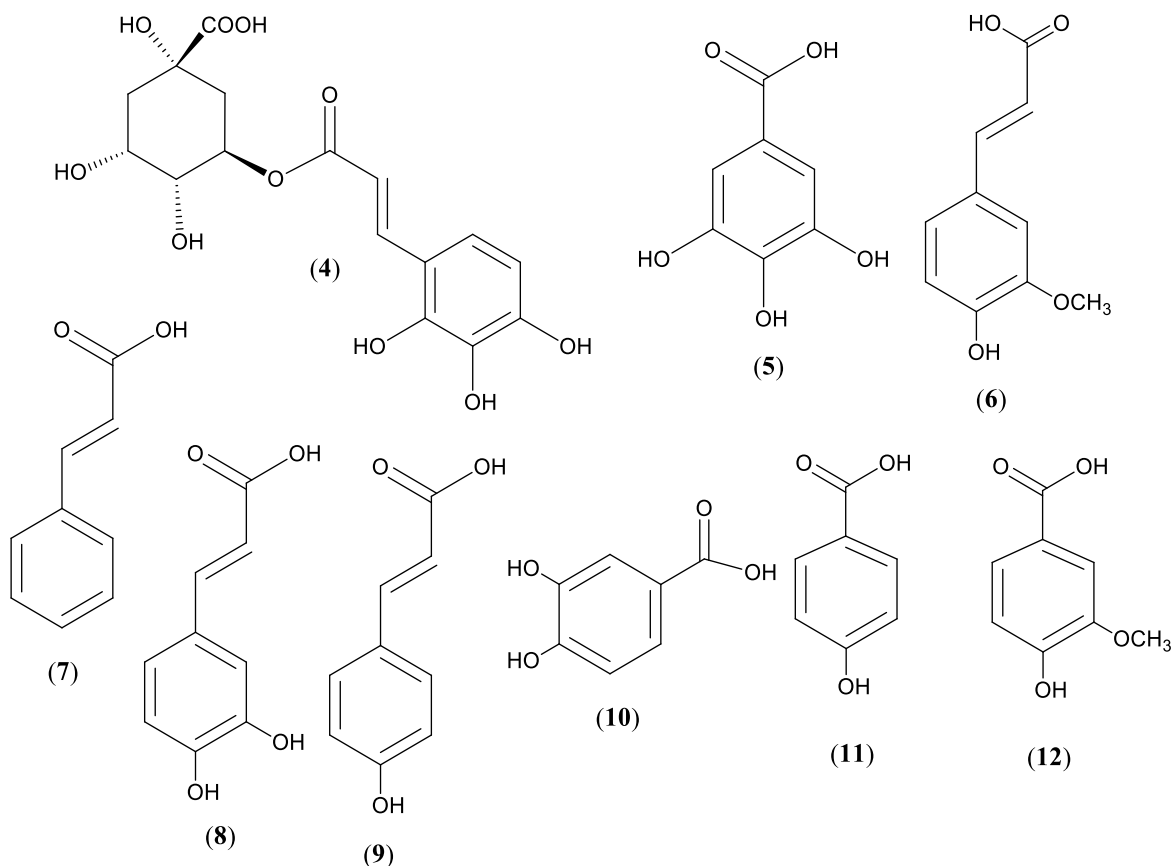


Figura 2.3 Estructuras básicas de ácidos fenólicos.

Los ácidos fenólicos más comunes en el polen de abeja son el ácido clorogénico (4), gálico (5), ferúlico (6), cinámico (7) y cafeico (8), así como el ácido hidroxicinámico (9). Además en el polen de abeja, se han determinado fenilpropanoides y derivados del ácido benzoico: ácido 3,4-dihidroxibenzoico (10), ácido 4-hidroxibenzoico (11) y el ácido vanílico (12) (Rzepecka *et al.*, 2015).



2.16.3 LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal (Quiñones *et al.*, 2012). Los flavonoides constituyen el grupo más importante de compuestos entre los polifenoles presentes en el polen de abeja. La estructura química de los flavonoides se caracteriza por la presencia de un sistema de anillo difenilpropano (C6-C3-C6) con un esqueleto benzo- γ -pirona (Figura 2.4) (Rzepecka *et al.*, 2015). Los flavonoides están formados por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos, y el anillo B junto con la unidad C3 proceden de la ruta del ácido shikímico (Figura 2.5). Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y son por lo tanto estructuras polifenólicas, de bajo peso molecular (Quiñones *et al.*, 2012). Los flavonoides están presentes en el polen de abeja principalmente en forma de glicósidos, es decir moléculas con un grupo azúcar (Rzepecka *et al.*, 2015).

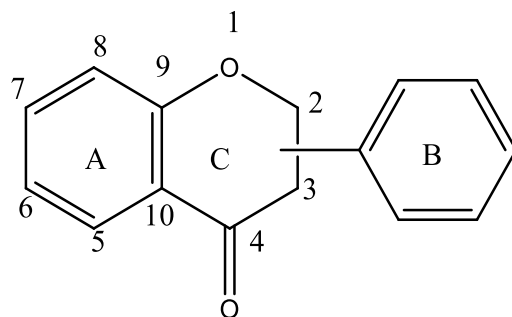
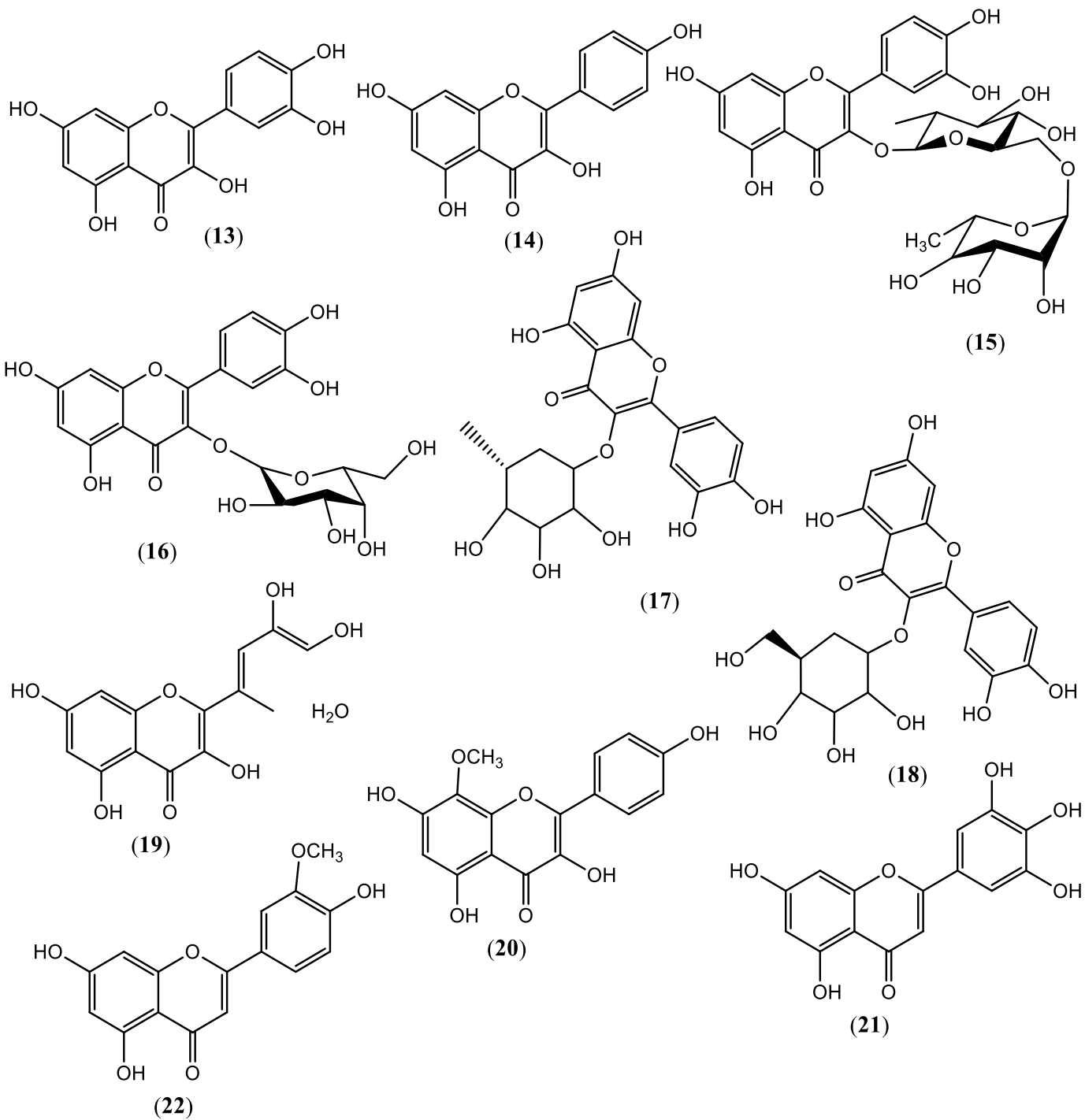
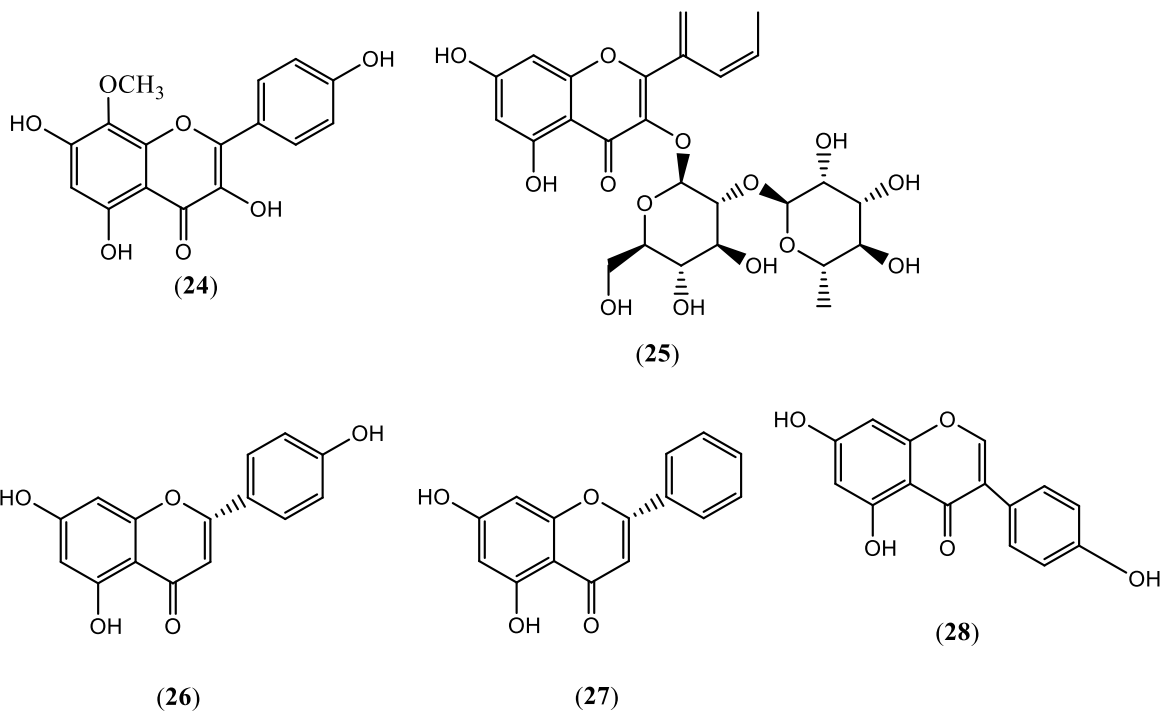


Figura 2.4. Estructura básica del esqueleto flavonólico.

En el polen de abeja se han reportado varios compuestos fenólicos de tipo flavonoide, como quercetina (**13**), kaempferol (**14**), así como algunos glicósidos incluyendo la rutina (rutósido) (**15**), el hiperósido (**16**), la quercetina (**17**), la isoquercetina (**18**). Por otra parte, se han aislado miricetina (**19**) y sus glicósidos, entre ellos la 8-metoxiherbacetina (**20**), tricetina (**21**), isorhamnetina (**22**) y galangina (**23**). Otros flavonoides menos comunes encontrados en el polen de abeja incluyen la 8-metoxikaempferol (**24**) y kaempferol 3-neohesperósido (**25**). Adicionalmente se han aislado flavonoides como naringenina (**26**), pinocembrina (**27**), genisteína (**28**) y algunas leucoantocianidinas y catequinas (Rzepecka *et al.*, 2015).





2.16.4 LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS

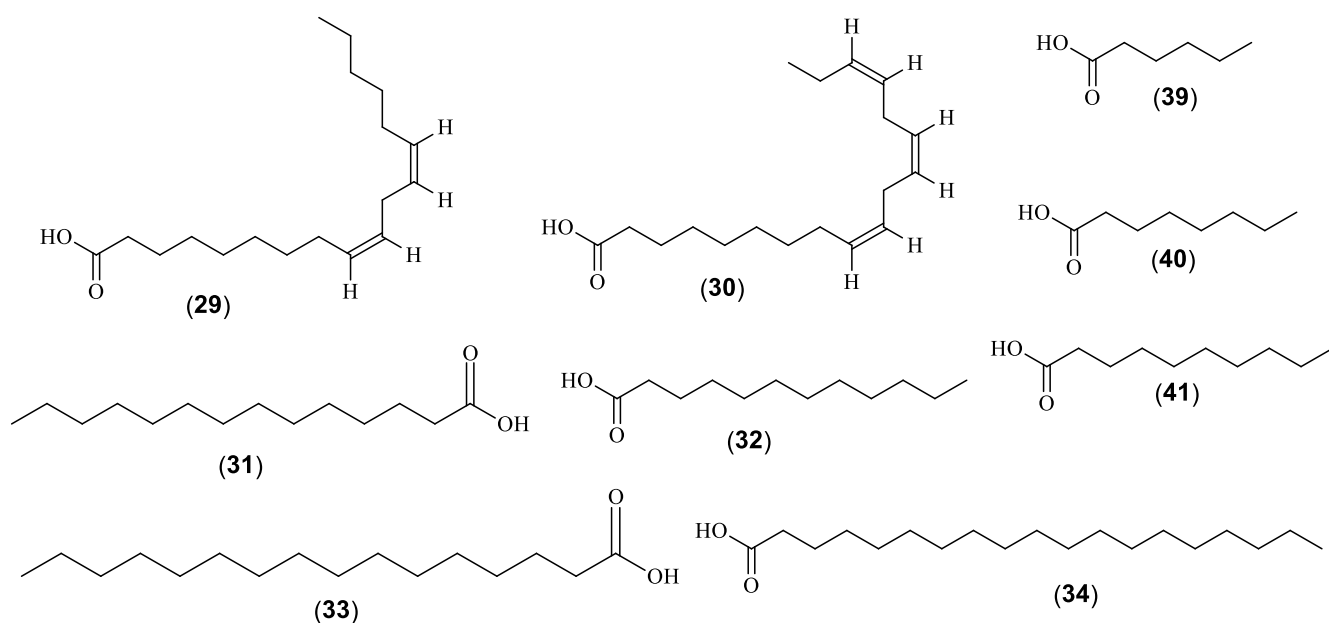
El polen de abeja contiene niveles variables de ácidos grasos presentes en la fracción lipídica. En todos los estudios consultados, se identificaron el ácido linoleico (29) y α -linolénico (30), considerados estrictamente esenciales para el organismo humano. Los ácidos grasos esenciales tienen un impacto significativo desde el punto de vista nutricional, debido a que son componentes de la membrana y juegan un papel importante en los procesos metabólicos (Perini *et al.*, 2010). Más allá de esto, la ingestión adecuada de estos compuestos ayuda en la prevención de enfermedades cardiovasculares y degenerativas, y ciertos tipos de cáncer (Calviello *et al.*, 2007; Cheatham *et al.*, 2006; Carl *et al.*, 2009). Ciertos ácidos grasos, como linoleico (29), α -linolénico (30), mirístico (31) y láurico (32), tienen propiedades bactericidas y antifúngicas (Manning, 2001; Yang *et al.*, 2013).

En las muestras recolectadas en Polonia, China y Corea del Sur, predominan los ácidos α -linolénico (30), palmítico (33) y linoleico (29), también se identificaron los ácidos mirístico (31), esteárico (34), oleico (35), araquidónico (36), bohénico (37) y lignocérico (38), todos variaron según el origen botánico. En el polen de abeja recolectado en Rumania, predominaron los ácidos α -linolénico (30), palmítico (33) y linoleico (29), además de estos,

se identificó los ácidos caproico (39), caprílico (40), cáprico (41), láurico (32), mirístico (31), esteárico (34), oleico (35), elaídico (42), araquidónico (36), 11-eicosenoico (43) y behénico (37) (Mărgăoan *et al.*, 2014). En muestras de Colombia los ácidos grasos más abundantes fueron α -linolénico (30), palmítico (33) y linoleico (29). Los otros ácidos grasos determinados fueron láurico (32), mirístico (31), esteárico (34), oleico (35) y tricosanoico (44) (Fuenmayor *et al.*, 2014). En el polen de abeja recolectado en Portugal, se cuantificaron los ácidos caprílico (40), cáprico (41), láurico (32), palmítico (33), oleico (35), araquidónico (36), linoleico (29) y α -linolénico (30), este último representa entre 26 y 57 % del total de ácidos grasos. En las muestras monoflorales de *Zea Mays* producidas en China, predominaron los ácidos α -linolénico (30) (52 %) y palmítico (33) (25 %), mientras que en las muestras del mismo origen botánico pero producidas en Egipto, predominaron los ácidos oleico (35) (42 %) y mirístico (31) (40 %) (Shawer *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 2013). En polen de abeja monofloral de *Aloe greatheadii* var. *davyana*, recolectada en Sudáfrica, los principales ácidos grasos encontrados fueron gadoleico (45) (42 %) y palmítico (33) (14 %). Además de estos, se identificaron ácidos grasos saturados incluyendo el ácido mirístico (31), esteárico (34), behénico (37) y lignocérico (46) y los ácidos grasos monoinsaturados: oleico (35) y gadoleico (45), los ácidos grasos poliinsaturados: ricinoleico (47), linoleico (29), α -linolénico (30), γ -linolénico (48), eicosadienoico (49) y timnodónico (50) (Human & Nicolson 2006). Xu y colaboradores en 2011 analizaron el polen de abeja monofloral de *Nelumbo nucifera* producido en China, en el que predominaron los ácidos palmítico (33) (45 %) y oleico (35) (19 %), se identificaron otros compuestos: mirístico (31) pentadecanoico (51), palmitoleico (52), margárico (53), esteárico (34), linoleico (29), α -linolénico (30) y behénico (37). En el polen de abeja monofloral *Cistus ladanifer* de España, los ácidos grasos predominantes fueron los ácidos oleico (35) (28 %) y palmítico (33) (12 %). También se identificaron los ácidos láurico (32), mirístico (31), miristoleico (54), palmitoleico (52), esteárico (34), linoleico (29), linolénico (30), gadoleico (45), heneicosanoico (55) y lignocérico (46) (Domínguez-Valhondo *et al.*, 2011).

Los ácidos mirístico (31) y linolénico (30) fueron los principales componentes en el polen de abeja monofloral de *Trifolium alexandrinum* y *Brassica kaber*, mientras que los ácidos mirístico (31) y oleico (35) fueron los componentes predominantes en el polen de abeja monofloral de *Melilotus siculus* de Egipto (Shawer *et al.*, 1987). En muestras monoflorales

de *Brassica campestris*, recolectadas en China, los compuestos predominantes fueron los ácidos α -linolénico (**30**) y palmítico (**33**) (Xu *et al.*, 2009). Yang y colaboradores en 2013 analizaron muestras producidas en China, identificaron que en el polen de abejas monoflorales de *Citrullus lanatus*, *Camellia japonica* y *Schisandra chinensis* predominaban los ácidos α -linolénico (**30**) y palmítico (**33**); de *Fagopyrum esculentum* y *Rosa rugosa* predominaron los ácidos α -linolénico (**30**) y oleico (**35**); de *Brassica napus* predominaron los ácidos α -linolénico (**30**) y mirístico (**31**); de *Dendranthema indicum* predominaron los ácidos oleico (**35**) y linoleico (**29**), de *Nelumbo nucifera* predominaron los ácidos palmítico (**33**) y oleico (**35**), y de *Papaver rhoeas* los ácidos α -linolénico (**30**) y oleico (**35**) fueron dominantes. En términos generales, los ácidos grasos presentes en diferentes muestras de polen de abeja son los mismos, sin embargo, la proporción de estos compuestos es variable (Álvarez, 2017).



2.17 COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN EL POLEN DE ABEJA *Melipona rufiventris*

Silva y colaboradores en 2009 realizaron la identificación de los compuestos presentes en el polen colectado por la abeja *Melipona rufiventris* (Uruçu amarela) en Brasil, en donde a partir del extracto de acetato de etilo del polen de dicha abeja se logró la identificación de ácido p-hidroxicinámico (**9**), dihidroquercetina (**56**), isorhamnetina (**22**), Isorhamnetina-3-O-(6"-*OE-p*-coumaroil)- β -D-glucopiranosido (**57**), luteolina (**58**) y quercetina (**17**) (Figura 2.6). Este trabajo representa el primer informe del aislamiento de Isorhamnetina-3-O-(6"-*OE-p*-coumaroil)- β -D-glucopiranosido (**57**) a partir del polen y a su vez es uno de los primeros en estudiar a las abejas del género *Melipona*.

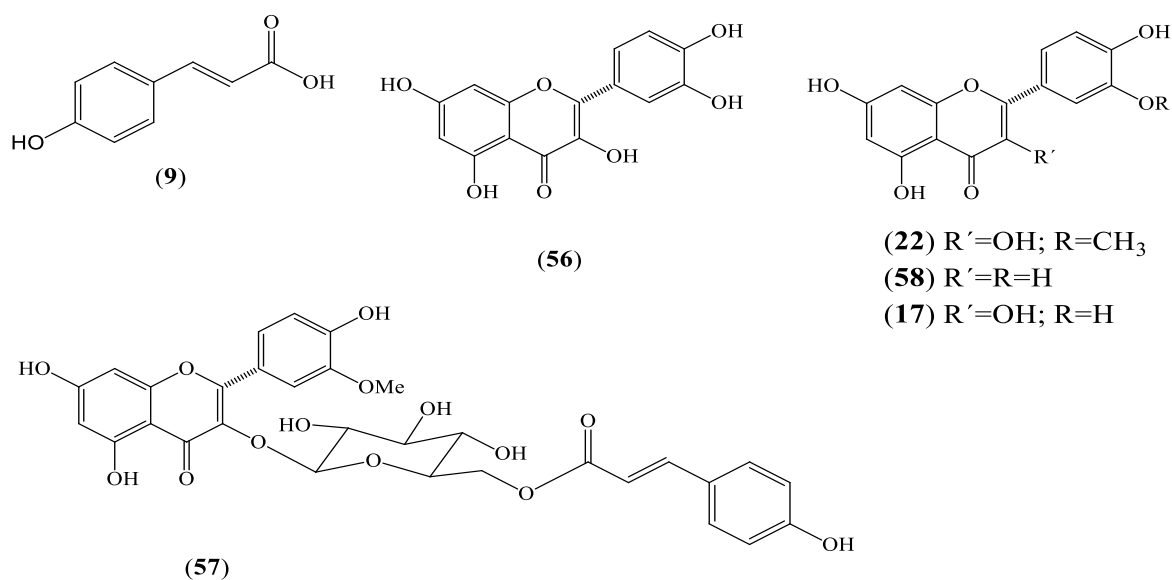


Figura 2.5 Metabolitos aislados del polen colectado por la abeja sin aguijón *Melipona rufiventris*.

