



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

“Caracterización nutricional, origen floral y evaluación antibacteriana de polen de *Apis mellifera* L. recolectado en la zona centro del estado de Yucatán”.

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.

PRESENTA:

Q.F.B. JAIR JESÚS GONZÁLEZ CHAN

ASESOR:

DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ

COASESOR:

DRA. YOLANDA BEATRIZ MOGUEL ORDOÑEZ

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

21 FEBRERO 2018



DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-050/2018

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

MÉRIDA, YUCATÁN A 08 DE FEBRERO DE 2018

C. GONZÁLEZ CHAN JAIR JESÚS.
Pasante de Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología
P r e s e n t e.

Dé acuerdo al fallo emitido por su asesor la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, co-asesorada por la Dra. Yolanda Beatriz Moguel Ordoñez y la comisión revisora integrada por el Dr. Denis Israel Magaña Ortiz y el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra, 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:

"CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL, ORIGEN FLORAL Y EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE POLLEN DE *Apis mellifera* L. RECOLECTADO EN LA ZONA CENTRO DEL ESTADO DE YUCATÁN"

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES

M.C. DANTEL ARCÁNGEL LÓPEZ SAURI
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
DALs/ija



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



DEDICATORIAS

A mis padres

A mi madre Imelda Margarita Chan Balan, porque a pesar de no comprender lo que es este mundo y los sacrificios que implica, me has apoyado en cuanto has podido y sé que siempre lo harás. Gracias por recordarme que el esfuerzo, la dedicación y el amor a Dios son las armas que necesito para llegar a donde quiera.

A mi padre Antonio González Pech, en estos momentos que son tan cercanos a la fecha tu partida, aún hoy te sigo recordando más que lo que hacía ayer. Tu amor para con tu familia y tus hijos siguen tan presente como aquel último abrazo que nos distes. Siempre te llevaré en mis recuerdos y en el corazón.

A mi hermano

Guillermo Antonio González Chan porque juntos seguiremos saliendo adelante y por nos seguiremos esforzando a llegar lo más alto posible. Gracias por darme la alegría de ser tío y siempre los voy a querer.

A mi sobrino

Porque en ti puedo ver el amor de Dios hacia nuestra familia. Verte crecer es mi más grande bendición, tu vida ha sido un regalo para nosotros.

A Dios

Siempre eres mi pilar y mi fuerza. Nunca me sueltes de tus manos, aunque yo sienta que desfallecer.

AGRADECIMIENTOS

A mis familiares por estar al pendiente y por forjar en mí las ganas de superación.

A mis amigos, son tantos que no podría enlistarlos, gracias por los momentos de convivencia dentro y fuera de la institución, aquellos que me escuchaban cuando más lo necesitaba y que me dedicaron un poco de su tiempo para animarme. Aquellos que conocí en este camino y otros que siempre han estado ahí apoyándome.

A mi generación de maestría, yo creo que sin ustedes esto no lo hubiera disfrutado tanto como lo hicimos, las vivencias y experiencias no se olvidarán.

Al comité revisor por sus observaciones y el tiempo dedicado.

A mis directoras de tesis **Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez** y **Dra. Yolanda Beatriz Moguel Ordóñez** por guiarme en esta experiencia, por el tiempo invertido, por las enseñanzas y por la paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

Al **M. en C. Jesús Manuel Ramón Sierra**, **Dr. Jesús Alejandro Yam Puc**, **Dra. Jessica Martínez A.** y **Dr. Jorge Carlos Ruiz Ruiz** porque también fueron parte significativo en este proceso.

Al Laboratorio de Microbiología Aplicada y Molecular (**Tecnológico de Mérida**), Laboratorio de Alimentos, Biotecnología, Fitopatología y Geomática del **INIFAP (Campo Experimental Mococho)** y Laboratorio de Medicina Regenerativa 2 (**Universidad de Desarrollo - Clínica Alemana en Santiago de Chile**) por las facilidades para realizar el trabajo experimental. Al Conacyt por la beca otorgada para los estudios de maestría.