2.18 JUSTIFICACIÓN

El polen de abeja es un producto de la colmena apreciado por sus propiedades antimicótica, antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, antioxidante y por su aporte nutricional. Diversos estudios han demostrado que estas propiedades del polen están relacionadas con la presencia de metabolitos secundarios con potencial biológico.

Escasos estudios de composición química se han realizado para el polen colectado por las abejas del género *Melipona*, encontrándose en la literatura solamente un trabajo en la especie *Melipona rufiventris*, en donde se reportaron principalmente flavonoides y fenilpropanoides. Dado lo anterior, en este trabajo se estudió la presencia de metabolitos secundarios en el polen colectado por la abeja *M. beecheii* colectado en el municipio de Maní, Yucatán, con la finalidad de conocer sobre su composición química y caracterización del mismo.

2.18.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar, purificar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el polen colectado por la abeja *M. beecheii*.

2.18.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Obtener el extracto metanólico crudo del polen colectado por la abeja *M. beecheii*.
- Fraccionar por partición líquido-líquido de polaridad ascendente el extracto metanólico crudo.
- Purificar los metabolitos mayoritarios presentes en el polen utilizando diversas técnicas cromatográficas.
- Identificar por métodos espectroscópicos y espectrométricos las estructuras químicas de los metabolitos aislados.
- Evaluar la composición química proximal del polen colectado por la abeja *M. beecheii*.

CAPÍTULO

III

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES

Los análisis por cromatografía en capa delgada (TLC) se llevaron a cabo utilizando placas de aluminio impregnados con sílica gel de 0.2 mm de espesor (60F₂₅₄) de la marca E.M. Merk. Las purificaciones por cromatografía líquida al vacío (VLC) y por cromatografía en columna por gravedad fueron realizadas utilizando sílica gel 60_{GF} grado TLC y sílica gel (70-230 mesh) de la marca E.M. Merk, respectivamente. Para la visualización permanente de los metabolitos, las placas se sumergieron en una solución de ácido fosfomolibdico (20 g) y sulfato cérico (2.5 g) en 500 mL de ácido sulfúrico al 5%, posteriormente, las placas se secaron y se calentaron con una pistola de aire caliente durante uno o dos minutos hasta visualizar los metabolitos presentes. Para los diferentes procesos de extracción y purificación se utilizaron disolventes de grado analítico de la marca J.T. Baker.

Los análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron en un equipo de la marca Hewlett Packard 5890 conectado a un detector másico (MSD modelo 5975) bajo las siguientes condiciones: 1 µL de muestra columna Ultra 1 (25 m x 0.2 mm d. i.), nitrógeno con flujo de 1 mL/min, temperatura inicial T₁= 100° C (3 min), temperatura final T₂= 280° C (30 min), gradiente= 10° C/min, temperatura del detector a 300° C. Los componentes fueron identificados comparando sus espectros de masa con los reportados en la literatura y por comparación de su patrón de fragmentación con la biblioteca de datos NIST05.

Para los análisis por espectroscopía de absorción molecular en el infrarrojo (IR) se utilizó un equipo con transformada de Fourier (FT IR) de la marca THERMO Scientific, modelo Nicolet Protege 8700 utilizando pastillas de bromuro de potasio (Sigma) como soporte para analizar la muestra. Se colectaron los datos haciendo 32 escaneadas, en una resolución de 4, con espaciado de datos de 1.929 cm⁻¹, en un formato de % de transmitancia, con corrección de aire y CO₂. El programa utilizado fue OMNIC versión 8.0.

3.2 OBTENCIÓN DEL POLEN COLECTADO POR LA ABEJA *M. beecheii*

La muestra de polen se obtuvo en el municipio de Maní, Yucatán (Figura 3.1), en el mes de mayo de 2018 de la manera tradicional, recogiendo el polen directamente del jobón (tronco hueco) (Figura 3.2) de modo que ésta no tuviese algún tratamiento o proceso que pueda

afectar o modificar sus propiedades y características, permitiendo mantenerlo en su estado natural. Posteriormente las muestras se guardaron en tubos estériles para evitar su contaminación y se almacenaron a temperatura ambiente (25-30° C) en obscuridad hasta su posterior análisis.

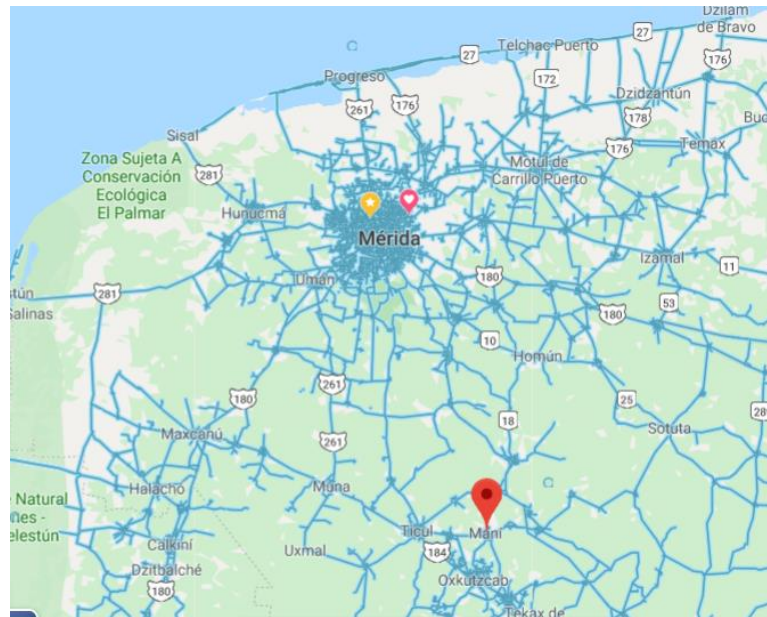


Figura 3.1 Ubicación del municipio de Maní, Yucatán.



Figura 3.2 Vista interna de un jabón (pocillos de polen y miel) de *M. beecheii*.

3.3 EVALUACIÓN PROXIMAL DEL POLEN COLECTADO POR LA ABEJA *M. beecheii*

Los análisis se realizaron de acuerdo con los métodos propuestos por (A.O.A.C, 1997). Para la determinación de cenizas, grasas y proteína las muestras de polen (1 g) fueron sometidas a remoción de humedad.

3.3.1 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

El análisis de la humedad consiste en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada hasta una masa constante en estufa de aire. Se introdujeron los crisoles a una estufa con una temperatura de 105° C hasta tener un peso constante y posteriormente se colocaron en un desecador durante 20 min hasta su enfriamiento. Los crisoles se pesaron vacíos, se depositó en ellos 1 g de muestra de polen y se introdujeron nuevamente a la estufa a 105° C hasta que la muestra quedó totalmente deshidratada. Posteriormente, las muestras se colocaron en un desecador, se pesaron y la humedad se determinó por diferencia de peso (A.O.A.C, 1997).

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \right) \times 100$$

Donde:

P_i : peso inicial de la muestra en gramos (húmeda).

P_f : peso final de la muestra en gramos (seca).

3.3.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

El principio del método consiste en la incineración de la muestra en un horno a 550 °C. La muestra previamente deshidratada se llevó a la mufla donde se mantuvo a 550 °C durante 4 h; posteriormente se colocó en el desecador por 30 min, se pesó y se realizó el cálculo correspondiente (A.O.A.C, 1997):

$$\% \text{ Cenizas} = (P_2 - P_0) \times \left(\frac{100}{P_1 - P_0} \right)$$

Donde:

P_0 : peso en gramos del crisol.

P_1 : peso en gramos del crisol conteniendo la muestra.

P2: peso en gramos del crisol y el residuo después de la incineración.

3.3.3 DETERMINACIÓN DE GRASAS

Este método consiste en la extracción de la grasa de la muestra de polen previamente deshidratada, utilizando hexano o éter de petróleo. En un cartucho de celulosa se colocó la muestra con una ligera capa de algodón en la parte superior. El cartucho con la muestra se depositó en el equipo Soxhlet y se le agregó éter de petróleo (80 mL) para su extracción, la cual consta de tres fases: inmersión, lavado y recuperación. Concluido este proceso (2 h), se procedió a retirar el cartucho y se colocó en un desecador, para que absorba la humedad residual durante media hora y finalmente se pesó.

Cálculo del porcentaje de grasa:

$$\% \text{ Grasa} = \left(\frac{B - A}{M} \right) \times 100$$

Donde:

B: peso del cartucho de celulosa + muestra (antes de introducir al equipo).

A: peso del cartucho de celulosa + muestra (después de introducirla al equipo).

M: peso de la muestra deshidratada

3.3.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA (NITRÓGENO)

En esta técnica la muestra se disuelve en ácido sulfúrico concentrado y se utiliza CuSO_4 como catalizador. La mezcla se calienta con la finalidad de que la materia carbonosa se libere en forma de CO_2 , los minerales se sulfaten y el nitrógeno se transforme en sulfato de amonio. La digestión finaliza cuando la solución se torna de un color verde-esmeralda. En este proceso de digestión se libera la grasa, fibra, carbohidratos presentes en la muestra en forma de CO_2 ; la parte oxigenada de la proteína también se libera quedando únicamente la parte nitrogenada de la proteína.

Digestión: consistió en secar 1 g de muestra de polen y depositarlo en un tubo para digestión de 300 mL, adicionado con 10 mL de H_2SO_4 y una pastilla de kjeltab, posteriormente los tubos fueron colocados en el digestor a $380 \pm 20^\circ \text{C}$ durante 90 min aproximadamente, hasta que la mezcla alcanzó un color verde esmeralda claro.

Destilación: posterior a la digestión, los tubos se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. En un matraz Erlenmeyer, se agregó 5 mL de solución de H_3BO_3 al 4% con indicador y se colocó a la salida del condensador. Por otro lado, el tubo de vidrio con la muestra mineralizada o digerida se colocó a la salida del destilador y se le añadió 20 mL de solución de NaOH al 32 %. La destilación se realizó durante 30 min.

Titulación: Se tituló el destilado con solución de HCl al 0.1 N hasta el viraje de color del indicador, de verde a gris rosado. Se registró el consumo de HCl en el blanco y en las muestras.

3.4 EXTRACCIÓN DEL POLEN COLECTADO POR LA ABEJA *M. beecheii*

Una muestra de 159.35 g de polen de *M. beecheii* se extrajo por maceración con metanol a temperatura ambiente y agitación constante durante 24 h (2x). Posteriormente, la solución se decantó, se pasó a través de papel filtro grado 2 y se llevó a sequedad, obteniéndose 50.72 g (31.83 %) de extracto metanólico crudo (IC-1) (Figura 3.3).

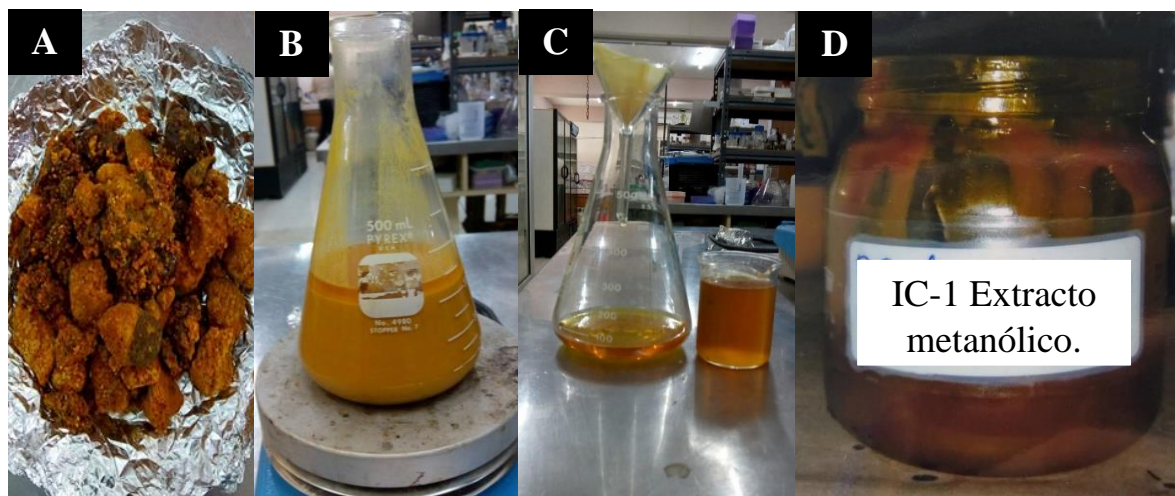


Figura 3.3 A) Polen colectado por la abeja *M. beecheii*. B) Extracción del polen colectado por la abeja *M. beecheii* por maceración con metanol. C) Filtración del extracto metanólico del polen. D) Extracto metanólico crudo del polen.

3.5 FRACCIONAMIENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO DEL EXTRACTO METANÓLICO CRUDO DEL POLEN COLECTADO POR LA ABEJA *M. beecheii* POR POLARIDAD ASCENDENTE

Una muestra de 50.72 g del extracto metanólico crudo (IC-1) se suspendió en una mezcla de MeOH/H₂O (7:3) y se fraccionó líquido-líquido con disolventes de polaridad ascendente, hexano, cloroformo y acetato de etilo, obteniendo así tres fracciones principales IC-2A (3.59 g, 7.08 %), IC-2B (1.95 g, 3.85 %) y IC-2C (2.44 g, 4.82 %) de polaridad baja, media baja y media alta, respectivamente (Figura 3.4).

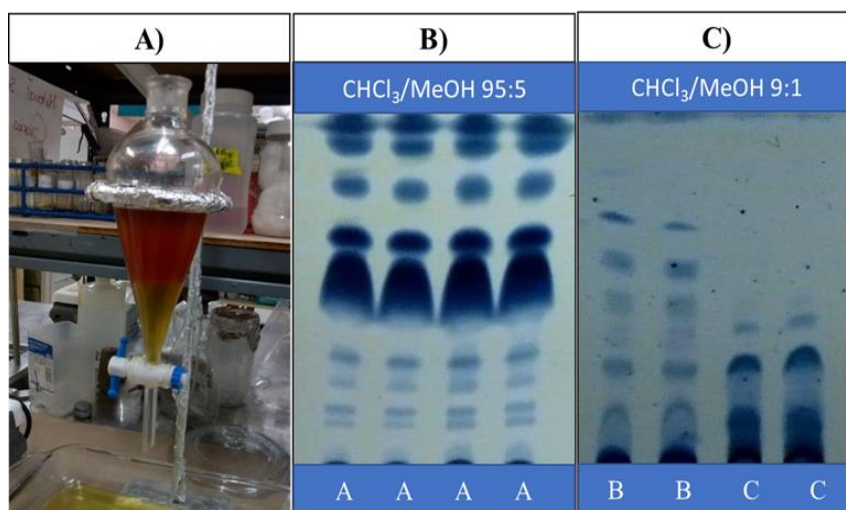


Figura 3.4 A) Separación de la fase orgánica. B) Monitoreo de la fracción IC-2A por TLC. C) Monitoreo de las fracciones IC-2B e IC-2C por TLC.

3.6 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA (IC-2A) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA AL VACÍO (VLC)

La fracción hexánica (IC-2A) se purificó por cromatografía líquida al vacío (VLC), utilizando una columna de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura, como fase estacionaria se utilizó sílica gel grado VLC y como fase móvil se utilizó heptano, mezclas de heptano/cloroformo y cloroformo/metanol con polaridad ascendente (Tabla 3.1 y figura 3.5). Se colectaron un total de 15 fracciones con un volumen de 50 mL cada una, las cuales fueron monitoreadas por TLC y reunidas por similitud de composición en cinco fracciones principales de la IC-3A-E (Figura 3.6 y 3.7).

Tabla 3.1 Composición de las fases móviles utilizadas durante la VLC.

Fracción	Sistema de elución
1	Hp 100 %
2	Hp 100 %
3	Hp 100 %
4	Hp/CHCl ₃ 1:1
5	Hp/CHCl ₃ 1:1
6	Hp/CHCl ₃ 1:1
7	CHCl ₃ 100 %
8	CHCl ₃ 100 %
9	CHCl ₃ 100 %
10	CHCl ₃ /MeOH 98:2
1	CHCl ₃ /MeOH 98:2
12	CHCl ₃ /MeOH 98:2
13	CHCl ₃ /MeOH 96:4
14	CHCl ₃ /MeOH 96:4
15	CHCl ₃ /MeOH 96:4

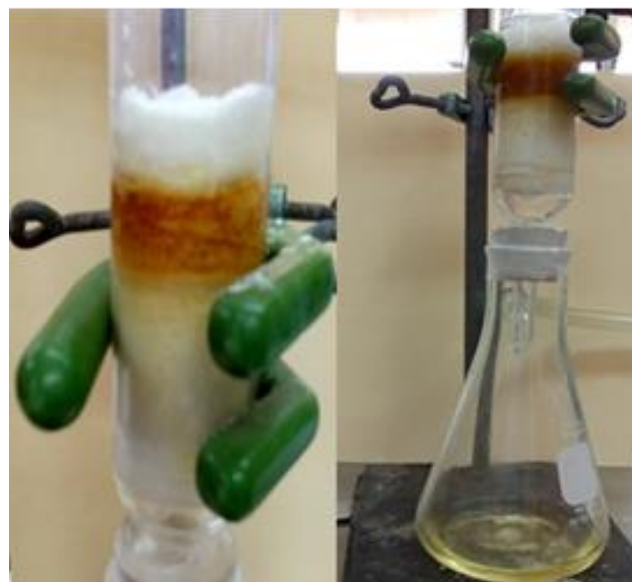


Figura 3.5 Purificación por VLC de la fracción hexánica (RC-2A).

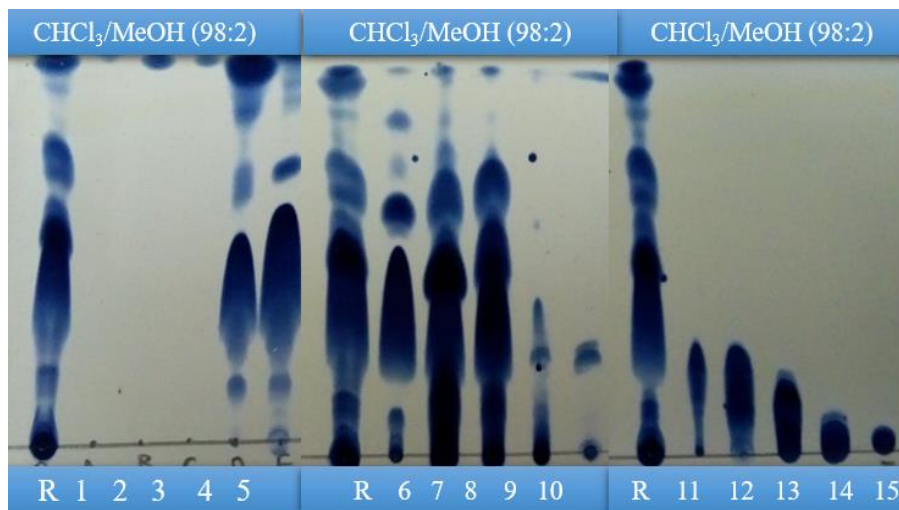


Figura 3.6 Monitoreo por TLC de las 15 fracciones colectas en la VLC de la fracción hexánica (RC-2A).



Figura 3.7 Monitoreo por TLC de las fracciones IC-3A-E.

3.7 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IC-3D POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA POR GRAVEDAD

La fracción IC-4D (575 mg) se purificó por cromatografía en columna por gravedad utilizando como sistema de elución una mezcla de hexano/acetona 9:1. Las condiciones para

la columna de separación fueron: 30 cm de altura, 1.5 de diámetro y 2.5 mL de volumen por cada fracción. Las 64 fracciones colectadas fueron monitoreadas por TLC y reunidas por similitud de composición en 5 fracciones principales de la IC-4A-E (Figura 3.8).

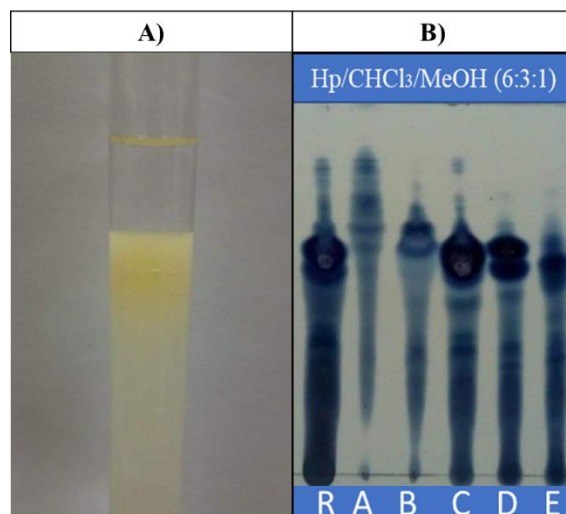


Figura 3.8 A) Purificación de la fracción IC-3D por cromatografía columna de gravedad. B) Monitoreo por TLC de las fracciones IC-4A-E.

3.8 PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES IC-4C E IC-4D POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA POR GRAVEDAD

Las fracciones IC-4C y IC-4D se mezclaron hasta obtener 90.4 mg de muestra y se purificaron por cromatografía en columna por gravedad (Figura 3.9) usando como sistema de elución una mezcla de hexano/acetato de etilo/metanol, 8:1:1. Las condiciones para la columna de separación fueron: 27 cm de altura, 1.5 de diámetro y 2 mL de volumen por cada fracción. Las 70 fracciones colectadas fueron monitoreadas por TLC y reunidas por similitud de composición en 4 fracciones principales de la RIC-5A-D (Figura 3.9B).

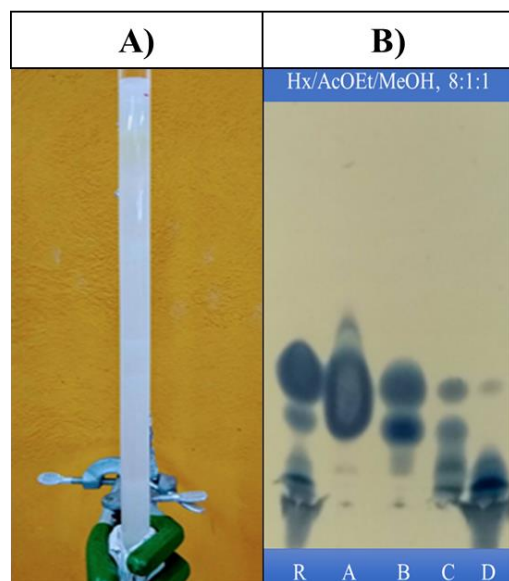


Figura 3.9 A) Purificación de las fracciones IC-4C y IC-4D por cromatografía en columna por gravedad. B) Monitoreo por TLC de las fracciones IC-5A-D.

3.9 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN RC-5B POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA POR GRAVEDAD

La fracción RC-5B (19.3 mg) fue purificada por cromatografía en columna de gravedad (Figura 3.10A) usando como sistema de elución una mezcla de hexano/acetato de etilo/metanol, 8:1:1. Las condiciones para la columna de separación fueron: 27 cm de altura, 1.5 de diámetro y 2.0 mL de volumen por cada fracción. Las 70 fracciones colectadas fueron monitoreadas por TLC y reunidas por similitud de composición en 3 fracciones principales (RIC-6A-C). De esta purificación se obtuvieron dos fracciones semipuras, IC-6A (**I**, 25.3 mg) y IC-6B (**II**, 6.2 mg) (Figura 3.10B).

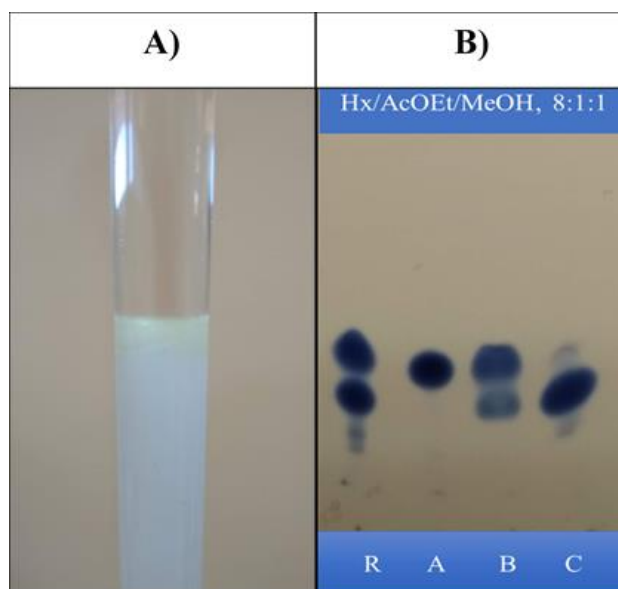


Figura 3.10 A) Purificación de la fracción IC-5B por cromatografía por columna por gravedad. B) Monitoreo por TLC de las fracciones IC-6A-C.

3.10 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN CLOROFORMICA IC-2B POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA POR GRAVEDAD

La fracción clorofórmica, IC-2B (1.95 g) fue purificada por cromatografía en columna por gravedad, utilizando como sistema de elución éter etílico/Cloroformo/Metanol, 5:4:1 (Figura 3.11A). Las condiciones para la columna de separación fueron: 27 cm de altura, 1.5 de diámetro y 1.5 mL de volumen de fracción. Las 114 fracciones colectadas fueron monitoreadas por TLC y reunidas por similitud de composición en 9 fracciones principales de la IC-7A-I (Figura 3.11B).

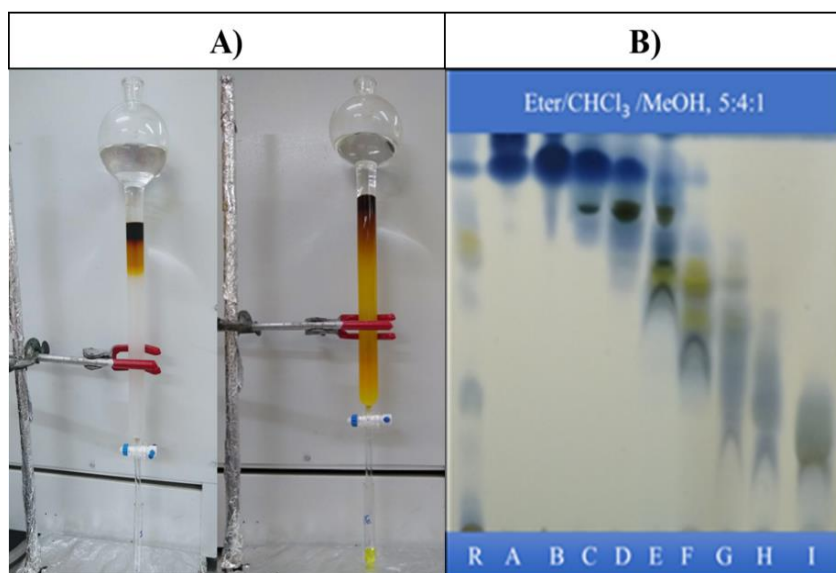


Figura 3.11 A) Purificación de la fracción IC-2B por cromatografía por columna de gravedad. B) Monitoreo por TLC de las fracciones IC-7A-I.

3.11 PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIÓNES IC-7A E IC-7B POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE GRAVEDAD

Las fracciones IC-7A y IC-7B fueron mezcladas (16.9 mg), y se purificaron por cromatografía en columna por gravedad (Figura 3.12A) utilizando como sistema de elución una mezcla de hexano/acetona, 8:2. Las condiciones de la columna de separación fueron: 27 cm de altura, 1.5 de diámetro y 1.5 mL de volumen por cada fracción. Se colectaron 70 fracciones las cuales se monitorearon por TLC y se reunieron por similitud de composición en 7 fracciones principales de la IC-8A-G. De esta purificación se obtuvieron cinco

fracciones semipuras, IC-8A (**III**, 3.7 mg), IC-8C (**IV**, 3.1 mg), IC-8D (**V**, 2.9 mg), IC-8E (**VI**, 2.8 mg) Y IC-8F (**VII**, 4.2 mg) (Figura 3.12B).

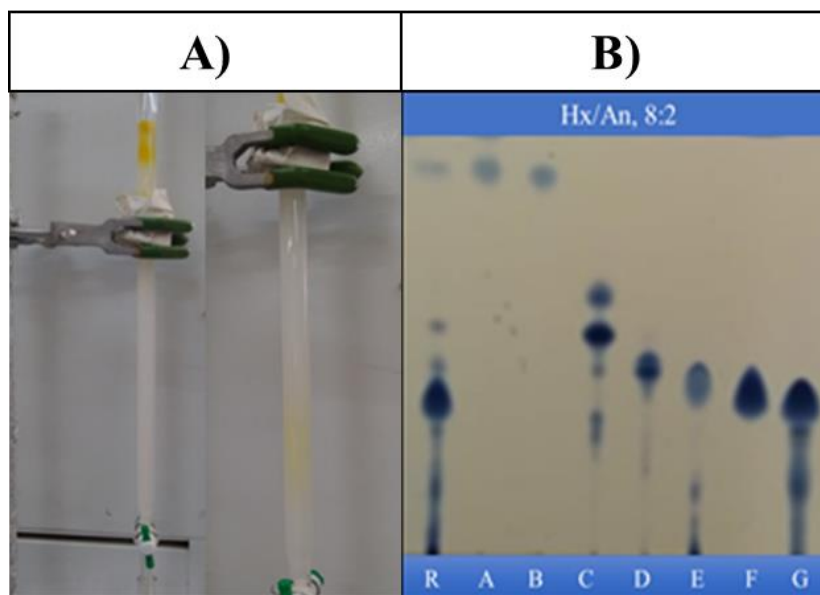


Figura 3.12 A) Purificación de la fracción IC-7A y IC-7B por cromatografía en columna por gravedad. B) Monitoreo por TLC de las fracciones IC-8A-G.

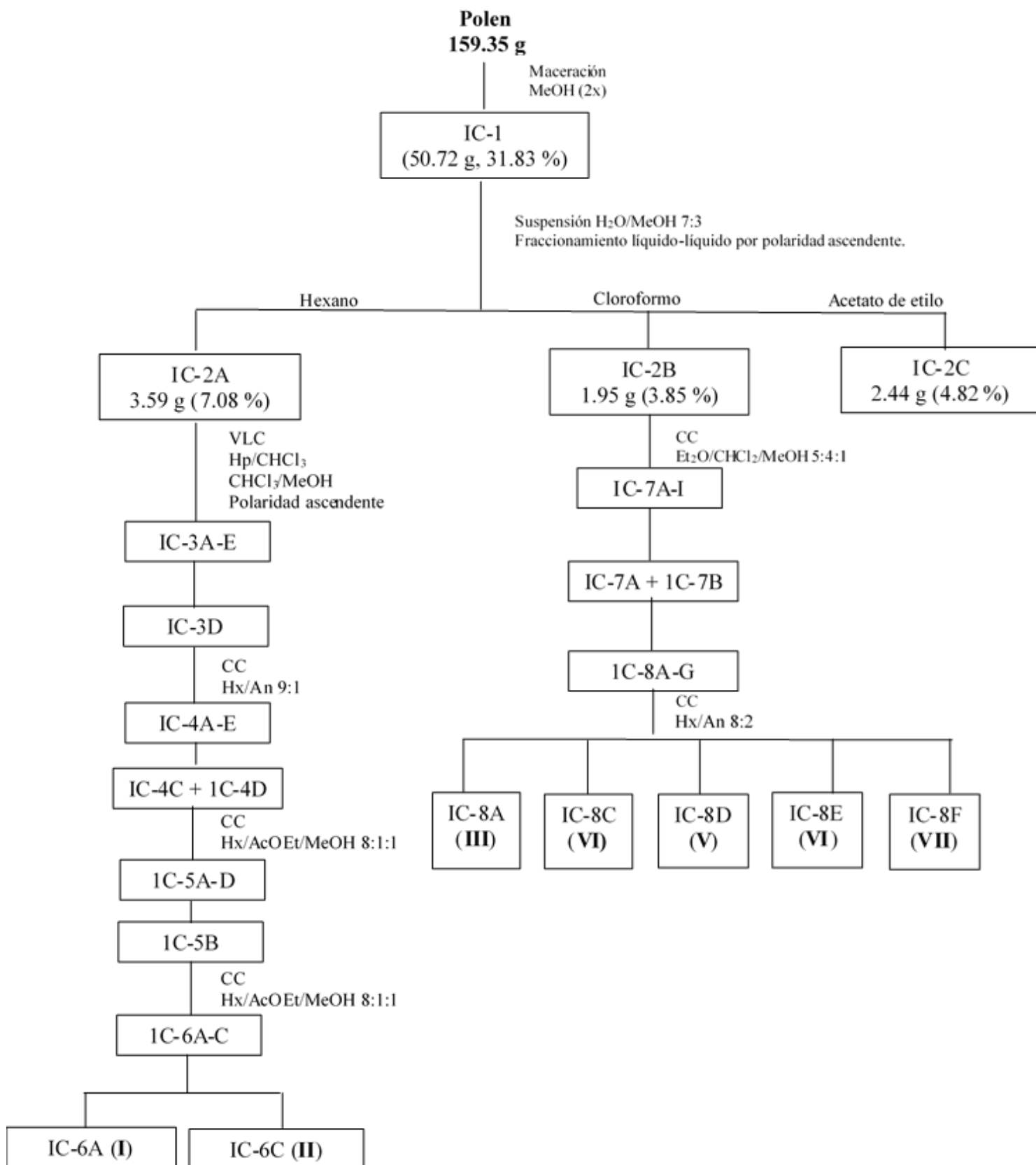


Figura 3.13 Esquema de purificación del polen de *M. becheii* y la obtención de las fracciones semipuras (I-VII).

3.12 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La determinación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico crudo y las fracciones de partición del polen colectado por la abeja *M. beecheii* contra *E. coli* ATCC 25922 se realizó mediante el método de difusión en disco descrito por Kirby-Bauer en 1984, el cual consiste en impregnar discos de papel filtro Whatman grade AA de 13 mm de diámetro con 50 μ L de las muestras. Se usaron como controles 50 μ L DMSO (control negativo), 0.02 μ L de Ciprofloxacina (control positivo) a partir de un stock de 1 μ g/ μ L y 50 mg de cada fracción disueltas en DMSO. La cepa bacteriana *E. coli* ATCC 25922 fue crecida en medios de cultivo Luria Bertani (LB) agar a 37° C durante 12 h. La turbidez fue ajustada al estándar 0.5 escala McFarland, equivalente a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) y 0.1 en absorbancia, empleando solución salina al 0.85 % estéril y un Vortex. Ambos inóculos se diluyeron a una concentración de 1×10^6 UFC/mL para su empleo. El ajuste de los inóculos bacterianos se realizó tomando con un asa de siembra algunas colonias y se diluyeron en un tubo eppendorf 1.5 mL que contenía solución salina al 0.85 %. Se inocularon placas de agar Muller-Hinton con hisopos estériles impregnados con la dilución bacteriana y se esperó a que el agar se secase. Posteriormente, se colocaron los discos y se depositaron las muestras, se dejó incubando a una temperatura de 37° C, se midieron los diámetros de los halos de inhibición incluyendo el diámetro del disco con ayuda de un vernier.

CAPÍTULO

IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL

En términos de alimentación humana, el polen es considerado una sustancia natural que constituye una fuente potencial de proteínas, vitaminas, carbohidratos, ácidos grasos, fibra dietaria, minerales y compuestos bioactivos (Silva *et al.*, 2006). El polen proviene de tan diversas fuentes en el reino vegetal, que los análisis del contenido nutricional y bioactivo siempre estarán determinados, por el origen botánico y geográfico, la influencia del suelo y las condiciones climáticas, la edad y el estado nutricional de la planta durante el desarrollo del grano, puede haber variaciones en la composición del polen según la región, la estación del año e incluso entre años, lo que nos podría indicar datos y características diferentes a los establecidos en la norma y los reportados por otros autores (Funari *et al.*, 2003; Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009; Silveira, 2012).

Los valores del análisis bromatológico del polen colectado por la abeja *M. beecheii* se muestran en la tabla 4.1, todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El contenido de cenizas, proteína y grasa se expresan como % en base seca.

Tabla 4.1. Análisis bromatológicos del polen colectado por la abeja *M. beecheii*.

ANÁLISIS	CONTENIDO (%)
HUMEDAD	34.54 ± 0.24
CENIZAS	2.66 ± 0.69
GRASAS	9.47 ± 0.49
PROTEÍNAS	20.09 ± 2.02
ELN	33.22 ± 1.74

4.1.1 HUMEDAD

La humedad es un parámetro importante en la calidad del polen, ya que es útil para evitar eventuales reacciones de deterioro y proliferación de microorganismos que ocasionan la alteración de polen por fermentación espontánea (Bogdanov, 2011), motivo por el cual el polen generalmente es sometido a procesos de remoción de humedad, comúnmente secado. El contenido de humedad en el polen colectado por la abeja *M. beecheii* colectado en el

municipio de Maní, Yucatán fue de 34.54 ± 0.24 , cuyo valor puede deberse a la influencia del suelo y a las condiciones climáticas de la región. En 2016 Vit y colaboradores en Venezuela realizaron el análisis del contenido de humedad para el polen de abejas sin aguijón como es el caso de *Scaptotrigona* sp. cf. *ochrotricha* y *Melipona* sp. aff. *eburnea*, en donde se encontraron valores de humedad de 43.49 ± 0.95 % y 48.54 ± 0.41 % respectivamente, valores que son superiores al reportado en este trabajo.

4.1.2 CENIZAS

El polen colectado por las abejas contiene elementos indispensables para el desarrollo de las mismas y los humanos, lo que hace de este alimento un suplemento nutricional alternativo (Álvarez, 2017). Los bioelementos presentes en este alimento son calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio (macronutrientes), hierro, cobre, zinc, manganeso, silicio y selenio (micronutrientes) (Komosinska *et al.*, 2015). El porcentaje de cenizas en el polen colectado por la abeja *M. beecheii* fue de 2.66 ± 0.6 , otros autores han obtenido resultados similares en polen colectado por las abejas sin aguijón, tal es el caso de Vit y colaboradores en 2016 en Venezuela, que reportaron para *Scaptotrigona* sp. cf. *ochrotricha* y *Melipona* sp. aff. *eburnea* un valor de 1.94 ± 0.35 % y 2.33 ± 0.10 %, respectivamente.

4.1.3 GRASAS

Los niveles de lípidos en el polen colectado por la abeja generalmente varían según el origen botánico (Álvarez, 2017). El contenido de grasa del polen colectado por la abeja *M. beecheii* fue de 9.47 ± 0.49 %, valor que fue mayor en comparación con el reportado en estudios realizados en abejas sin aguijón por Vit y colaboradores en 2016 con *Scaptotrigona* sp. cf. *ochrotricha* y *Melipona* sp. aff. *eburnea* que presentaron valores de 6.72 ± 0.58 % y 3.19 ± 0.11 %, respectivamente. Entre los lípidos que están presentes en el polen en una cantidad de aproximadamente 5.1 %, cabe señalar en primer lugar a los ácidos grasos esenciales (AGE). Los ácidos linoleicos, γ -linoleico y arcaico están presentes en un 0.4 %. Los fosfolípidos ascienden al 1.5 %, mientras que los fitosteroles, especialmente el β -sitosterol, representan el 1.1 % (Komosinska *et al.*, 2015). Los ácidos grasos esenciales tienen un impacto significativo desde el punto de vista nutricional, debido a que son componentes de la membrana y juegan un papel importante en los procesos metabólicos (Perini *et al.*, 2010). Más allá de esto, la ingestión adecuada de estos compuestos ayuda en la prevención de

enfermedades cardiovasculares y degenerativas, y ciertos tipos de cáncer (Calviello *et al.*, 2007; Cheatham *et al.*, 2006; Carl *et al.*, 2009). Ciertos ácidos grasos, como los ácidos linoleico, linolénico, mirístico y láurico, tienen propiedades bactericidas y antifúngicas (Manning, 2001; Yang *et al.*, 2013; Álvarez, 2017).

4.1.4 PROTEÍNAS

El polen es una fuente importante de proteína y aminoácidos esenciales como metionina, lisina, treonina, histidina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina y triptófano. Estos elementos proteicos son esenciales para la vida y el organismo no puede sintetizarlos por sí mismo (Komosinska *et al.*, 2015). El contenido proteico encontrado en el polen colectado por la abeja *M. beecheii* fue 20.09 ± 2.02 %, lo cual indica que el valor nutrimental y la calidad del polen producido por esta abeja es mayor en comparación al contenido proteico reportado por Vit y colaboradores en 2016 para abejas del mismo género, *Melipona* sp. *aff. eburnea* con un valor de 18.32 ± 0.10 % y para *Scaptotrigona* sp. *cf. ochrotricha* un valor de 16.80 ± 0.21 . Los niveles elevados de este macronutriente en el polen colectado por la abeja *M. beecheii* hacen que este alimento pueda ser considerado como un suplemento dietético alternativo, especialmente para vegetarianos. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO 2011) recomienda que los adultos (mayores de 18 años) consuman 0.66 g/kg/día de proteína, alrededor de 49.5 g para una persona de 75 kg. Para estas personas, una porción de 25 g de polen de abeja (el equivalente a una cucharada sopera) puede proporcionar hasta el 31 % de la ingesta recomendada. Además, según la FAO, es importante considerar la ingesta de aminoácidos esenciales, que están presentes en el polen de abeja (Komosinska *et al.*, 2015).

4.1.5 EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO (ELN)

En este valor se agrupan todos los nutrientes no evaluados en el análisis proximal del polen colectado por la abeja *M. beecheii* constituido principalmente por carbohidratos digeribles, fibra cruda, así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados. Existen reportes que señalan la presencia de azúcares reductores, principalmente fructosa y glucosa, compuestos fenólicos que incluye flavonoides, leucotrienos, catequinas y ácidos fenólicos. Entre los flavonoides que se encuentran principalmente el kaempferol, quercetina e isorhamnetina, mientras que, en el grupo de

ácidos fenólicos, hay principalmente ácido clorogénico, vitaminas importantes tanto liposolubles como la provitamina A y las vitaminas E y D, así como vitaminas hidrosolubles como B1, B2, B6 y C, y los ácidos pantoténico, nicotínico y fólico, biotina, rutina e inositol (Komosinska *et al.*, 2015)

4.2 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE POLEN COLECTADO POR LA ABEJA *M. beecheii*

El extracto metanólico de polen colectado por la abeja *M. beecheii* (IC-1) fue sometido a un fraccionamiento líquido-líquido usando solventes de polaridad ascendente [hexano (IC-2A), cloroformo (IC-2B) y acetato de etilo (IC-2C)]. Purificaciones sucesivas de la fracción hexánica (IC-2A) usando cromatografía líquida al vacío (heptano/cloroformo y cloroformo/metanol por polaridad ascendente) y cromatografía en columna por gravedad (hexano/acetona 9:1 y hexano/acetato de etilo/metanol 8:1:1) resultaron en la obtención de dos fracciones semipuras (**I** y **II**) (Figura 4.1A). Del mismo modo, la fracción clorofórmica (IC-2B) fue purificada usando cromatografía en columna por gravedad (éter etílico/cloroformo/metanol 5:4:1 y hexano/acetona 8:2) obteniéndose 5 fracciones semipuras (**III**, **IV**, **V**, **VI** y **VII**) (Figura 4.1B).

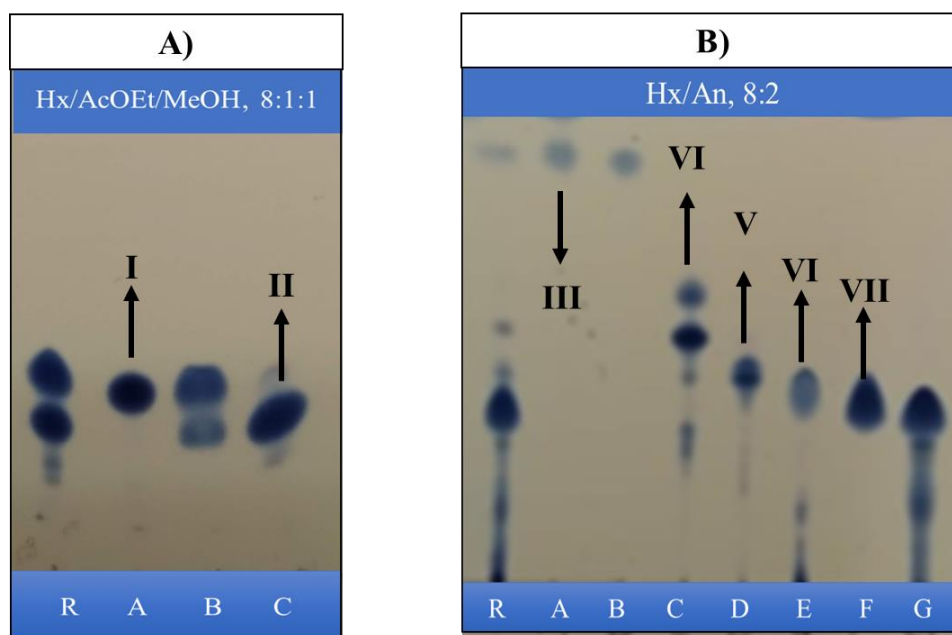


Figura 4.1. Cromatografía en capa delgada de las fracciones semipuras obtenidas de la purificación del polen de abeja *M. beecheii*. A) fracción hexánica (**I** y **II**) B) fracción clorofórmica (**III**, **IV**, **V**, **VI** y **VII**).

4.3 ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES SEMIPURAS (I-VII) POR CG-EM, IR E IDENTIFICACIÓN DE LO METABOLITOS PRESENTES.

El análisis por CG-EM de las fracciones I-III permitió identificar la presencia de once metabolitos, los cuales fueron identificados con base a su peso molecular, su patrón de fragmentación por EM, comparando con una base de datos y con la literatura. Así mismo, se realizaron análisis por IR para confirmar la presencia de los grupos funcionales presentes. El análisis por CG-EM de las fracciones IV-VII no fue el adecuado, por lo que se sugiere que posteriormente estas fracciones sean analizadas por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL-EM).

4.3.1 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN I POR CG-EM

En el perfil por CG de la fracción I (Figura 4.2) se observó la presencia de varios componentes, de los cuales se identificaron dos metabolitos, ácido palmítico (1) y β/γ -sitosterol (2).

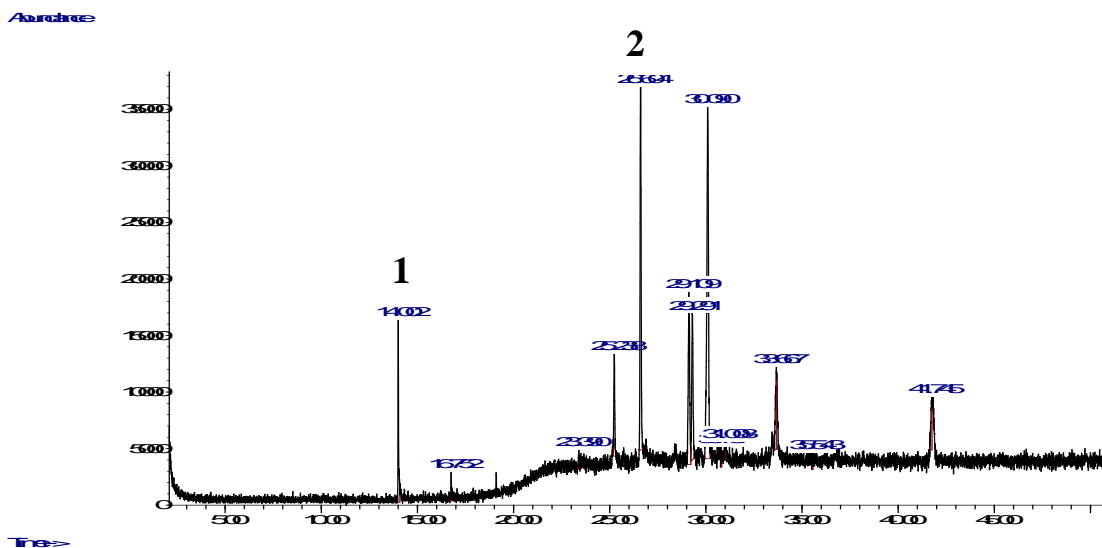


Figura 4.2. Perfil por cromatografía de gases de la fracción I.