Índice

RESUMEN.....	1
Capítulo 1 INTRODUCCIÓN	3
Capítulo 2 MARCO TEÓRICO	5
2.1. Flora en México y Yucatán	6
2.2. Plantas nectaríferas y poliníferas importantes en la región de Yucatán	8
2.3. Historia de la apicultura en Yucatán	12
2.4. <i>Apis mellifera</i> L.....	12
2.4.1. La colmena	13
2.4.2. Los productos de la colmena	14
2.5. Las abejas y su alimentación.....	16
2.5.1. Comportamiento de pecoreo.....	16
2.5.2. Polen	17
2.5.2.1. Composición química	18
2.5.2.2. Morfología.....	19
2.5.2.3. Producción y comercialización en Yucatán	23
2.6. Antioxidantes y fitoquímicos	25
2.6.1. Compuestos fenólicos.....	26
2.6.2. Mecanismo antimicrobiano de fitoquímicos.....	28
2.7. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	30
2.7.1. <i>Escherichia coli</i>	30
2.7.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.8. Enfermedades que afectan a las abejas.....	31
2.8.1. <i>Melissococcus pluton</i>	31
2.8.2. <i>Paenibacillus larvae</i>	32
Capítulo 3 JUSTIFICACIÓN.....	33
Capítulo 4 HIPÓTESIS.....	34
Capítulo 5 OBJETIVOS.....	35
5.1. Objetivo General	35

5.2. Objetivos Específicos	35
Capítulo 6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
6.1. Determinación de origen floral	37
6.1.1. Acetólisis.....	37
6.1.2. Identificación de gránulos de polen	38
6.2. Caracterización fisicoquímica	38
6.2.1. Humedad	38
6.2.2. Cenizas.....	39
6.2.3. Proteína Cruda.....	40
6.2.4. Grasa Cruda	41
6.2.5. pH.....	41
6.3. Evaluación de fracción fenólica	42
6.3.1. Extracción etanólica	42
6.3.2. Fenoles totales.....	42
6.3.3. Flavonoides totales	44
6.3.4. Flavonas y dihidroflavonas totales	45
6.4. Determinación de Color	46
6.5. Evaluación antimicrobiana.....	48
6.5.1. Difusión en disco.....	48
6.5.2. Difusión en pozo.	48
6.5.3. Concentración mínima bacteriostática (CMB)	49
6.6. Perfil de fluorescencia	50
6.7. Análisis Estadístico.....	50
Capítulo 7 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	52
7.1. Caracterización fisicoquímica	52
7.1.1. Humedad	52
7.1.2. Materia seca	56
7.1.3. Cenizas.....	57
7.1.4. Proteína cruda	60
7.1.5. Grasa Cruda	63

7.1.6. pH.....	66
7.2. Compuestos fenólicos	67
7.2.1. Fenoles	69
7.2.2. Flavonoides	71
7.2.3. Flavononas	73
7.3. Determinación de color.....	75
7.4. Evaluación antimicrobiana.....	83
7.4.1. Difusión en disco.....	83
7.4.2. Difusión en pozo	90
7.4.3. Concentración mínima bacteriostática (CMB)	93
7.5. Perfil de fluorescencia	94
7.5.1. Análisis de matrices de emisión por MCR-ALS	94
7.6. Determinación de origen floral	98
Capítulo 8 CONCLUSIONES	100
Capítulo 9 ANEXOS.....	102
Capítulo 10 BIBLIOGRAFÍA.....	108

Índice de figuras

Figura 1. Ah Mucen Cab divinidad de las abejas, cuyo nombre significa: El Gran Guardián de la Miel.	6
Figura 2. Tipos de vegetación en la península de Yucatán (Villegas Durán, y otros, 1998).	7
Figura 3. Clasificación simplificada de las abejas (Quezada Euán, 2005).	13
Figura 4. Esquema del grano de polen (Scott F., 2005).	21
Figura 5. Estratificación de la esporodermis (de Rivas, 1976).....	21
Figura 6. Clasificación de los granos de polen según el tipo de aberturas (de Rivas, 1976).	23
Figura 7. Ejemplos de compuestos fenólicos	27
Figura 8. Calendario de apertura y cierre de trampas	36
Figura 9. Secuencia de homogenizado de muestras para la obtención de un mes ...	37
Figura 10. Porcentaje de humedad de polen recolectado en dos años consecutivos.	53
Figura 11. Promedios de porcentaje de humedad y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.	55
Figura 12. Promedios de porcentaje de materia seca y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.	57
Figura 13. Porcentaje de cenizas en base seca de polen recolectado en dos años consecutivos.....	58
Figura 14. Promedios de porcentaje de cenizas y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.	60
Figura 15. Promedios de porcentaje de proteína cruda y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.	62
Figura 16. Promedios de porcentaje grasa cruda y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.	65
Figura 17. Promedios de pH y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.	66