4.3.1.1 IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO PALMÍTICO (1)

El metabolito 1 ($t_R= 14.00$ min) mostró por espectrometría de masas (Figura 4.3) un ion molecular a m/z 256, indicando una fórmula molecular de $C_{16}H_{32}O_2$, que de acuerdo con el

índice de deficiencia de hidrógeno sugirió un sitio de insaturación. El patrón de fragmentación mostró un pico base a m/z 73 y otros iones fragmento a m/z 239, 213, 171, 157, 129, 115, 97, 83 y 55 característicos de un ácido graso (Figura 4.4).

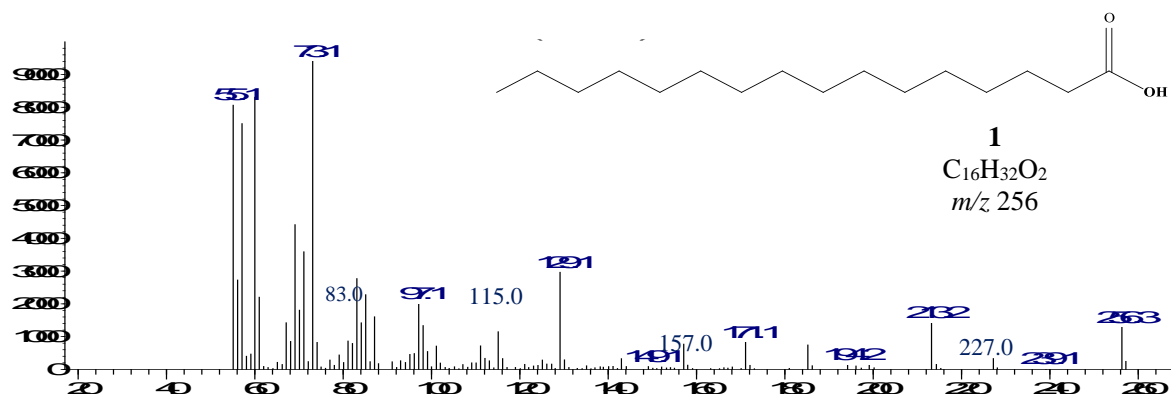


Figura 4.3. Espectro de masas del ácido palmítico (1).

Los iones más abundantes se encuentran a m/z 55, 60 y 73, cabe destacar que el ion fragmento a m/z 60 deriva del reordenamiento de McLafferty (Figura 4.5), el cual consiste en una transferencia intramolecular cíclica de un átomo de hidrógeno del carbono γ al oxígeno del grupo carbonilo y una ruptura entre los carbonos α y β , más una unidad de masa para el hidrógeno que se transfiere, formándose como ion fragmento un enol y como pérdida un alqueno. La intensidad de los fragmentos de McLafferty depende del número de enlaces π en la molécula. Este reordenamiento es característico de compuestos carbonílicos como aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres, en la medida que tengan hidrógenos γ (Dayhuff & Wells, 2005; López *et al.*, 2009; Wade, 2011; Santana, 2019). Además el ion molecular es detectable claramente y hay iones representativos de las fragmentaciones de los grupos metilenos de la forma $[HOOC(CH_2)_n]^+$ en el intervalo de m/z 115 a 256 (Figura 4.4). El ion a m/z 239 ($[M-17]^+$) refleja una pérdida de un grupo OH del grupo carboxilo a través de una ruptura en α (Figura 4.6), la cual se da en cuando un compuesto carbonílico pierde un grupo alquilo para formar un ion acilo estabilizado por resonancia (Wade, 2011; Santana, 2019). Los iones fragmento a m/z 227 y 213, corresponden a rearrreglos que involucran la eliminación de dos (C2 y C3) y tres (C2 al C4) unidades de carbono, respectivamente, de manera similar a como ocurre en los ésteres metílicos de ácidos grasos (Mohan *et al.*, 2016). El análisis de estos datos permitió identificar al metabolito **1** como ácido palmítico, el cual es un ácido graso saturado con propiedades antiandrogénicas, antifibrinolíticas, hemolíticas,

inhibidor de la 5-alfa reductasa, antioxidante, hipocolesterolémico, antiinflamatorio, inhibidor de la fosfolipasa, anticancerígeno, antimicrobiano, nematocida y con propiedades larvicidas contra mosquitos (Mohan *et al.*, 2016; Godara, *et al.*, 2019). Abubakar & Majinda en 2016 identificaron por GC-MS a partir del extracto hexánico del duramen de *Albizia adianthifolia* la presencia de ácido palmítico. Por otra parte, Godara y colaboradores en 2019 también reportaron este ácido graso en diferentes tejidos vegetales y callos de *Leptadenia reticulata*. Otros estudios revelaron propiedades anticancerígenas y citotóxicas de extractos preparados a partir de las hojas de *Kigelia pinnata*, donde el metabolito principal fue identificado como ácido palmítico, el cual mostró una citotoxicidad significativa contra células de carcinoma colorrectal humano (HTC-116) con un valor IC_{50} de $0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Ravi & Kishnan, 2017). El ácido palmítico es uno de los ácidos grasos saturados de cadena larga más comunes, está formado por 16 átomos de carbono. Se encuentra tanto en lípidos vegetales como animales, aunque en pequeña cantidad (5 a 10% de los ácidos grasos). El ácido palmítico se encuentra en una gran proporción en el aceite de palma, de ahí su nombre. Es soluble en alcohol y éter, pero no en agua. Tiene un punto de fusión de $63 \text{ }^{\circ}\text{C}$. El ácido palmítico es el principal ácido graso saturado de la dieta. Es el más abundante en las carnes y grasas lácteas (mantequilla, queso y nata), en los aceites vegetales de coco, palma y palmiste y en la manteca de cacao. En la actualidad, el aceite de palma se consume en todo el mundo como aceite de cocinar, para freír, en panadería, pastelería, confitería, en la preparación de sopas, entre otros. El aceite de palma tiene un contenido glicérido sólido alto, lo cual le da la consistencia deseada sin necesidad de hidrogenación. Es el primer ácido graso que se produce durante la lipogénesis y a partir de él se pueden formar otros ácidos grasos de cadena más larga o con dobles enlaces. Además, el aceite palma es una materia prima que se utiliza ampliamente en jabones y detergentes, en la elaboración de grasas lubricantes y secadores metálicos, destinados a la producción de pintura, barnices y tintas (Guzmán, 2011).

4.3.1.2 IDENTIFICACIÓN DEL ESTEROL (β/γ -SITOSTEROL) (2)

El metabolito **2** ($t_R= 26.60$ min) mostró por espectrometría de masas (Figura 4.7) un ion molecular a m/z 414, indicando una fórmula molecular de $C_{29}H_{50}O$, que de acuerdo con el índice de deficiencia de hidrógeno sugirió cinco sitios de insaturación.

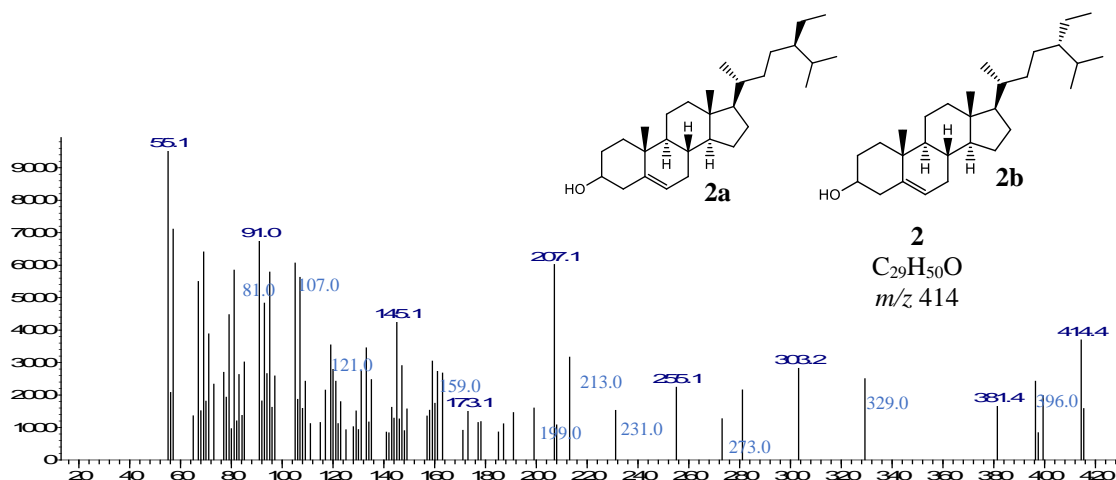


Figura 4.7. Espectro de masas de β -sitosterol (**2a**) o γ -sitosterol (**2b**) (**2**).

El patrón de fragmentación mostró un pico base a m/z 55 y otros iones fragmento a m/z 396, 381, 329, 303, 273, 255, 231, 213, 207, 199, 173, 159, 145, 121, 107, 91, 81 y 55 característicos de un fitoesterol con una insaturación Δ^5 , en particular, por los iones fragmento a m/z 329 y 303, además de la pérdida de metilos, el OH de la posición C-3 y los carbonos de la cadena lateral (Figura 4.9) (Uddin-Ahmad *et al.*, 1980; Mehta *et al.*, 2006; Sparkman *et al.*, 2011; Hisham *et al.* 2012 & Peniche, 2016). El ion a m/z 273 (M^+-141) corresponde a la pérdida del fragmento $C_{10}H_{21}$. Asimismo, la deshidratación del ion fragmento a m/z 273 permite la formación del ion a m/z 255 (M^+-18). El ion a m/z 231 (M^+-183) se formó por la pérdida del fragmento $C_{13}H_{27}$. De igual manera, los iones fragmento a m/z 203 y 329 se forman por las pérdidas M^+-111 y M^+-85 . Finalmente, el ion fragmento m/z 396 se produce por una pérdida de agua a partir del ion molecular (M^+-18), la pérdida del fragmento $C_{13}H_{27}$ a partir del ion a m/z 396 produce el ion a m/z 213, el cual a su vez es fragmentado formándose el ion a m/z 159 por un reordenamiento de tipo Retro Diels Alder, el cual se presenta particularmente en los cicloalquenos, ya que éstos al poseer dos enlaces

en posición alílica, sufren una fragmentación simultánea de ambos enlaces (Figura 4.8) (Yakubu *et al.*, 2014; Pretsch & Affolter, 2000; Klause, 1962; Grassell, 1973). El análisis detallado del patrón de fragmentación del metabolito **2** permitió identificarlo como β -sitosterol o su epímero γ -sitosterol. Los epímeros son diasterómeros que difieren en la configuración solo en uno de sus centros de quiralidad (Carey & Giuliano, 2014). El β -sitosterol y el γ -sitosterol son epímeros en la configuración espacial de la cadena lateral sobre el carbono C-17.

Los sitosteroles se encuentran entre los metabolitos esteroidales ampliamente distribuidos en las plantas. El β -sitosterol se encuentra principalmente en el aceite de semilla de algodón y el aceite de germen de trigo y el γ -sitosterol en el aceite de soja. El β -sitosterol y el γ -sitosterol están estrechamente relacionados, pero difieren en que no se adsorben apreciablemente del tracto digestivo. El γ -sitosterol se reportó por primera vez en las hojas de *Girardinia heterophylla*. El γ -sitosterol reduce la hiperglucemia en ratas diabéticas debido al aumento de la secreción de insulina y la inhibición de la glucogénesis, es por ello que se puede utilizar en el tratamiento de la diabetes mellitus. Los estudios de acoplamiento del ligando γ -sitosterol con cuatro proteínas diana diferentes demostraron que este metabolito es una buena molécula que se acopla bien con varios objetivos relacionados con la diabetes mellitus, por lo tanto, el γ -sitosterol tiene potencial para convertirse en un potente fármaco antidiabético (Fieser & Fieser, 2013; Maurice *et al.*, 1954; Balamurugan *et al.*, 2011; Balamurugan *et al.*, 2012 & Tripathi *et al.*, 2013).

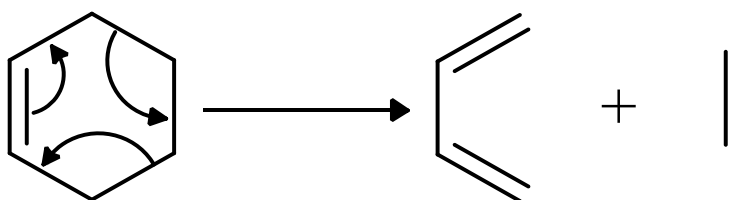


Figura 4.8 Reacción de Retro Diels-Alder.

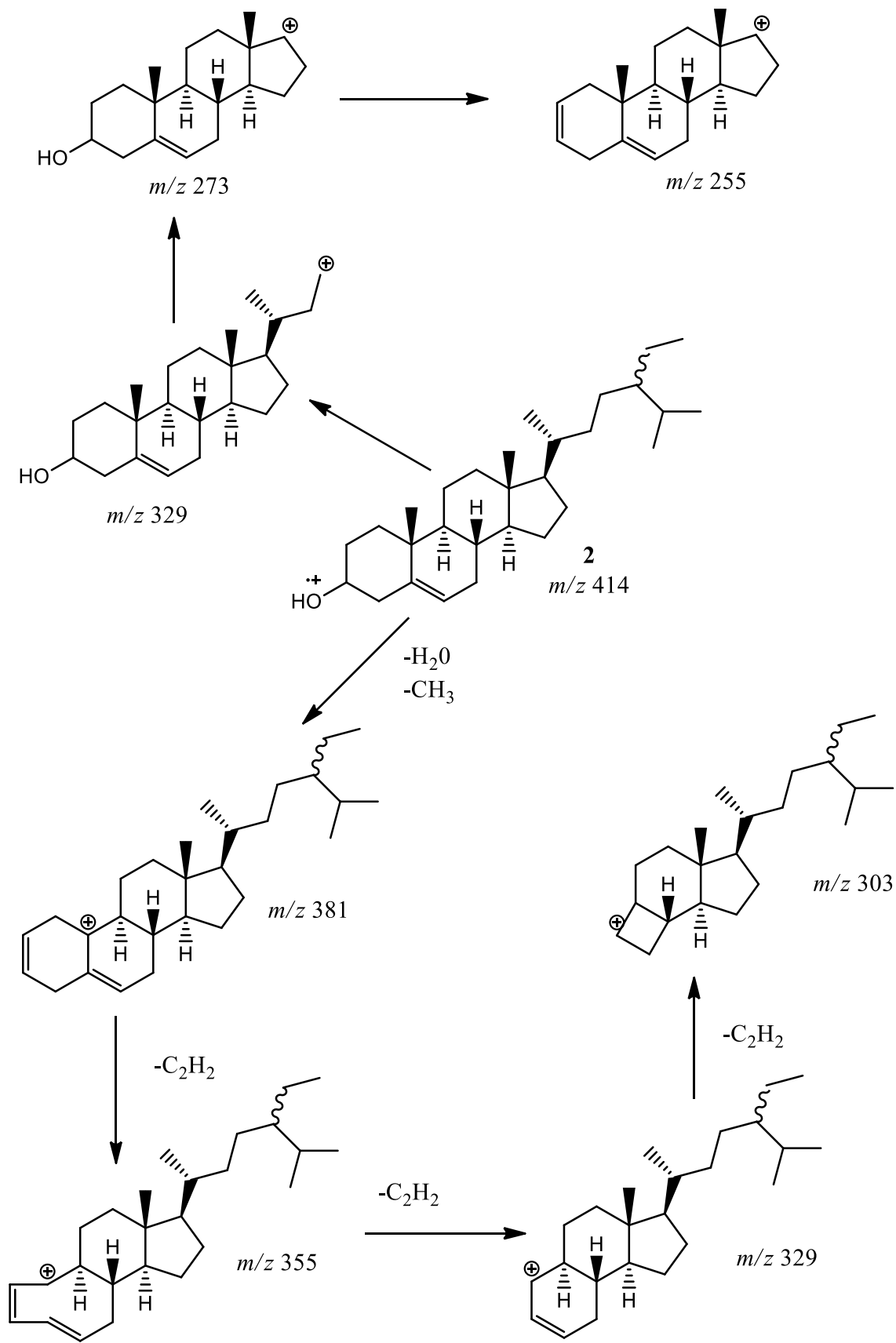


Figura 4.9 Fragmentación por espectrometría de masas de β -sitosterol o γ -sitosterol (**2**).

4.3.1.3 ANÁLISIS POR IR DE LA FRACCIÓN I

El análisis por IR de la fracción I (Figura 4.10) confirmó la presencia de los grupos funcionales de los metabolitos identificados para esta fracción. Se observó una banda de tensión a 3468 cm^{-1} correspondiente al estiramiento característico del grupo hidroxilo (OH), así mismo se observaron bandas de tensión a 2850 y 2900 cm^{-1} indicando la presencia de estiramientos carbono-hidrógeno (C-H) en átomos de carbono de hibridación sp^3 . Por otra parte, se observaron bandas de tensión de carbonilo a 1735 y 1750 cm^{-1} sugiriendo la presencia de ésteres entre los metabolitos no identificados (Silverstein, 2005; Wade, 2011).

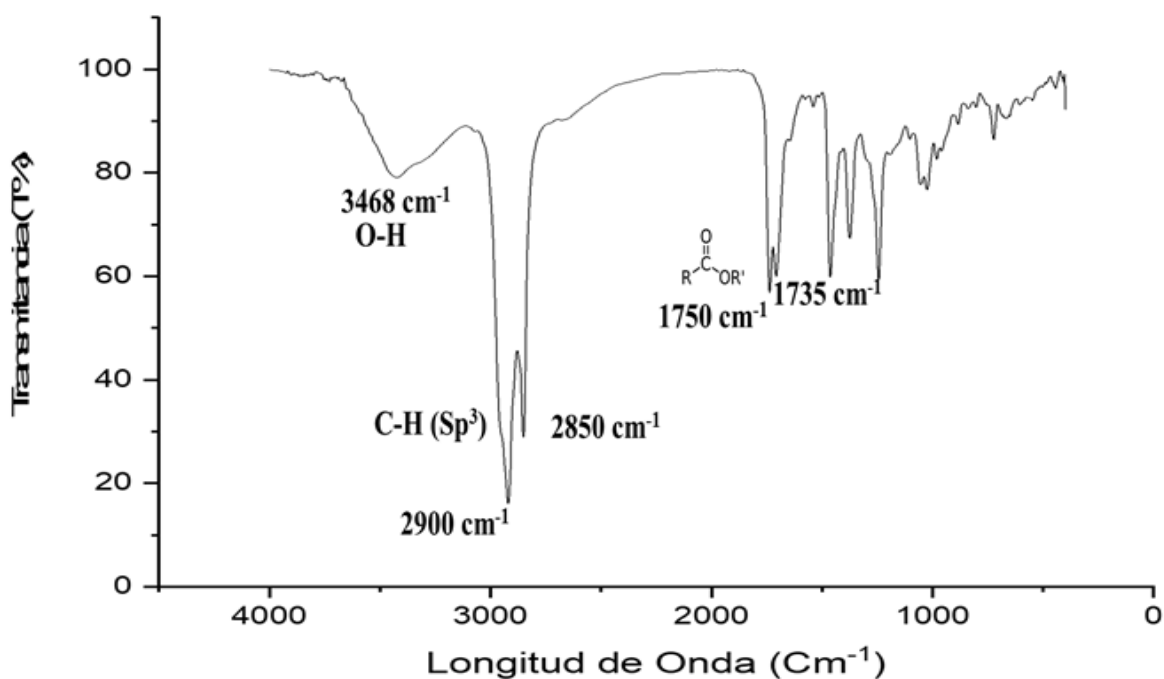


Figura 4.10 Espectro infrarrojo de la fracción I.

4.3.2 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN II POR CG-EM

En el perfil por CG de la fracción II (Figura 4.11) se observó la presencia de tres componentes, de los cuales sólo fueron identificados dos de ellos, ácido palmítico (**1**) y ácido mirístico (**3**).

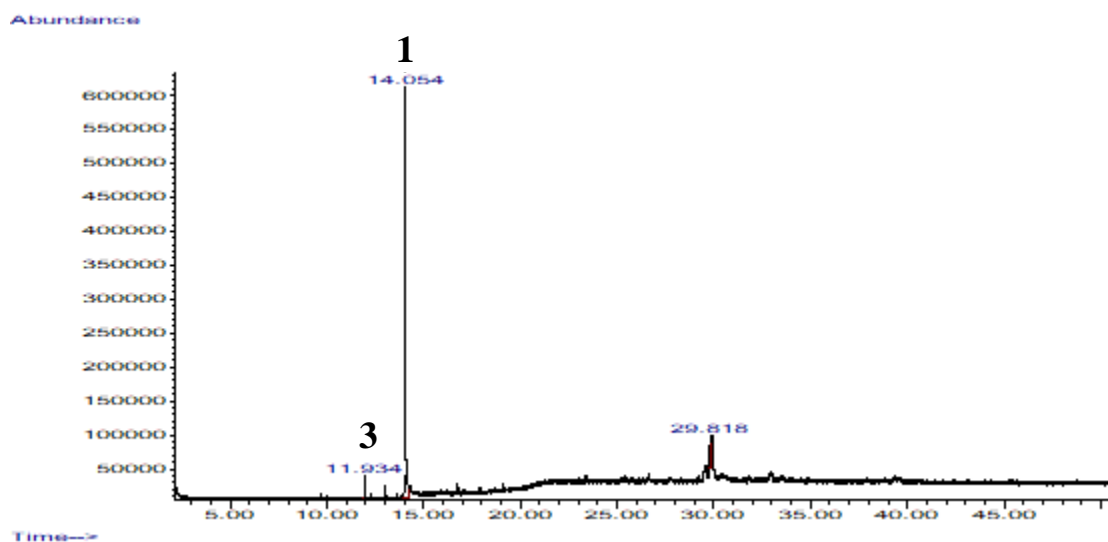


Figura 4.11 Perfil por cromatografía de gases de la fracción II.