Figura 18. Promedios de fenoles y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.	70
Figura 19. Promedios de flavonoides y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.	73
Figura 20. Promedios de flavononas y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.	74
Figura 21. Correlación de compuestos polifenólicos	75
Figura 22. Relación entre los grados y el color en ángulo Hue.....	77
Figura 23. Diagrama de color L*C*h*a*b*	78
Figura 24. Diagrama de color a*b*	79
Figura 25. Gráfica de modelo ajustado para L y fenoles.	81
Figura 26. Gráfica de modelo ajustado para a y fenoles.	82
Figura 27. Gráfica de modelo ajustado para b y fenoles.	82
Figura 28. Halos de inhibición de la muestra Y-02 contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> por el método de difusión en disco.	84
Figura 29. Halos de inhibición de la muestra Y-21 contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> por el método de difusión en disco.	84
Figura 30. Halos de inhibición de la muestra Y-05 contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> por el método de difusión en disco.	85
Figura 31. Halos de inhibición de la muestra Y-20 contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> por el método de difusión en disco.	85
Figura 32. Halos de inhibición de las muestras que presentaron mayor diámetro contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 por el método de difusión en disco.....	87
Figura 33. Halos de inhibición de las muestras que presentaron mayor diámetro contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por el método de difusión en disco.....	87
Figura 34. Diámetros de actividad contra <i>Melissococcus pluton</i> 49.3 de extractos etanólicos.	91
Figura 35. Diámetros de inhibición contra <i>Paenibacillus larvae</i> JM 87 de extractos etanólicos.	91

Figura 36. Curva de inhibición de <i>Paenibacillus larvae</i> JM 87 contra diluciones de etanol.	93
Figura 37. Espectro de emisión promedio de los tres componentes extraídos mediante MCR-ALS. Compuestos fenólicos (azul #1), triptófano (verde #2) y productos de la reacción de Maillard (rojo #3).	95
Figura 38. Espectros de excitación de los cuatro componentes extraídos mediante MCR para las muestras de extractos etanólicos de polen.	96
Figura 39. Análisis palinológico de muestra Y-05, las imágenes conservan su proporción. a) <i>Fuirena</i> sp., b) <i>Brosimum alcastrum</i> , c) <i>E. proliferea</i> y d) <i>P. ichnanthoides</i>	98
Figura 40. Hábito de las especies vegetales que florecen en el apiario experimental de la zona centro del estado de Yucatán (Pacheco Herrera, 2009).	99

Índice de tablas

Tabla 1. Calendario de floraciones nectaríferas y poliníferas de la península.	10
Tabla 2. Especies importantes productoras de polen encontradas en miles durante el ciclo de cosechas en Yucatán.	11
Tabla 3. Especificaciones fisicoquímicas del polen	19
Tabla 4. Volumen de venta de la producción y su contribución porcentual de los principales productos de la colmena.	24
Tabla 5. Concentraciones para curva de calibración de fenoles totales	43
Tabla 6. Concentraciones para curva de calibración de flavonoides totales	44
Tabla 7. Concentraciones para curva de calibración de flavonas y dihidroflavonas totales.....	46
Tabla 8. Longitudes de onda (m μ)	47
Tabla 9. Tonos de color	47
Tabla 10. Máximos y mínimos de la composición fisicoquímica del polen analizado.	52
Tabla 11. Contenido de humedad de las muestras de polen en diferentes años de colecta.	54
Tabla 12. Contenido de cenizas entre meses de muestreo.	59
Tabla 13. Contenido de cenizas en muestras de polen en los diferentes períodos de calendario apibotánico.....	60
Tabla 14. Contenido de proteína cruda entre meses de muestreo.	61
Tabla 15. Contenido de cenizas en muestras de polen en los diferentes períodos de calendario apibotánico.....	63
Tabla 16. Contenido de Grasa Cruda (B.S.) del polen entre meses de muestreo.	64
Tabla 17. Contenido de Grasa Cruda (B.S.) en muestras de polen en los diferentes períodos de calendario apibotánico.	65
Tabla 18. Valor promedio de pH del polen entre meses de muestreo.	67
Tabla 19. Valor de pH en muestras de polen en los diferentes períodos de calendario apibotánico.	67
Tabla 20. Máximos y Mínimos de la composición fenólica del polen analizado.	68

Tabla 21. Contenido de fenoles entre meses de muestreo.	69
Tabla 22. Contenido de fenoles en muestras de polen en los diferentes períodos de calendario apibotánico.....	70
Tabla 23. Contenido de flavonoides entre meses de muestreo.	72
Tabla 24. Contenido de flavonoides en diferentes años de colecta.	72
Tabla 25. Contenido de flavonoides en los diferentes períodos de calendario apibotánico.	73
Tabla 26. Contenido de flavononas en diferentes años de colecta.....	74
Tabla 27. Máximos y mínimos en la medición de color de los extractos etanólicos. ..	76
Tabla 28. Parámetros de color en los extractos etanólicos de polen	76
Tabla 29. Correlaciones entre los parámetros de color y los compuestos fenólicos ..	80
Tabla 30. Correlaciones entre los compuestos fenólicos, porcentaje de grasa cruda y diámetro de inhibición contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	89
Tabla 31. Curvas de inhibición de <i>Paenibacillus larvae</i> JM 87 con extractos de polen.	94
Tabla 32. Concentraciones relativas de los componentes extraídos en pólenes recolectados en la zona centro del estado de Yucatán.....	97

RESUMEN

Yucatán es reconocido por ser la región con mayor exportación de miel en el país, además de la miel otros productos de la colmena podrían ser comercializados e incrementar los ingresos de los apicultores. Uno de estos productos es el polen corbicular que debido a su manejo, la falta de información para su producción o en otros casos el desconocimiento de sus propiedades, no ha sido apropiadamente explotado. El polen es variable en su composición fisicoquímica y propiedades nutricionales, dependiendo de la fuente floral donde es recolectado; Yucatán cuenta con una diversidad floral durante todo el año, por lo tanto la recolección del polen se convierte en una actividad sustentable. Este trabajo tiene como objetivo el estudio del polen por su conocido valor nutracéutico y otras variables dependientes del origen floral que influyen en el contenido de fitoquímicos y su potencial antibacteriano. El estudio de las propiedades del polen pecoreado por *Apis mellifera L.*, recolectado en la zona centro del estado de Yucatán, es importante para dar un valor agregado a este producto de la colmena.

En los resultados se reporta que las muestras de polen presentaron valores por encima de la norma NMX-FF-094-SCFI-2008, lo cual es indicativo de un valor nutricional más alto. También se encontraron patrones en el contenido de polifenoles y se reporta que el color puede ser considerado un parámetro de calidad. Se demostró que la actividad antibacteriana presentó una relación positiva ($p < 0.5$) con el porcentaje de ácidos grasos, mientras que fue negativa con el contenido de polifenoles. Se detectó por fluorescencia la disposición de triptófano en los extractos de polen, indicando la presencia de proteínas, compuestos que pueden contribuir a la actividad antibacteriana. En este trabajo se ha contribuido en el conocimiento sobre las propiedades nutricionales y funcionales del polen, así como se ha abierto la factibilidad de continuar el estudio más profundo sobre tipo de polifenoles, el contenido de ácidos grasos y la identificación de las proteínas en los extractos.

ABSTRACT

The Yucatán Peninsula is recognized as the main exporting region of bee honey in México; besides the honey, other beehive products could be marketed and would increase the beekeepers income. The pollen is one of these products. Yucatan has a great floral diversity during all year. Therefore the pollen collection could be a sustainable activity. The goal of this work was the study of the pollen due to the nutraceutic value and other properties that depend of the floral origin by the phytochemicals and antibacterial potential. The study of the *Apis mellifera* L percolated pollen properties obtained in the Center Zone of Yucatan State, is very important to give added value to beehive product.