4.3.2.1 IDENTIFICACIÓN DEL ÁCIDO MIRÍSTICO (**3**)

El metabolito **3** ($t_R = 11.93$ min) mostró por espectrometría de masas (Figura 4.12) un ion molecular a m/z 228, sugiriendo una fórmula molecular de $C_{14}H_{28}O_2$, que de acuerdo con el índice de deficiencia de hidrógeno sugirió un sitio de insaturación. El patrón de fragmentación mostró un pico base a m/z 73 y otros iones fragmento a m/z 199, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 97, 60 y 55 característicos de un ácido graso (Figura 4.12). Los iones más abundantes se encuentran a m/z 55, 60 y 73, destacando el ion fragmento a m/z 60 que proviene de un reordenamiento de tipo McLafferty (Figura 4.14). Los iones a m/z 199, 185, 171, 157, 143, 129, y 115 se forman por la pérdida de etilo (M-C₂H₅), propilo (M-C₃H₇), butilo (M-C₄H₉), pentilo (M-C₅H₁₁), hexilo (M-C₆H₁₃), heptilo (M-C₇H₁₅) y octilo (M-C₈H₁₇), respectivamente (Figura 4.13). El análisis detallado del patrón de fragmentación del metabolito **3** permitió identificarlo como ácido mirístico, un ácido graso saturado de 14 átomos de carbono que se encuentra en las membranas celulares humanas a niveles bajos

(Dayhuff & Wells, 2005; Wade, 2011; Silverstein, 2005). El ácido mirístico también es llamado ácido tetradecanoico y es muy abundante en lípidos vegetales y en menor proporción en los lípidos animales. Recibió el nombre de ácido mirístico debido a la nuez moscada (*Myristica fragrans*); ya que la manteca de la nuez moscada está constituida por 75 % trimiristina, un triglicérido compuesto por tres moléculas de ácido mirístico. El ácido mirístico también se encuentra en el aceite de palma, aceite de coco, mantequilla y manteca (Guzmán, 2011).

Audire

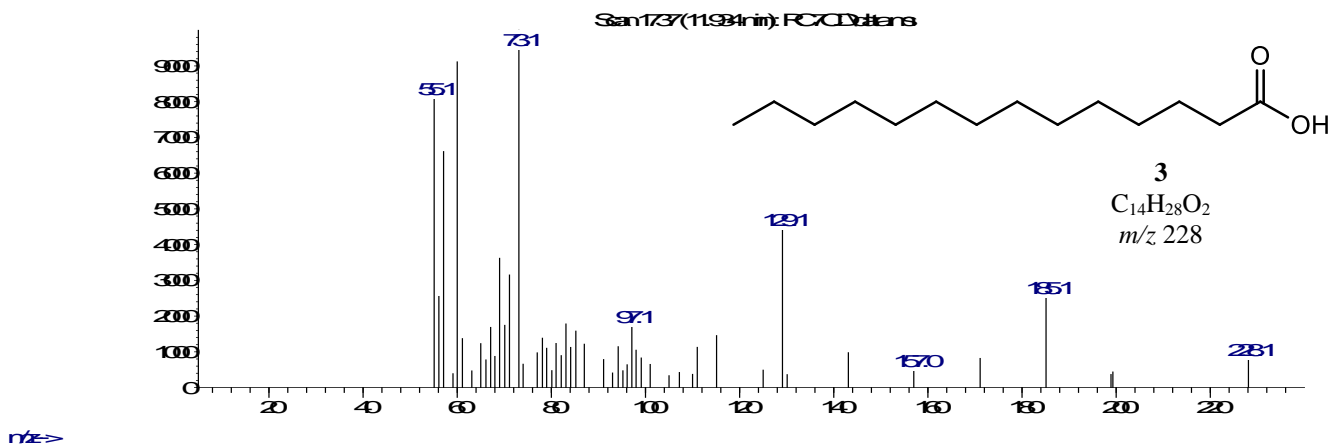


Figura 4.12. Espectro de masas del ácido mirístico (3).

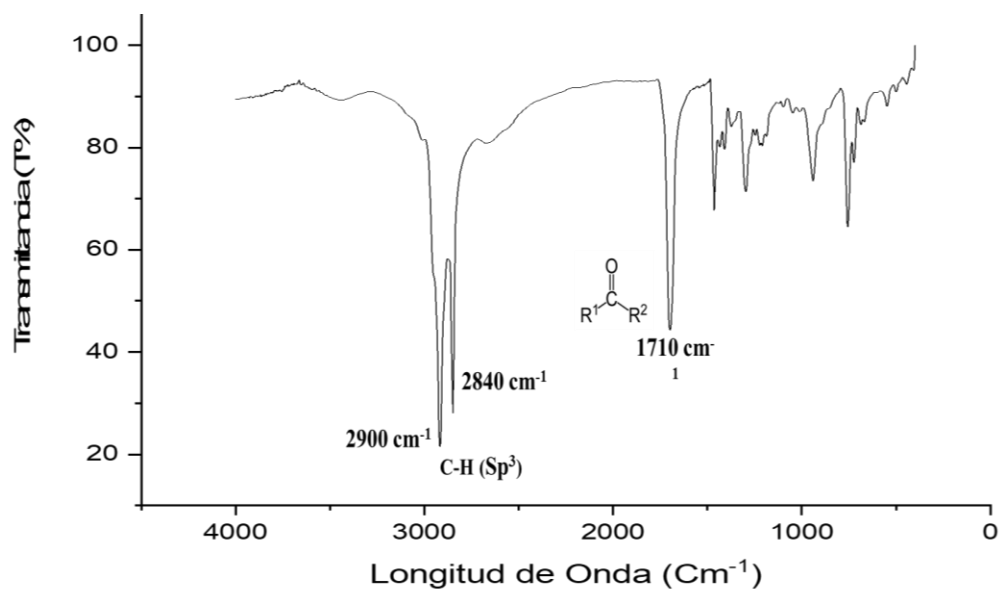


Figura 4.15 Espectro infrarrojo de la fracción **II**.

4.3.3 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN III POR CG-EM

En el perfil por CG de la fracción **III** (Figura 4.16) se observó la presencia de varios componentes, de los cuales fueron identificados ocho metabolitos: 5-(*E*)-octadeceno (**4**), 9-(*E*)-octadeceno (**5**), éster metílico del ácido 14-metilpentadecílico (**6**) éster 1,1-dimetiletílico del ácido palmítico (**7**), dotriacontano (**8**), 1-heptadeceno (**9**), éster butílico del ácido esteárico (**10**) y 2-metil tetracosano (**11**).

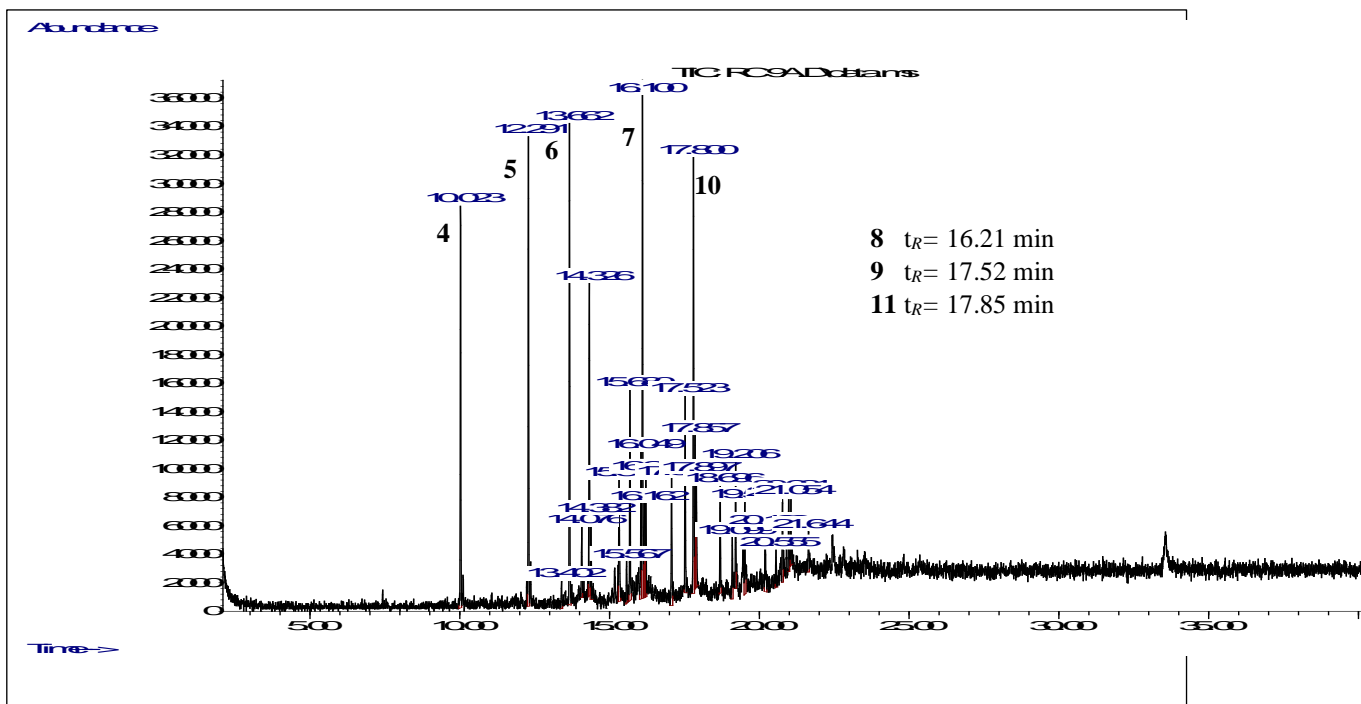


Figura 4.16 Perfil por cromatografía de gases de la fracción III.

4.3.3.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN III

Los metabolitos **4** ($t_R = 10.02$ min) y **5** ($t_R = 12.29$ min) fueron identificados como los isómeros, 5-(*E*)-octadeceno y 9-(*E*)-Octadeceno, por comparación de sus espectros de masas (Figuras 4.17 y 4.19) con la base de datos NIST05. El ion molecular en estos metabolitos es sumamente inestable por lo que pocas veces se detecta a m/z 252 indicando una fórmula molecular de $C_{18}H_{36}$. En los espectros de masas de ambos metabolitos se detectaron los iones fragmento a m/z 125, 111, 97, 83 correspondientes a pérdidas de grupos nonilo, decilo, undecilo y dodecilo, respectivamente. A su vez el ion fragmento a m/z 83 sufre dos pérdidas características, una de un grupo metilo para dar el ion a m/z 68, y una pérdida de un grupo etilo para dar el ion fragmento protonado a m/z 55 (Figura 4.18 y 4.20). La similitud en los espectros de masas permite que ambos metabolitos sean intercambiables.

Amidre

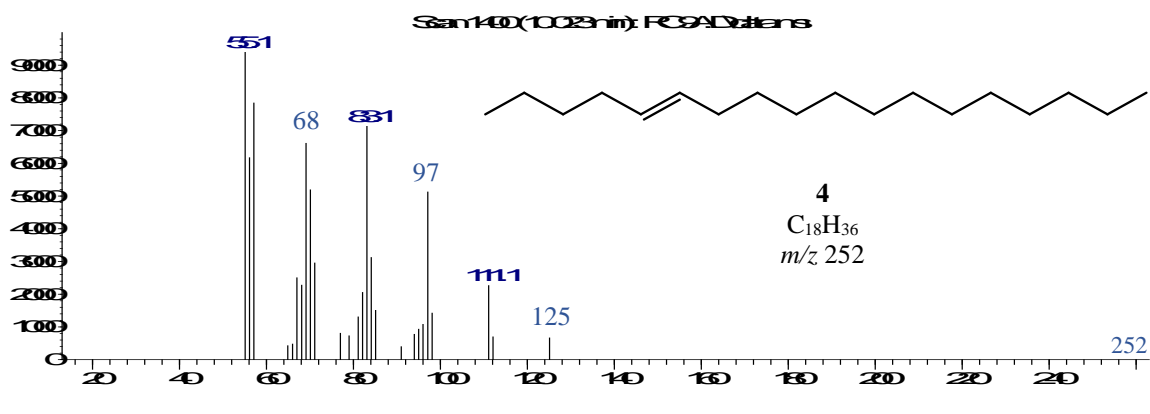


Figura 4.17. Espectro de masas del 5-(*E*)-Octadeceno (4).

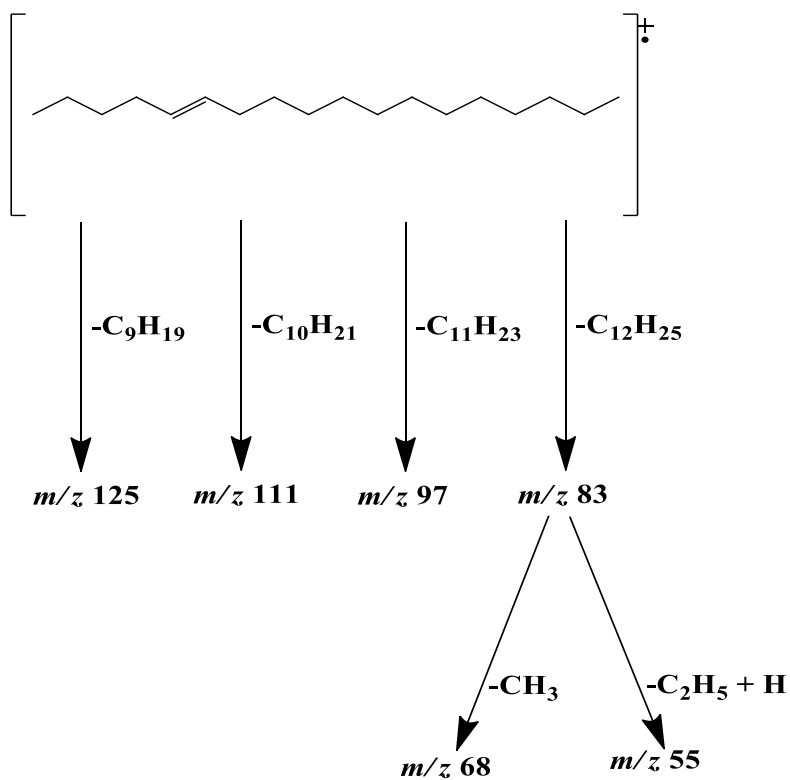


Figura 4.18 Fragmentación por espectrometría de masas del 5-(*E*)-Octadeceno (4).

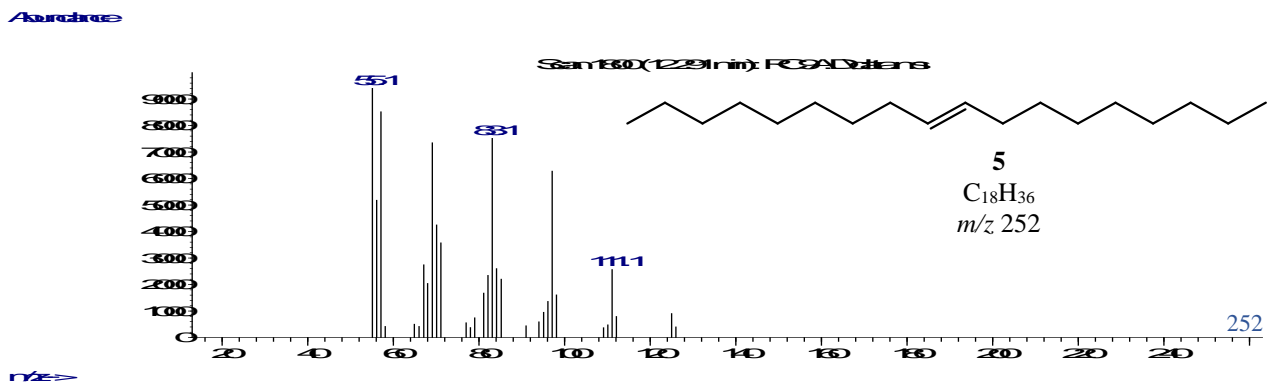


Figura 4.19. Espectro de masas del 9-(*E*)-Octadeceno (5).

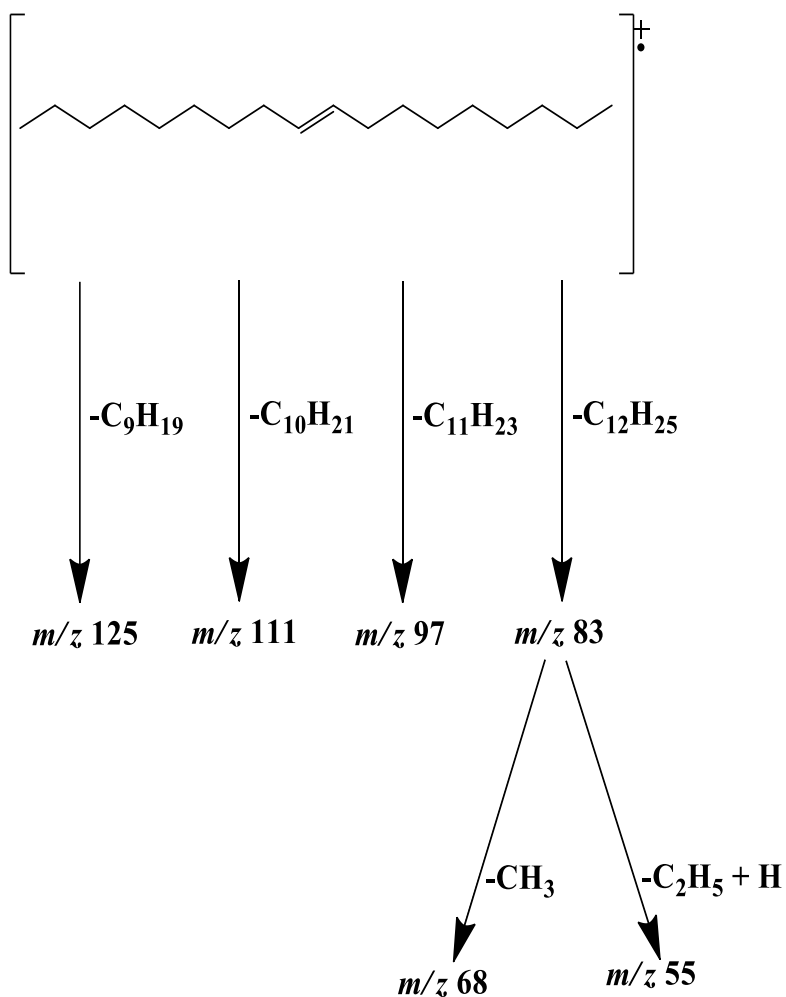


Figura 4.20 Fragmentación por espectrometría de masas del 9-(*E*)-Octadeceno (5).

El metabolito **6** ($t_R = 13.66$ min) presentó por espectrometría de masas (Figura 4.21) un ion molecular a m/z 270 sugiriendo una fórmula molecular de $C_{17}H_{34}O_2$. El patrón de fragmentación mostró un pico base a m/z 74 y los iones fragmento a m/z 239 (pérdida de metoxilo, OCH_3), así como 227, 199, 185, 171, 143, 129, 115, 101 y 87 correspondientes a las pérdidas de los grupos alquilo C_3H_7 , C_5H_{11} , C_6H_{13} , C_7H_{15} , C_9H_{19} , $C_{10}H_{21}$, $C_{11}H_{23}$, $C_{12}H_{25}$ y $C_{13}H_{27}$, respectivamente (Figuras 4.21 y 4.22) características de un ácido graso. La pérdida de un grupo metoxilo sugirió que el metabolito **6** sea un éster metílico. El pico base a m/z 74 corresponde a un ion formado por reordenamiento McLafferty de un éster (Figura 4.23), y el ion a m/z 59 corresponde a una ruptura en α del éster en donde se pierde una cadena alquímica de $C_{15}H_{31}$ (Figura 4.24). Los datos de la espectrometría de masas antes mencionados permitieron identificar al metabolito **6** como el éster metílico del ácido 14-metilpentadecílico (Dayhuff & Wells, 2005; Wade, 2011; Silverstein, 2005).

Abundancia

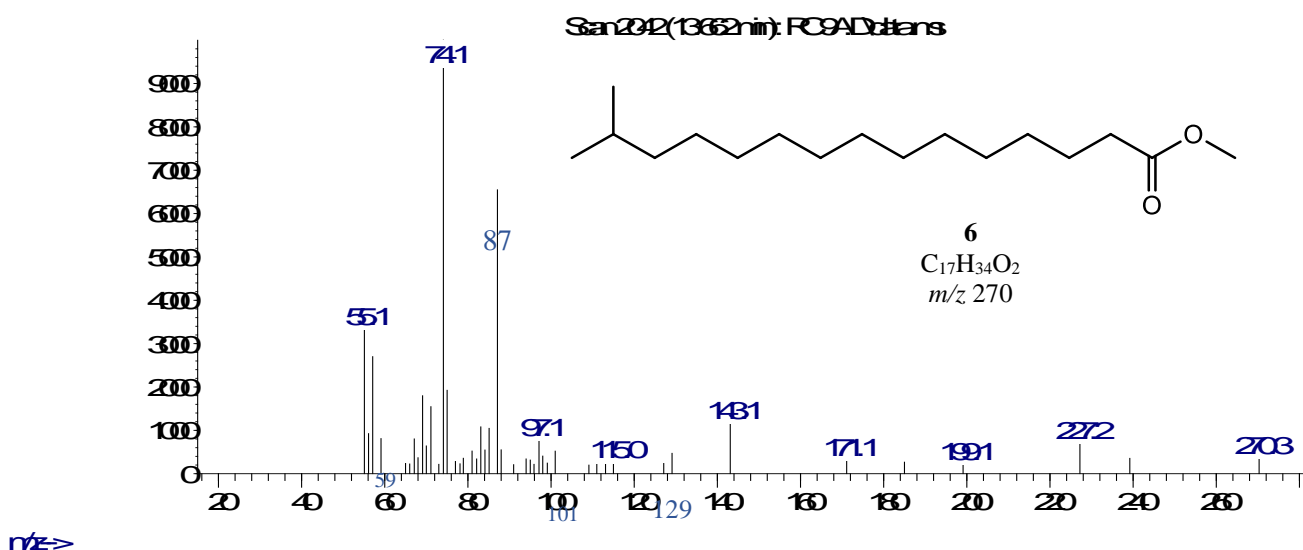


Figura 4.21. Espectro de masas del éster metílico del ácido 14-metilpentadecílico (**6**).

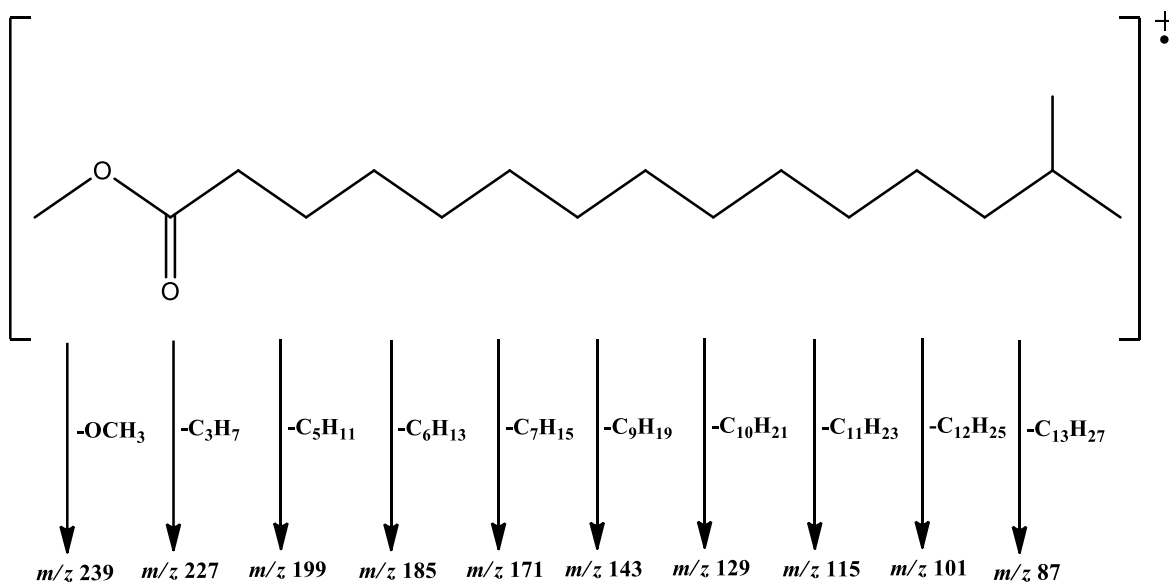


Figura 4.22 Fragmentación por espectrometría de masas del éster metílico del ácido 14-metilpentadecílico (6).