It was reported in the results that the pollen samples presented higher values than the official standard NMX-FF-094-SCFI-2008, that indicates of a higher nutritional value. Moreover, polyphenolic content patterns were found and it is reported that the color could be considered a quality standard. It was shown that antibacterial activity had a positive relation($p < 0.5$) with the fatty acids concentration, while it was negative with the polyphenol content. Tryptophan disposition in the pollen extracts was detected by fluorescence, indicating the protein presence, which are compounds that could contribute to the antibacterial activity. In this work, we have contributed to the knowledge about the nutritional and functional properties of the pollen, just as it has opened the feasibility to continue a deeper study about polyphenol compounds characterization, fatty acid content and protein identification in the extracts.

Capítulo 1 INTRODUCCIÓN

La flora de México es una de las más diversas del planeta; existen varias estimaciones sobre la riqueza florística del país. Rzedowski (1998) estimó que en el territorio nacional existen 22 familias, 2,410 géneros y 22,000 especies aproximadamente, mientras que Toledo y Ordoñez (1998) estimaron que el total de especies en el país varían entre 23,000 y 30,000. Una de las estimaciones más recientes por Villaseñor (2004) señala que México tiene más de 22,000 especies de 2,663 géneros, de las cuales 218 son consideradas endémicas (para la Conservación Vegetal, 2012).

En Yucatán hasta la fecha, se reconocen 2,300 especies distribuidas en 956 géneros y 161 familias como nativas o asilvestradas en la Península de Yucatán. Esta región no cuenta con la flora más diversa del país, pero contiene 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 solo crecen en la península de Yucatán (Fernández Carnevali, y otros, 2012). Aunque la diversidad de especies melíferas son cerca de 849 (Flores Guido, 2010), se han descrito 33 principales plantas melíferas en Yucatán. Dentro de las principales descritas 16 son poliníferas y son esenciales para la recolección de polen en los diferentes meses del año por la abeja *Apis mellifera* que es la más ampliamente utilizada en la apicultura (Alfaro Bates, Ortiz Díaz, & González Acereto, Plantas melíferas: melisopalinología, 2010). La Península de Yucatán destaca por su gran diversidad de especies vegetales, lo que permite que siempre existan plantas produciendo néctar y polen (Villegas Durán, y otros, 1998).

Dentro de los productos y beneficios que se pueden tener de la explotación de *Apis mellifera* la miel no es el único producto, pero sí el más comercializado. Dependido de condiciones como las técnicas aplicadas, la situación geográfica del colmenar y las circunstancias económicas, el apicultor también puede obtener ingresos de la

cosecha de polen, cera, propóleo, veneno, jalea real, reinas, paquetes de abejas y extracto de larvas (Pierre & Yves, 2007).

El polen es particularmente rico en proteínas, vitaminas y oligoelementos. Puede consumirse en granos naturales (conocido también como polen apícola o corbicular), en cápsulas, mezclado con una cucharada de miel y se ha reportado que mejora el tono físico e intelectual, aumenta la resistencia al cansancio y a las afecciones en general, y disminuye las carencias vitamínicas y minerales por desnutrición (Güemes Ricalde, Echazarreta González, & Villanueva G., 2004).

Actualmente existe una tendencia de la población hacia la selección de alimentos que no solo aporten componentes nutricionales propios, sino que igualmente, aporten algún nivel de protección a la salud, estos alimentos se denominan “alimentos funcionales”. Los alimentos funcionales no son fármacos (Calvo Bruzos, Gómez Candela, Royo Bordonada, & López Nomdedeu, 2012), pero aportan componentes en la dieta que pueden contribuir a un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica (Lee, Seo, Lee, Chung, & Chi, 2004)

El polen contiene proteínas, vitaminas, fibra, y compuestos como flavonoides, los cuales podría presentar una importante fuente de fitoquímicos para la dieta humana, otorgando un valor adicional a las propiedades nutricionales ya conocidas (González Paramás & Di Paola Naranjo, 2007). El polen varía su composición fisicoquímica y propiedades nutricionales dependiendo de la fuente floral donde provenga y debido a que en el estado de Yucatán existe una diversidad de especies que aportan polen durante todo el año, es importante identificar el origen floral del polen producido en el estado, así como evaluar el valor nutricional, los principales componentes bioactivos y su actividad contra microorganismos patógenos.