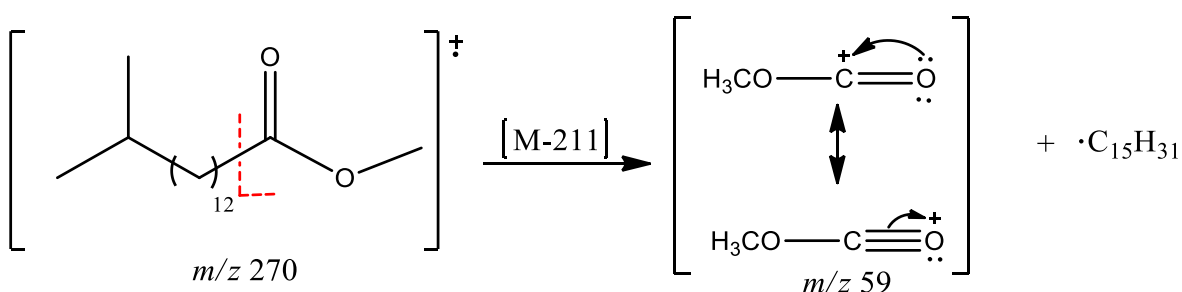


Figura 4.23 Ruptura en α característica en el éster metílico del ácido 14-metilpentadecílico (6). Formación del ion fragmento a m/z 59 por pérdida de 211 unidades de masa.

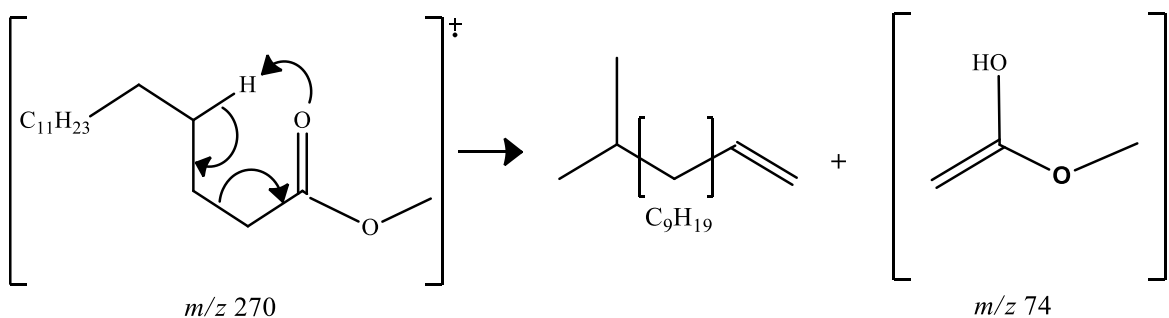
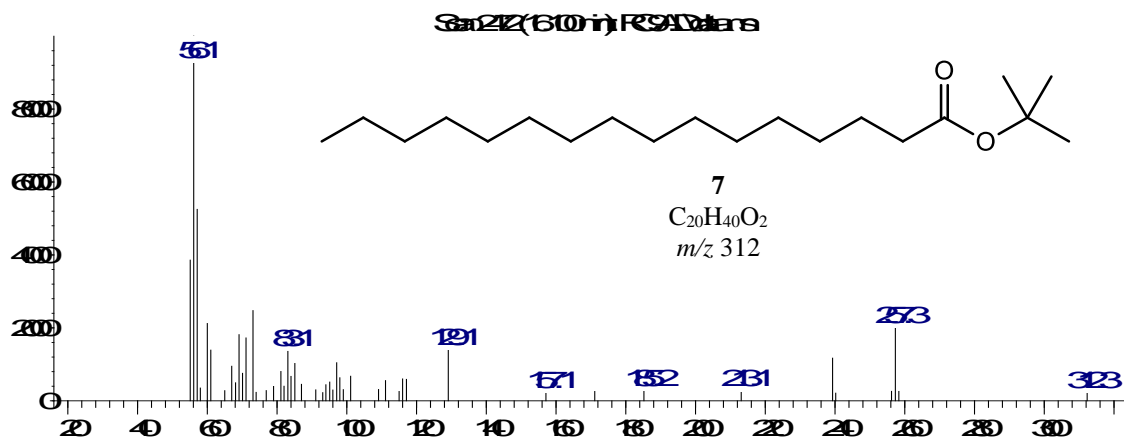


Figura 4.24 Formación del ion fragmento a m/z 74 por el reordenamiento de tipo McLafferty en el éster metílico del ácido 14-metilpentadecílico (6).

El metabolito **7** ($t_R = 16.10$ min) mostró por espectrometría de masas un ion molecular a m/z 312 sugiriendo una fórmula molecular $C_{20}H_{40}O_2$ y su patrón de fragmentación permitió identificarlo como éster 1,1-dimetiletílico del ácido palmítico (Figura 4.25). El espectro de masas del metabolito **7** mostró iones a m/z 213, 185, 157, 129, 101, correspondientes a las pérdidas de las cadenas alquílicas C_7H_{15} , C_9H_{19} , $C_{11}H_{23}$, $C_{13}H_{27}$, $C_{15}H_{31}$, $C_{17}H_{35}$, respectivamente (Figuras 4.25 y 4.26). También se observaron los iones fragmento a m/z 239 y 73, los cuales se explican por la ruptura en alfa al grupo carbonilo, el cual experimenta una pérdida de 73 unidades de masa. El ion a m/z 73 corresponde a la detección del ion terbutoxi (Figuras 4.25 y 4.27). Finalmente, la formación de los iones a m/z 116 y 285 correspondió al reordenamiento McLafferty experimentado por este metabolito (Figura 4.28) (Dayhuff & Wells, 2005; Wade, 2011; Silverstein, 2005).

Autos



na

Figura 4.25. Espectro de masas del éster 1,1-dimetiletílico del ácido palmítico (**7**).

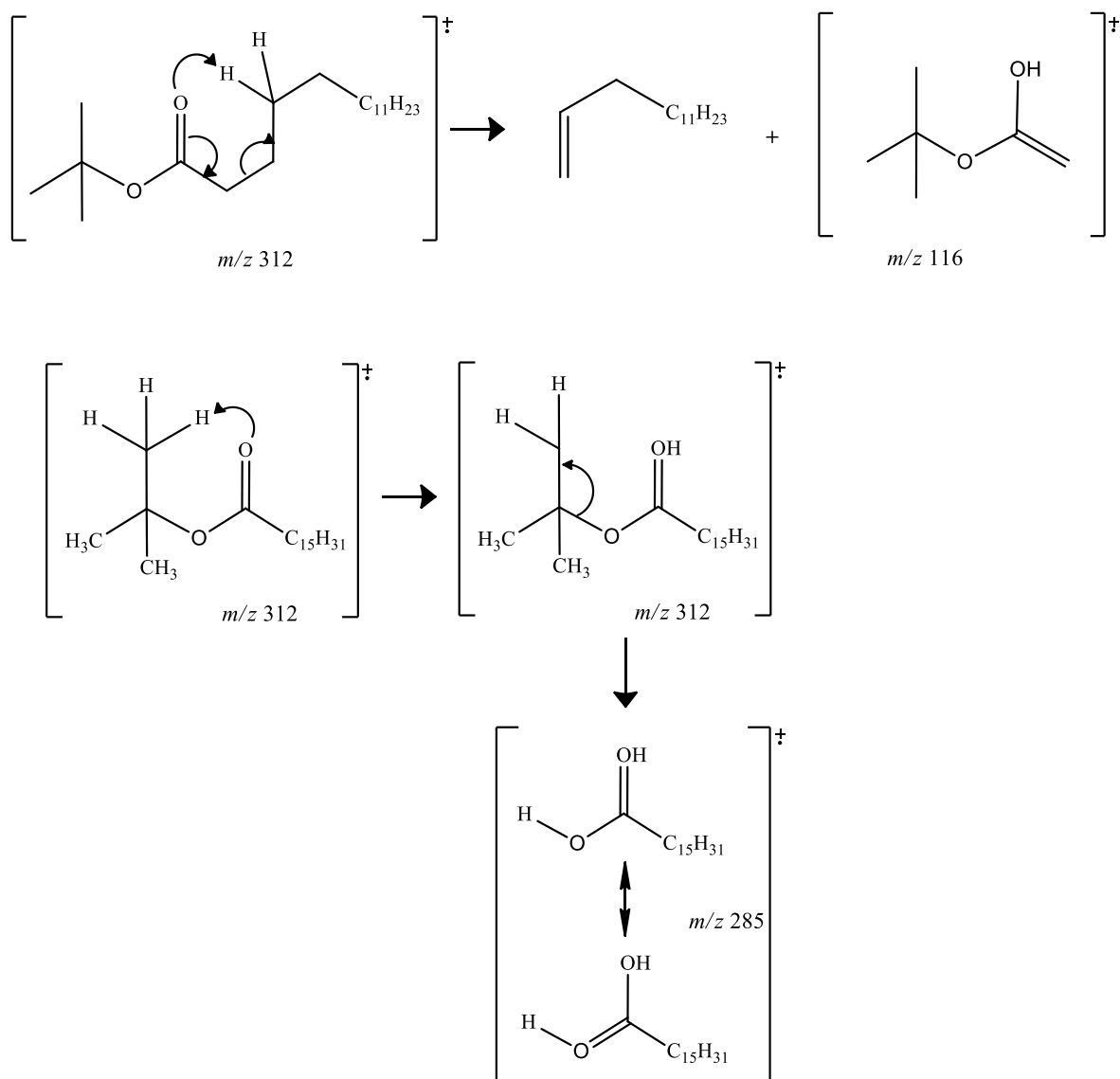


Figura 4.28 Formación de los iones fragmento a m/z 285 y 116 por el reordenamiento de tipo McLafferty en el éster 1,1-dimetileílico del ácido palmítico (7).

El metabolito **8** ($t_R = 16.21$ min) fue identificado como dotriacontano (un hidrocarburo lineal de 32 átomos de carbono) con base a su espectro de masas (Figura 4.29) y a su patrón de fragmentación de acuerdo a la base NIST05. El ion molecular de este metabolito es muy inestable por lo que generalmente no se observa o ligeramente aparece a m/z 450 sugiriendo una fórmula molecular C₃₂H₆₆. En el espectro de masas del metabolito **8** se detectaron iones fragmento a m/z 127, 99, 85, 71 y 57 correspondientes a las pérdidas de las cadenas alquílicas C₂₃H₄₇, C₂₅H₅₁, C₂₆H₅₃, C₂₇H₅₅, C₂₈H₅₇, respectivamente (Figuras 4.29 y 4.30).

Abundancia

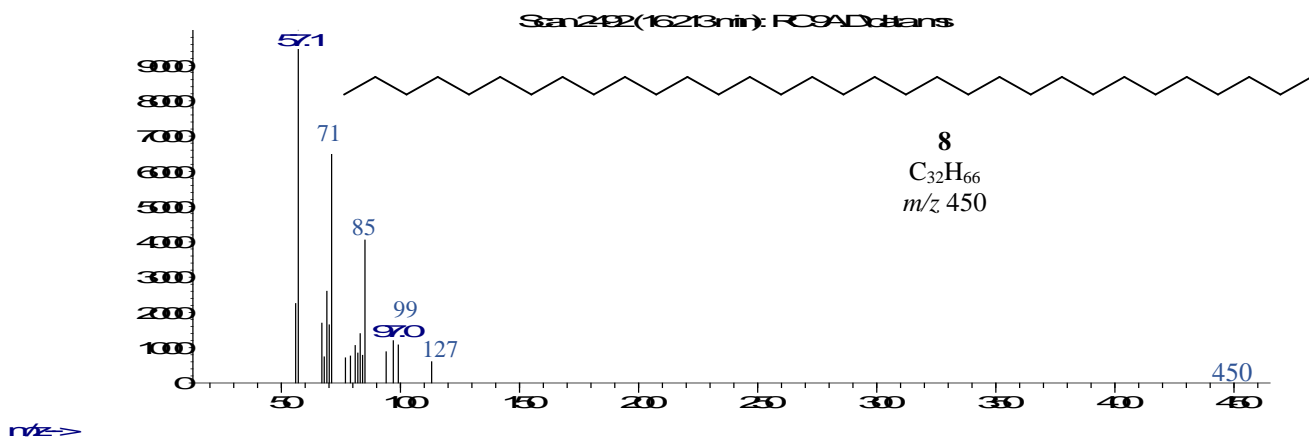


Figura 4.29. Espectro de masas del dotriacontano (8).

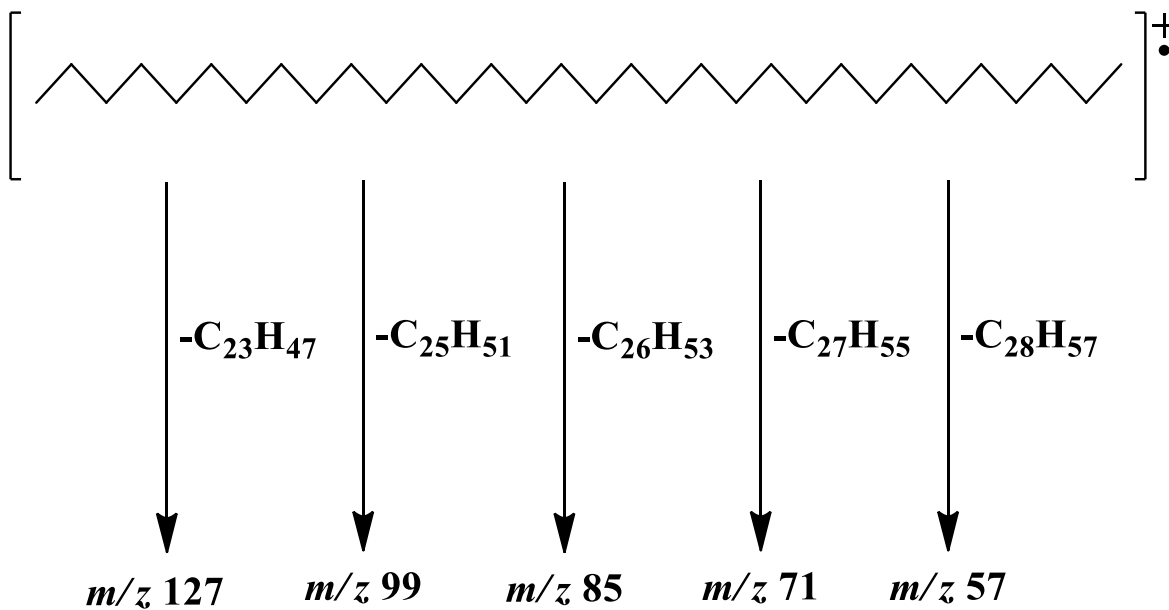


Figura 4.30 Fragmentación por espectrometría de masas del dotriacontano (8).

El metabolito **9** ($t_R = 17.52$ min) se identificó como un hidrocarburo de cadena larga, el heptadecano. Es común que los iones moleculares de este tipo de hidrocarburos no sean detectados por la estabilidad relativa demasiado baja, que en este metabolito corresponde a m/z 240 indicando una fórmula molecular $C_{17}H_{36}$. Los iones fragmento presentes en el metabolito **9** aparecen a m/z 155, 141, 113, 99, 85, 71 y 57, correspondientes a las pérdidas alquílicas de C_6H_{13} , C_7H_{16} , C_8H_{17} , C_9H_{19} , $C_{10}H_{21}$, $C_{11}H_{23}$, $C_{12}H_{25}$, $C_{13}H_{27}$, respectivamente (Figuras 4.31 y 4.32).

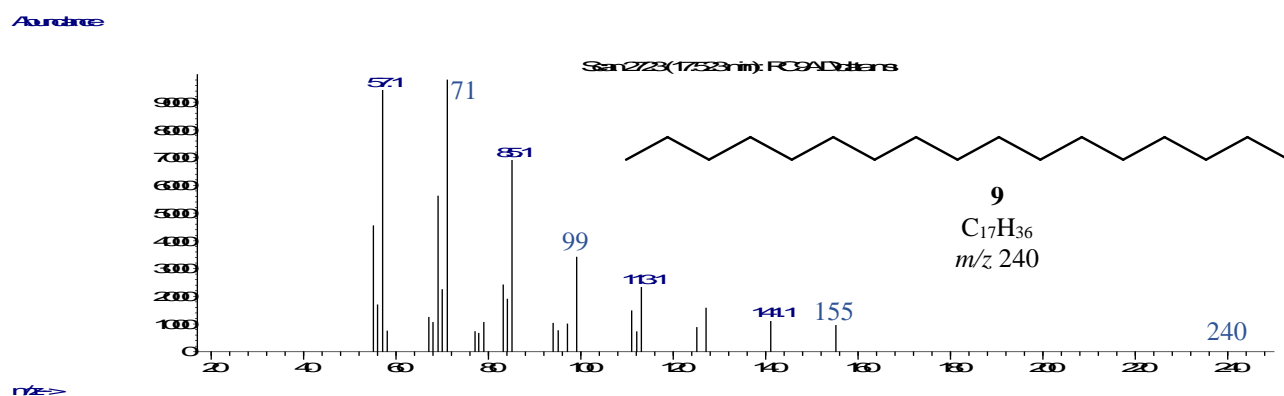


Figura 4.31 Espectro de masas del heptadecano (**9**).

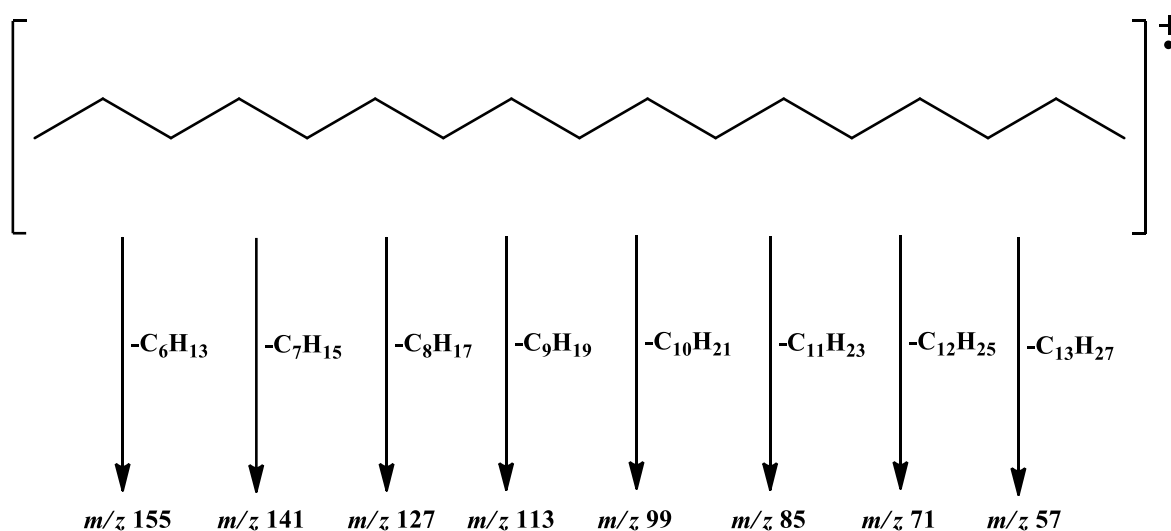


Figura 4.32 Fragmentación por espectrometría de masas del heptadecano (**9**).

El metabolito **10** ($t_R= 17.80$ min) presentó por espectrometría de masas (Figura 4.33) un ion molecular a m/z 340 sugiriendo una fórmula molecular de $C_{22}H_{44}O_2$. El patrón de fragmentación mostró un pico base a m/z 56 y los iones fragmento a m/z 267 y 101 correspondientes a rupturas en alfa y pérdidas de los grupos terbutoxilo (C_4H_9O) y heptadecilo ($C_{17}H_{35}$) respectivamente (Figura 4.34). El reordenamiento McLafferty del metabolito **10** (Figura 4.35), permitió la formación de los iones fragmento a m/z 116 y 285. Los datos de la espectrometría de masas antes mencionados permitieron identificar al metabolito **10** como el éster butílico del ácido esteárico (Dayhuff & Wells, 2005; Wade, 2011; Silverstein, 2005). El ácido esteárico es un ácido graso saturado de cadena larga, está formado por 18 átomos de carbono. También se le denomina ácido octadecanoico. Es abundante en todas las grasas vegetales y animales. Es semisólido y representa el 60% de los ácidos grasos saturados. Las principales fuentes de ácido esteárico son la carne, el pescado, los cereales y los lácteos. El ácido esteárico junto con los ácidos láurico, mirístico y palmítico, forma un importante grupo de ácidos grasos. A nivel industrial, el ácido esteárico es usado en la fabricación de velas, jabones y cosméticos. También se usa en ungüentos y muchos otros productos comerciales, como cremas de tocador, cremas evanescentes, alcohol solidificado y se utiliza junto con azúcar o jarabe de maíz como endurecedor de caramelos (Guzmán, 2011).

Ante

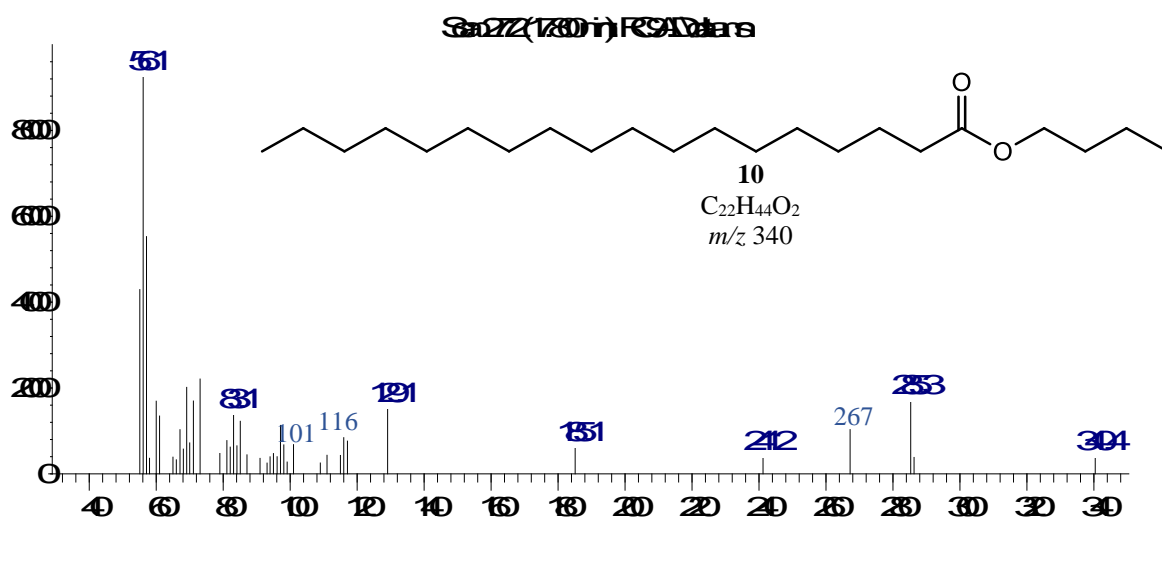


Figura 4.33. Espectro de masas del éster butílico del ácido esteárico (**10**).

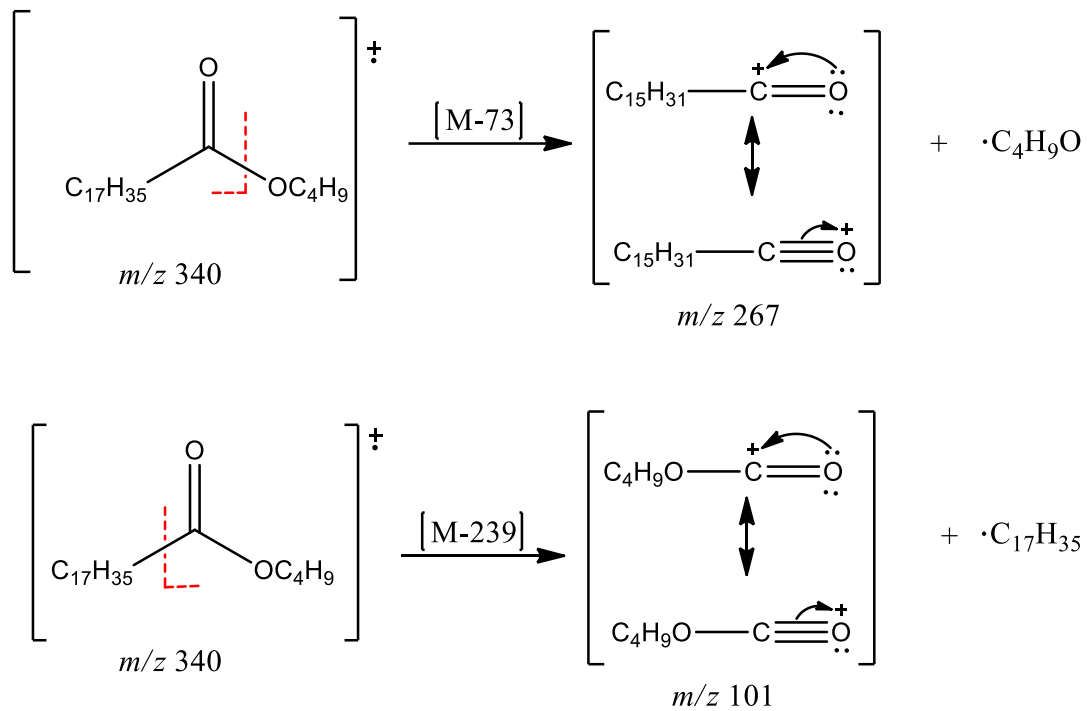


Figura 4.34 Ruptura en α característica éster butílico del ácido esteárico (**10**). Formación de los iones fragmento a m/z 267 y 101 por pérdidas de 73 y 239 unidades de masa, respectivamente.

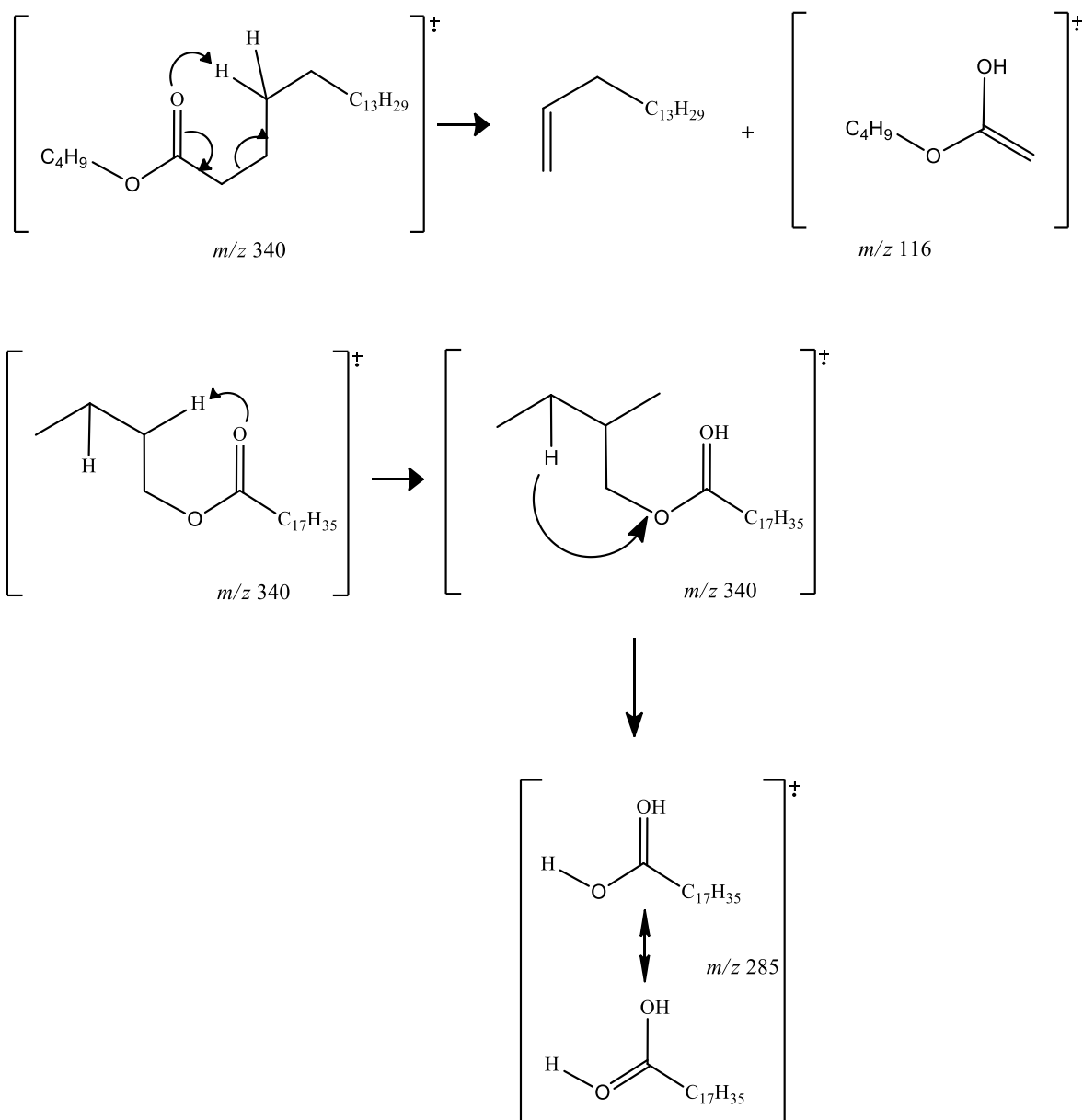
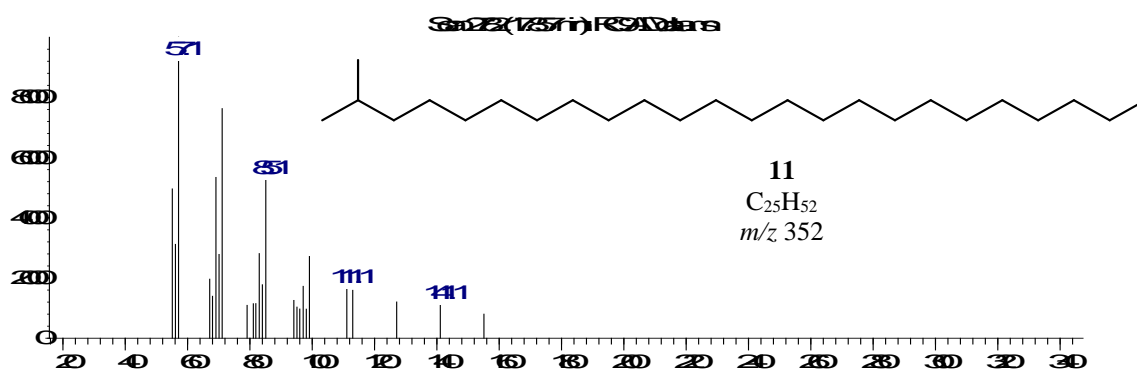


Figura 4.35 Formación de los iones fragmento a m/z 116 y 285 por el reordenamiento de tipo McLafferty en el éster butílico del ácido esteárico (**10**).

El metabolito **11** ($t_R = 17.85$ min) fue identificado como 2-metiltetracosano, un hidrocarburo lineal de 24 átomos de carbono con un metilo ramificado en la posición 2, con base a su espectro de masas (Figura 4.34) y a su patrón de fragmentación de acuerdo a la base NIST05. El ion molecular de este metabolito es muy inestable por lo que generalmente no se observa o ligeramente aparece a m/z 352 sugiriendo una fórmula molecular $C_{25}H_{52}$. En el espectro de masas del metabolito **11** se detectaron iones fragmento a m/z 155, 141, 99, 85, 71 y 57 correspondientes a las pérdidas de las cadenas alquílicas $C_{14}H_{29}$, $C_{15}H_{31}$, $C_{18}H_{37}$, $C_{19}H_{39}$, $C_{20}H_{41}$, $C_{21}H_{43}$, respectivamente (Figuras 4.29 y 4.30).

Avance



rt

Figura 4.36. Espectro de masas del 2-metiltetracosano (**11**).

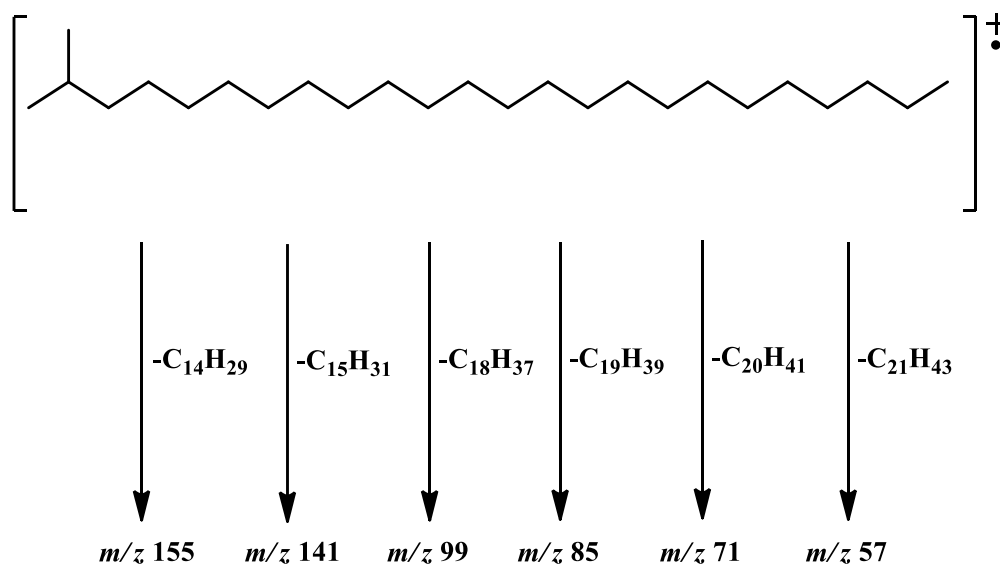


Figura 4.37 Fragmentación por espectrometría de masas del 2-metiltetracosano (**11**).

4.3.3.2 ANÁLISIS POR IR DE LA FRACCIÓN III

El análisis por IR de la fracción **III** (Figura 4.38) confirmó la presencia de algunos grupos funcionales de los metabolitos presentes en esta fracción. Se observaron dos bandas de tensión intensas a 2950 y 2850 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos característicos del enlace C-H de hibridación sp^3 . También se observó a 1710 cm^{-1} un estiramiento característico de carbonilo de ácido carboxílico (Silverstein, 2005; Wade, 2011).

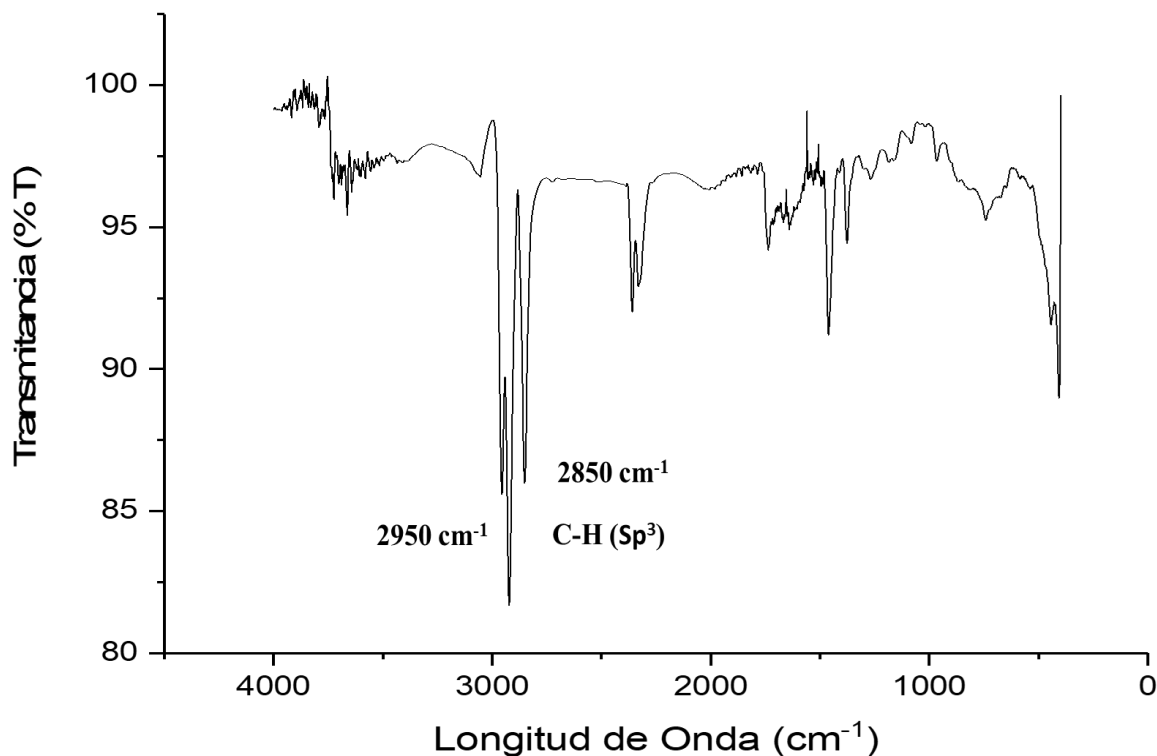
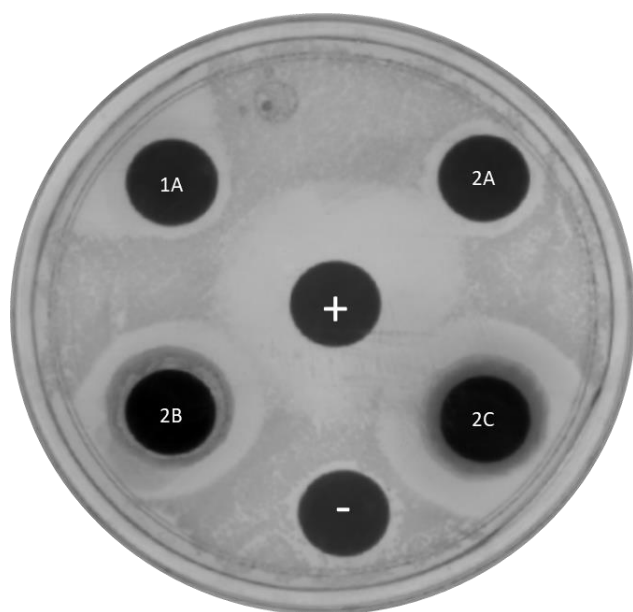


Figura 4.38 Espectro infrarrojo de la fracción **III**.

4.3.3.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

Posterior a las pruebas de identificación de los metabolitos, se llevó a cabo la determinación de la actividad antimicrobiana del polen colectado por la abeja *M. beecheii* por el método de difusión en disco donde se pudo observar que el extracto y las fracciones de partición (hexánica, clorofórmica y acetato de etilo) pudieron inhibir el crecimiento de *E.coli* ATCC 25922. En la figura 4.39 se puede observar los halos de inhibición con bordes nítidos, el cual

nos indica el efecto antibacteriano de los extractos de polen de abeja *M. beecheii* frente al agente patógeno *E. coli* ATCC 25922 en un periodo de incubación de 24 h (Figura 4.39).



MUESTRA	FRACCIÓN
RC-1A	MeOH
RC-2A	Hx
RC-2B	CHCl ₃
RC-2C	AcOEt
+	CIPROFLOXACINA
-	DMSO

Tabla 4.2. Extractos, fracciones y controles utilizados para la determinación de la actividad antibacteriana.

Figura 4.39 Actividad antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922 de los extractos y fracciones del polen de abeja *M. beecheii*.

Al comparar los diámetros obtenidos del extracto y las fracciones de partición evaluadas, se obtuvo que las fracciones de acetato de etilo (RC-2C) y clorofórmica (RC-2B) presentaron mayor tamaño de halo de inhibición respecto a las demás muestras y ligeramente menor con respecto al control positivo (ciprofloxacina). Posteriormente se evaluó el comportamiento de los extractos contra *E. coli* ATCC 25922 respecto al tiempo en una gráfica (Figura 4.40), obteniendo como resultados que la fracción de acetato de etilo (RC-2C) presenta una actividad antimicrobiana bactericida, ya que con paso del tiempo el halo de inhibición no disminuyó, el cual es un comportamiento característico de agentes antimicrobianos con efecto bactericida. Este efecto puede deberse a que en la fracción de acetato de etilo (RC-2C), con polaridad media-alta, exista la presencia de compuestos fenólicos o glucosilados, como la quercetina, kaempferol, pinocembrina, rutina, entre otros, de los cuales se ha visto su efecto inhibitorio contra diversos patógenos.

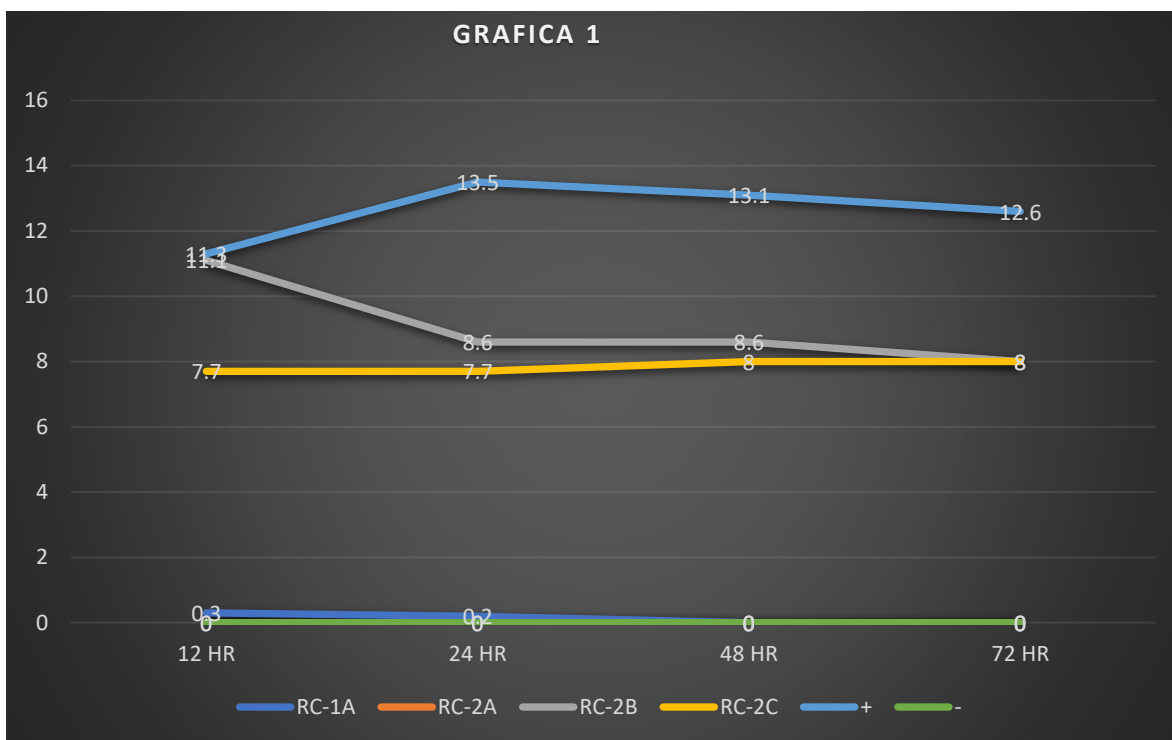


Figura 4.40. Determinación de la actividad antimicrobiana durante 74 h.

4.3.3.4 DISCUSION GENERAL

Como podemos observar, los principales metabolitos identificados en el polen de abeja *M. beecheii* fueron ácidos grasos (**1** y **3**), un esteroide (**2**), ésteres de ácidos grasos (**6**, **7** y **10**), alquenos (**4** y **5**) y alcanos de cadena larga (**8**, **9** y **11**). En el caso de los ácidos grasos y sus ésteres, las rupturas en alfa al grupo carbonilo y los reordenamientos McLafferty se pudieron observar cómo característicos de este tipo de metabolitos. En el caso de los alquenos y alcanos de cadena larga sus iones moleculares no se detectaron debido a que corresponden a carbocationes primarios, los cuales son sumamente inestables.

Algunos lípidos, incluidas las grasas, se usan para almacenar energía, pero la mayoría se usan para formar membranas de lípidos/proteínas (es decir, particiones que dividen los compartimentos intracelulares y separan la célula de su entorno). Los ácidos grasos se caracterizan por tener una región de la cabeza hidrofílica polar conectada a una cola larga hidrofóbica. Existen más de cien tipos diferentes de ácidos grasos, aunque los más comunes en las plantas son el ácido oleico y el ácido palmítico. En el caso de los metabolitos **1** y **3**

presentes en el polen de abeja *M. beecheii* se identificaron como ácidos grasos palmítico y mirístico, y los metabolitos **6**, **7** y **10** corresponden a derivados de los ácidos grasos pentadecílico (pentadecanoico), palmítico y esteárico.

Por otro lado, los metabolitos **4**, **5**, **8**, **9** y **11** en el polen de abeja *M. beecheii* se identificaron como hidrocarburos de cadena larga saturados (**8**, **9** y **11**) e insaturados (**4** y **5**). Los hidrocarburos corresponden a un pequeño grupo de productos naturales menos polares que contienen solo átomos de hidrógeno y carbono. Los hidrocarburos alifáticos son hidrocarburos de cadena lineal, que generalmente tienen un número impar de átomos de carbono, como resultado de la descarboxilación de sus equivalentes de ácidos grasos (Savage et al., 1996). Los hidrocarburos, en general, pueden estar saturados o insaturados. Cada enlace doble da como resultado dos átomos de hidrógeno menos en relación con la contraparte saturada (por lo tanto, cuatro átomos de hidrógeno menos para enlaces triples) y, por lo tanto, está en un estado de oxidación más alto. Pueden contener cadenas rectas, cadenas ramificadas, así como anillos. Al ser de naturaleza puramente orgánica, son altamente insolubles en agua, es decir, son "grasientos". Con raras excepciones, como los compuestos altamente halogenados, son menos densos que el agua. En las plantas vivas, los hidrocarburos saturados se distribuyen universalmente como recubrimientos cerosos (ceras cuticulares) en las hojas y como ceras para cutículas en las superficies de los frutos (Hamilton, 1995; Eglinton & Hamilton, 1967). Los ejemplos típicos incluyen n-nonacosane $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{27}\text{CH}_3$ y hentriacontane $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{29}\text{CH}_3$. Los hidrocarburos insaturados más grandes también son comunes como ceras vegetales. Se han detectado cantidades excepcionalmente altas de alquenos en polen de centeno (*Secale cereale*), pétalos de rosa (*Rosa* spp) y caña de azúcar (*Saccharum* spp.). A medida que aumenta la longitud de la cadena y el grado de insaturación, los hidrocarburos se vuelven cerosos y luego sólidos a temperatura ambiente. Las ceras pueden ser hidrocarburos de cadena larga o ésteres de ácidos grasos (Cseke et al., 2006).

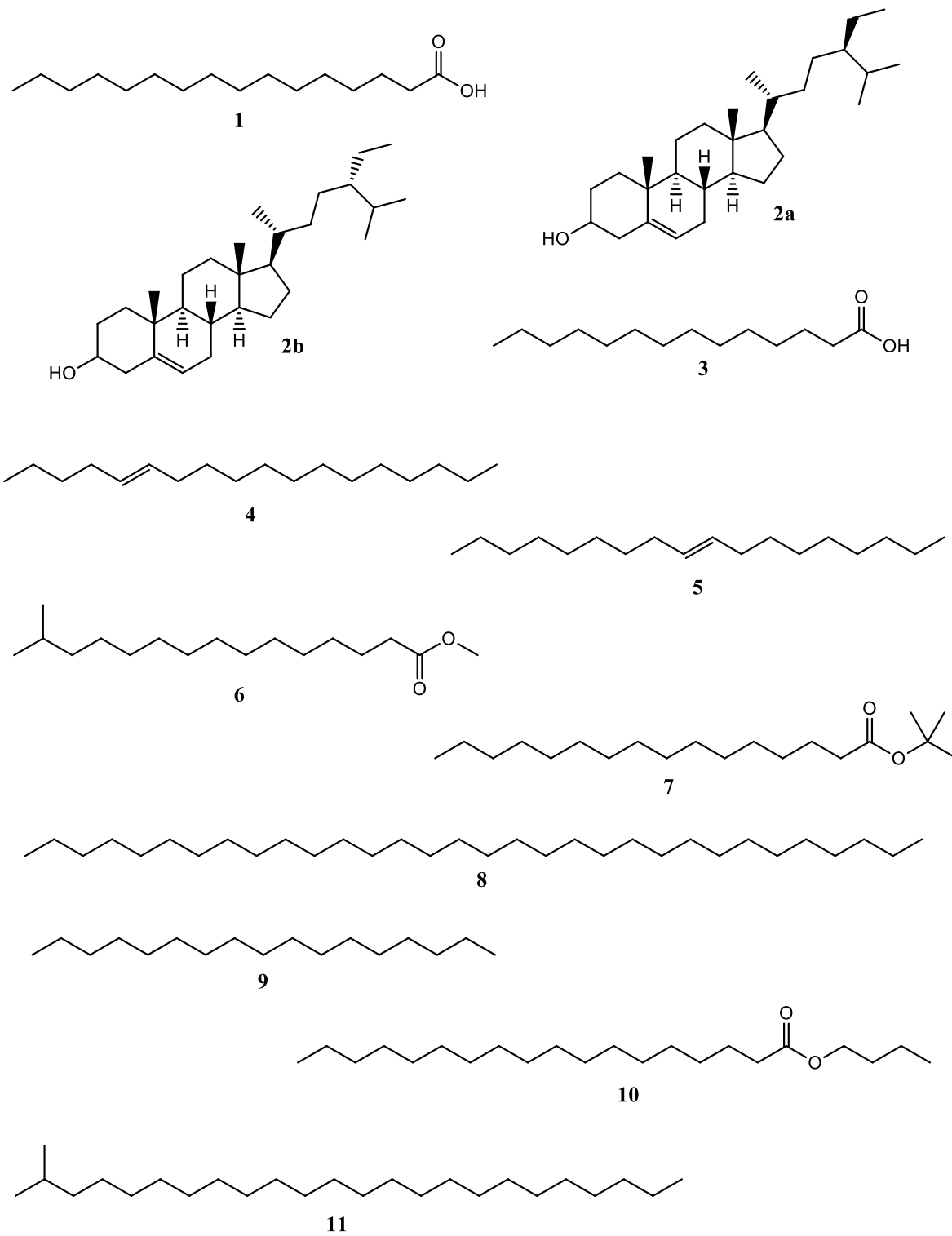


Figure 4.41 Compuestos identificados en el polen de *M. beechii*.

Tabla 4.2 Compuestos identificados en el polen de abeja *M. beecheii*

Número	t_R (min.)	Metabolito	Peso molecular	Formula molecular
1	14.00	Ácido palmítico	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
2	26.60	β-Sitosterol/γ-Sitosterol	414	C ₂₉ H ₅₀ O
3	11.93.	Ácido mirístico	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
4	10.02	5-(<i>E</i>)-Octadeceno	252	C ₁₈ H ₃₆
5	12.29	9-(<i>E</i>)-Octadeceno	252	C ₁₈ H ₃₆
6	13.66	Éster metílico del ácido 14- metilpentadecílico.	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
7	16.10	Éster 1,1-dimetileílico del ácido palmítico.	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
8	16.21	Dotriacontano	450	C ₃₂ H ₆₆
9	17.52	1-Heptadecano	240	C ₁₇ H ₃₆
10	17.80	Éster butílico del ácido esteárico	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
11	17.85	2-Metiltetracosano	352	C ₂₅ H ₅₂

CAPÍTULO V

5 CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

La búsqueda de metabolitos a partir de fuentes naturales representa un gran potencial para el desarrollo de productos de interés biotecnológico, centrándose principalmente en regiones ricas en biodiversidad.

México es un país con una extensa riqueza natural y la península de Yucatán se ha caracterizado por su flora diversa debido a las condiciones climáticas y topográficas de la región que permiten una amplia distribución y densidad de plantas.

La investigación de la composición química del polen colectado por las abejas es de suma importancia, dado que, los metabolitos presentes en este material biológico representan una fuente rica de moléculas con posibles propiedades biológicas interesantes que le confieren un valor agregado a este producto de la colmena. Dado lo anterior, en el presente trabajo, se llevó a cabo el estudio de los metabolitos presentes en el polen colectado por la abeja *M. beecheii* del estado de Yucatán, en el cual se identificaron un total de once metabolitos, incluyendo ácidos grasos [ácido palmítico (**1**) y ácido mirístico (**3**)], ésteres de ácidos grasos [éster metílico del ácido 14-metilpentadecílico (**6**), éster 1,1-dimetiletílico del ácido palmítico (**7**) y éster butílico del ácido esteárico (**10**)] alcanos [dotriacontano (**8**), heptadecano (**9**) y 2-metiltetracosano (**11**)], alquenos [5-(*E*)-octadeceno (**4**) y 9-(*E*)-octadeceno (**5**)], así como un esteroide [β -sitosterol o γ -sitosterol (**2**)]. Este trabajo representa el primer estudio de los metabolitos presentes en el polen colectado por la abeja *M. beecheii* en el estado de Yucatán y este conocimiento revela a las variedades de plantas que participan en la elaboración de dicho polen de abeja.

La identificación de los metabolitos presentes en el polen colectado por la abeja *M. beecheii* permitirá conocer, además de su estructura química, su probable potencial para el desarrollo de nuevos productos biotecnológicos. Sin embargo, además de la búsqueda de nuevos metabolitos con estructuras novedosas, este trabajo pretende contribuir de manera importante a la conservación de la flora de la península de Yucatán, otorgando a las diferentes especies involucradas en el polen de abeja, un valor agregado que hasta ahora no sido reconocido. Se ha sugerido que el descubrimiento de metabolitos en especies poco conocidas y estudiadas, podría contribuir a la protección de ecosistemas ya que, si se demuestra su valor y su diversidad biocultural, se pondría más atención a su conservación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abouda, Z., Zerdani, I., Kalalou, I., Faid, M., & Ahami, M. T. (2011). The Antibacterial Activity of Moroccan Bee Bread and Bee-Pollen (Fresh and Dried) against Pathogenic Bacteria. *Research Journal of Microbiology*, 6, 376–384.
2. Abubakar, M. & Majinda, R. (2016). GC-MS analysis of and preliminary antimicrobial activity of *Albizia adianthifolia* (Schumach) and *Pterocarpus angolensis* (DC). *Medicines*. 3:1-9. Doi:10.3390/medicines3010003.
3. Acereto, J. A. G. (2012). La importancia de la meliponicultura en México, con énfasis en la Península de Yucatán, 5, 8.
4. Acereto, J. Á. G., & Euán, J. J. Q. (Sf). Producción tradicional de miel: abejas nativas sin aguijón (trigonas y meliponas), 3.
5. Alday, N. J. E. (2012). Análisis del efecto de la temporalización sobre el origen botánico, la composición química y actividades biológicas de propóleos de Ures, Sonora. (Tesis de posgrado).
6. Almeida, M. L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S. & Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J Food Compos Anal* 18:105–111.
7. Almeida, M. L., Pamplona, L. C., Coimbra, S., Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J Food Compos Anal* 18:105–111.
8. Aloisi, P. V., & Ruppel, S. (2014). Propiedades bioactivas y nutricionales del polen apícola de la provincia de Chubut, Argentina. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 40, 296–302.
9. Alvarez, S. J. M. (2017). Bee Products - Chemical and Biological Properties. DOI 10.1007/978-3-319-59689-1.
10. Angelo P. M., Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz* 66:232–240.
11. Balamurugan, R., Duraipandiyar, V. & Ignacimuthu, S. (2011). Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 667:410.
12. Balamurugan, R., Stalin, A. & Ignacimuthu, S. (2012). Molecular docking of γ -sitosterol with some target related to diabetes. *Eur. J. Med. Chem.* 47:39.
13. Barbosa, S., Silvestre, A., Simões, M. & Estevinho, M. (2006). Composition and antibacterial activity of the lipophilic fraction of honeybee pollen from native species of Montesinho Natural Park. *Int J Agr Res* 1:471–479-
14. Belmonte, J., & Roure i Nolla, J. M. (2002). *Polinosis: polen y alergia*. Barcelona MRA ediciones: Laboratorios Menarini.
15. Bogdanov, S. (2012). The bee pollen book: chapter 1. Recuperado de <http://www.bee-hexagon.net>.
16. Bogdanov, S. (2011). *The Bee Pollen Book*. Bee Product Science.
17. Boik, J. (2001). Cancer at the Cellular Level / Clinical Considerations. Part I and part III in *Natural Compounds in Cancer Therapy. Promising Nontoxic Antitumor Agents from Plants & and Other Natural Sources*. Quality Books. 1-33, 251-267.

18. Borguini, R. G. (2006). Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6133/tde-14082006-153722/pt-br.php>.
19. Brazil, (2001). Technical regulations of identity and quality of bee venom, beeswax, royal jelly, lyophilized royal jelly, bee pollen, propolis and propolis extract. Union Official Diary, section 1.
20. Cabrera C, Montenegro G (2013) Pathogen control using a natural Chilean bee pollen extract of known botanical origin. *Cien Investig Agrar* 40:223–230.
21. Calviello, G., Serini, S. & Piccioni, E. (2007). n-3 polyunsaturated fatty acids and the prevention of colorectal cancer: molecular mechanisms involved. *Curr Med Chem* 14:81–89.
22. Campos, M., Bogdanov, S., Almeida, M., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J Apicult Res Bee World* 47:156–163.
23. Campos, M., Markham, K., Mitchell, K. & Cunha, A. (1997). An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochem Anal* 8:181–185.
24. Campos, M., Webby, R., Markham, K., Mitchell, K., & Cunha, A. (2003). Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *J Agric Food Chem* 51:742–745.
25. Carl, J., Richard, V., Mandeep, R. & Hector, O. (2009). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol* 54:585–594.
26. Carpes, S., Prado, A., Moreno, I. A. M., Mourão, G. B., & Masson, S. M. (2008). Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil. *Quimica Nova*, 31, 1660–1664.
27. Carpes, S. T. (2008). Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil.
28. Cheatham, C. L., Colombo, J. & Carlson, S. (2006). n-3 fatty acids and cognitive and visual acuity development: methodologic and conceptual considerations. *Am J Clin Nutr* 83:1458S–1466S.
29. Silva, T., Celso, A., Cámara, I., Antonio, C. & Lins, I. (2009). Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). 81:2.
30. Chmielewski, W. (2003). Insects and mites y pests of beeybread. Stored in honey combs. *Journal of apiculture Science*, 47(2), 87-90.
31. Claramunt, V., Farrán, M., López, G., Pérez T. M. & María G. D. S. (2013). *Química bioorgánica y productos naturales*. Universidad Nacional de Educación a Distancia Madrid. ISBN electrónico: 978-8436266245.
32. Cunha, A.P. & Roque, O. R. (2009). Antibióticos de origem natural, compostos semi-sintéticos e sintéticos com actividade antibacteriana e antibióticos citotóxicos. *Farmacognosia e fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Benkian, 608-642.

33. Daoud, A., Malika, D., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafgui, K. & Kadri, A. (2015). Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arab J Chem*. doi:10.1016/j.arabjc.2015.07.014.
34. Dayhuff, L. E. & Wells, M. J. M. (2005). Identification of fatty acids in fishes collected from the Ohio River using gas chromatography–mass spectrometry in chemical ionization and electron impact modes. *Journal of Chromatography A*, 1098(1-2):144–149. Doi:10.1016/j.chroma.2005.08.049
35. Denisow, B. & Denisow, P. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. Society of Chemical Industry.
36. Domínguez, V. D., Gil, D. B., Hernández, M. T. & González, G. D. (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybeecollected pollen. *Int J Food Sci Tech* 46:2204–2211.
37. Ellis, A., Ellis, J. D., O'Malley, M. K., & Nalen, C. M. Z. (2010). The Benefits of Pollen to Honey Bees.
38. Ellis, J. D. E. (2017). The Benefits of Pollen to Honey Bees. Recuperado el 14 de abril de 2018, a partir de <http://edis.ifas.ufl.edu/in868>.
39. Fatrcová, K., Nôžková, J., Kačániová, M., Máriássyová, M., Rovná, K. & Stričík, M. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *J Environ Sci Health B*. 48:133–138.
40. Fernández, C. G. C., Tapia M. J. L., Duno, R, Ramirez, M., Can, I., Hernández, A., y Castillo, A. (2012). La flora de la Península de Yucatán Mexicana: 250 años de conocimiento florístico. *CONABIO. Biodiversitas*, 101:6-10.
41. Fernández G. C., Duno, R., Ramírez, M., & Tapia, M. (2010). Plantas vasculares. *Biodiversidad*. 175-178.
42. Fieser, L.F. & Fieser, M. (1949). *Natural Products Related to Phenanthrene*. New York: Reinhold.
43. Flores G. J. S., (2010). *Flora melífera: Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán*.
44. Freire K. R. L., Lins, A. C. S., Dórea, M. C., Santos F. A. R., Cámara, C. A. & Silva, T. M. S. (2012). Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. *Molecules* 17:1652–1664.
45. Fuenmayor, C., Zuluaga, C., Díaz, C., Quicazán, M., Cosio, M. & Mannino, S. (2014). Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Rev MVZ Córdoba* 19:4003–4014.
46. Funari, S. R. C., Rocha, H. C., Sforcin, J. M., Filho, H. G., Curi, P.R. & Gomes, D. (2003). Composições bromatológica e mineral do pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. *Arch Latinoam Prod Anim*, 11:88–93.
47. Funari, S. R. C., Rocha, H.C., Sforcin, J. M., Filho, H. G., Curi, P. R., Gomes Dierckx, S. M. A. (2003). Composições bromatológica e mineral do pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. *Arch Latinoam Prod Anim* 11:88–93.

48. Godara, P., Dulara, B. K., Barwer, N. & Chaudhary, N. S. (2019). Comparative GC-MS Analysis of Bioactive Phytochemicals from Different Plant Parts and Callus of *Leptadenia reticulata* Wight and Arn. *Pharmacognosy Journal*. 11(1):129-140. Doi:10.5530/pj.2019.1.22.
49. Graikou, K., Kapeta, S., Aligiannis, N., Sotiroidis, G., Chondrogianni, N., Gonos, E. & Chinou, I. (2011). Chemical analysis of Greek pollen, Antioxidant, antimicrobial, and proteasome activation properties. *Chem. Cent.* doi:10.1186/1752-153X-5-33.
50. Grasselli, J. G. (1973). "CRC spectral Data and physical constant for organic compounds" CRC press. Cleveland, Ohio.
51. Guzmán, M., Balboa, C., Vandame, R., Albores, M & González-Acereto, J. (2011). Manejo de las abejas nativas sin aguijón en México: *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona mexicana*. 8-16.
52. Hanson, J. (2003). The Classes of Natural Products and Their Isolation. Ch 1. In *Natural Products: The Secondary Metabolites*. The Royal Society of Chemistry (Ed).1-33. Cambridge, UK
53. Herrero, G. F. (2004). Las abejas y la miel. *Cartilla de divulgación*, 16, 5-77.
54. Huang, W. Y., Zhang, H. C., Liu, W. X., Li, C. Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J Zhejiang Univ* 13:94–102.
55. Human, H. & Nicolson, S. W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* 67:1486–1492.
56. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2012). *La apicultura en la Península de Yucatán: Censo Agropecuario 2007*. México: INEGI.
57. Klaus, B. (1962). "Mass spectrometry- organic chemical application" McGraw-Hill Book "Annual report on NMR spectroscopy". 8:199-226.
58. Komosinska, V. K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–6.
59. Krishnan, K. R., James, F. & Mohan, A. (2016). Isolation and Characterization of n-Hexadecanoic Acid from *Canthium parviflorum* Leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 8:614-617.
60. Leblanc, B. W., Davis, O. K., Boue, S., Delucca, A., Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chem* 115:1299–1305.
61. López, V. J. P., Arrubla, V. J. P. & Guerrero, G. E. (2009). Estandarización de análisis de metilésteres de ácidos grasos por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia et Technica*. 3(43):228-232. doi: <http://dx.doi.org/10.22517/23447214.2319>.
62. Manning, R. (2001). Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World*. 82:60–75.
63. Manual básico de apícola. Programa nacional para el control de la abeja africana, (2014). SAGARPA, Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.

64. Mărgăoan, R., Mărghitas, L. A., Dezmirean, D. S., Mihai, C. M. & Bobis, O. (2014). Los orígenes botánicos predominantes y secundarios del polen influyen en el perfil de carotenoides y ácidos grasos en el polen fresco recolectado por las abejas. *Anim Sci Biotechnol* 67:254–259.
65. Mărghitas, L. A., Stanciu, O. G., Dezmirean, D. S., Bobis, O., Popescu, O. & Bogdanov, S. (2009). In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chem* 115:878–883.
66. Maurice, M. B., Charles, H. D., Edward, J. V. L & Joan, D. W. (1954). Lowering of serum cholesterol by the administration of a plantsterol. *Circulation*. 10(8), 201-206.
67. Melo, A. (2015). Perfil químico e microbiológico, cor, análise polínica e propriedades biológicas do pólen apícola desidratado. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-18122015-142742/ptbr.php>.
68. Melo, I., Freitas, A. S., Barth, O. M., Almeida, M. L. B. (2009). Relação entre a composição nutricionale a origem floral de pólen apícola desidratado. *Rev Inst Adolfo Lutz* 68:346–353.
69. Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49, 1096–1101.
70. Morrissey, J. (2009). Biological Activity of Defence-Related Plant Secondary Metabolites, Ch. 13. in *Plant-derived Natural Products*, Springer (Ed). 283-299. Cork, Ireland.
71. Nagai, T., Nagashima, T., Myoda, T. & Inoue, R. (2004). Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Die Nahrung*, 48, 226–229.
72. Negri, G., Teixeira, E. W., Alves, M., Moreti, A., Otsuk. I. P., Borguini, R. G., (2011). Hydroxycinnamic acid amide derivatives, phenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from Southeast Brazil. *J Agric Food Chem*, 59:5516–5522.
73. Nieto, A. L. P. (2005). Abejas ancestrales, una mirada a la apicultura en Yucatán, 6.
74. Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X. & Estevinho, L. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. *Int J Mol Sci* 13:11173–11187.
75. Oliveira, K., Moriya, M., Azedo, R., Almeida, M., Teixeira, E. & Alves., M. (2009). Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. *Quím Nova* 32:1099–1102.
76. Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Féas, X. & Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of comercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem Toxicol*, 63:233–239.
77. Pereira, F. M., Lopes, M. T. R., Camargo, R. C. R. & Vilela, S. L. O. (2013). Produção de mel. Recuperado de <http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>.
78. Pérez, S. J. E., & Duno, R. (2015). *Herbario CICY* 7: 76–80. http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/. ISSN: 2395-8790.

79. Pretsch, E. B. A. (2000). A Structure determination of organic compounds table of spectra data. Springer- Verlag. Berlin Heidelberg, 71-150.
80. Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular: Review. *Nutr Hosp*, 27(1), 76-89.
81. Rebelo, K. S., Ferreira, A. G., & Carvalho, G. A. (2016). Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. *Ciência Rural*, 46, 927–932.
82. Ringuelet, J. & Viña, S. (2013). *Productos naturales vegetales*. 1a ed. La Plata: Editorial de la Universidad La Plata. ISBN: 978-950-34-0971-8.
83. Rzepecka, S. A., Stojko, J., Kurek, G. A., Górecki, M., Kabała, A., Kubina, R. & Buszman, E. (2015). Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. *Molecules*, 20, 21732–21749.
84. Perini, J., Stevanato, F., Sargi, S. C., Visentainer, J., Dalalio, M. & Matshushita, M. S. (2010). Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Rev. Nutr.* 23:1075–1086.
85. Saavedra, K. I. C., Rojas, C. I. & Delgado, G. E. P. (2013). Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque – Perú). *Rev Chil Nutr* 40:71–78.
86. Santana, H. A. A. (2019). Triterpenos pentacíclicos y otros metabolitos identificados en el propóleo de *Melipona beecheii* colectado en el municipio de maní Yucatán. (Tesis de pregrado). Instituto Tecnológico de Mérida, Mérida, México.
87. Shower, M. B., Ali, S. M., Abdellatif, M. A. & El-Refai, A. A. (1987). Biochemical studies of bee-collected pollen in Egypt 2. Fatty acids and non-saponifiables. *J Apic Res* 26:133–136.
88. Silva, T., C. Camara, A. Lins, J. Barbosa-Filho, E. Silva, and B. Freitas. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J. Food Compos. Anal.* 19(6-7): 507–511.
89. Silveira, T. A. (2012). Caracterização sazonal do pólen apícola quanto à origem botânica, aspectos físico-químicos e elementos traços como bioindicadora de poluição ambiental. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-20032012-090016/pt-br.php>. Accessed 26 Feb 2017.
90. Silverstein, R. M., Webster, F. X. & Kiemle., D. J. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds*, New York, United Statet: John Wiley & Sons, Inc.
91. Sousa, M. S. B., Vieira, L. M. & Lima., A. (2011). Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Braz J Food Technol* 14:202–210.
92. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7:65–74.
93. Zuluaga, D. C. M. (2015). Valorización de polen apícola como alimento mediante el desarrollo de un proceso físico o biotecnológico. Universidad Nacional de Colombia Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Facultad de Ingeniería. Bogotá D.C., Colombia.

94. Villanueva, G. R. (2002). Polliniferous plants and foraging strategies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the Yucatan Peninsula. *Rev. Biol. Trop.* 50(3-4):1035-44.
95. Villanueva, G. R., Buchmann, S., Donovan, A. J., & Roubik D. (2005). Crianza y manejo de la abeja Xunancab en la Península de Yucatán. *El Colegio de la Frontera Sur: University of Arizona.*
96. Vit, P., Santiago, B., Pedro, S., Ruíz, J., Maza, F., Peña, V. & Pérez, E. (2016). Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. *Emirates Journal of Food and Agriculture.* 28(2):78-84.
97. Wade, L. G. (2011). *Química orgánica.* 2(7). Ciudad de México, México: Pearson Educación.
98. Wade, L. G. (2011). *Química orgánica. Volumen 2 (7a ed).* Ciudad de México, México: Pearson Educación.
99. Xu, X., Dong, J., Mu, X. & Sun, L. (2011). Supercritical CO₂ extraction of oil, carotenoids, squalene and sterols from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) bee pollen. *Food and Bioprod Process* 89:47–52.
100. Xu, X., Sun, L., Dong, J. & Zhang, H. (2009). Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innov Food Sci Emerg Technol* 10:42–46.
101. Yakubu, M. B., Yusuf, J. & Gambo J. B. (2014). Isolation of Stigmast- 4 -ENE-3-One and Gamma-Sitosterol from the Aerial Part of *Synedrella Nodiflora* Linn (Asteraceae). *Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* 9(5):74-77.
102. Yang, K., Wu, D, Ye, X., Liu, D., Chen, J. & Sun, P. (2013). Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *J Agric Food Chem* 61:708–718.