Capítulo 2 MARCO TEÓRICO

La Península de Yucatán está situada en el Sureste de la República Mexicana, entre los 17° 49' y 21° 30' de Latitud Norte y los 86° 45' y 92° 00' de Longitud Oeste y comprende los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán; limitado al Norte por el Golfo de México, al Sur con el Estado de Chiapas y las fronteras con Guatemala y Belice, al Este con el Mar Caribe y al Oeste con el Golfo de México.

Los geógrafos están acordes con llamarla "Losa de Yucatán", debido a su paisaje plano que representa una inmensa llanura. Su orografía se reduce a dos pequeñas cadenas de colonias que corren paralelas denominadas Puuk y Sierra de Ticul, cuya altura máxima es de 125 m. El clima dominante se clasifica como cálido con lluvias en verano sin cambio térmico invernal, presentándose algunas variantes del tipo seco y semi-seco en la parte norte del estado de Yucatán y cálido húmedo, en la Isla del Carmen y Palizada, Campeche, así como en la Isla de Cozumel en el Estado de Quintana Roo. En cuanto al régimen pluvial la media anual es de 950 mm variando de 450 a 15000 mm con un período seco bien definido de 4 a 7 meses. La temperatura media anual oscila entre los 25 y 27°C y una mínima extrema de 0 - 7°C.

La flora de la península de Yucatán es un tema de gran interés, ya que si bien la flora no cuenta con una gran diversidad de especies, existen muchos aspectos que atraen la atención dado a que es uno de los más manejados y utilizados a través del tiempo y en especial por el hombre maya. Uno de esos aspectos es que una misma planta puede adquirir varios nombres debido a sus múltiples usos o a que tiene algún grado de domesticación. Es importante de manera natural ya que reúne un componente genético que proviene de diversas latitudes como América del Norte, las Antillas Mayores y Menores, estas influencias recibidas en el territorio conformaron un puente por el que se recibió influencias genéticas de América del Sur, en especial de Colombia, Perú y Venezuela. A través de Florida y el archipiélago de las Bermudas recibió influencia de América del Norte ya través de su base, recibió la influencia del

territorio mexicano. De esto surge el gran endemismo de la región (Arellano Rodríguez, Flores Guido, Tun Garrido, & Cruz Bojórquez, 1992).

La Península de Yucatán es una de las regiones con mayor tradición apícola en México, como prueba de lo anterior está el hecho de que una de las divinidades de la cultura maya "Ah Mucen Cab", representa al dios encargado de proteger esta actividad. La importancia de esta deidad dentro de la cultura maya es tanta que se involucra y puede tomar la forma como dios de la creación o de la vida (Figura 1).



Figura 1. Ah Mucen Cab divinidad de las abejas, cuyo nombre significa: El Gran Guardián de la Miel.

2.1. Flora en México y Yucatán

México se considera uno de los cuatro países con mayor diversidad biológica en el mundo. En cuanto al componente vegetal, es el cuarto país más rico en número de especies de plantas con flores. La alta biodiversidad encontrada a lo largo de la republica mexicana se ha sugerido que es producto de su posición geográfica y de su marcada heterogeneidad geológica, topográfica, climática y altitudinal, lo que ha generado una enorme biodiversidad de ambientes (Durán García, 1997).

El endemismo dentro de la flora se atribuye a aquella especie que su área de distribución se encuentra restringida. La flora mexicana presenta un significativo

porcentaje de endemismo que le confieren un sello particular y son en gran parte los exponentes de su riqueza florística. Hemsley (1879-1888) determinó que los géneros restringidos en su distribución territorial del país constituyen aproximadamente el 11% de su número total en la flora, siendo más de la mitad de ellos monotípicos. Este autor menciona que las plantas endémicas están más correlacionadas con zonas áridas, pero pueden existir en menor proporción en zonas de climas templados y fríos no áridos disminuyendo en estas regiones a menos del 5% (Rzedowski, 2006).

En virtud de su carácter peninsular, de sus características climáticas, geológicas y endémicas peculiares y también a causa de su relativa cercanía de algunas islas del Caribe, la Península de Yucatán destaca así mismo del resto por los rasgos de su flora. A pesar de que la península es relativamente joven, varios autores han descrito un alto endemismo asociado a una vegetación tipo antillana (Rzedowski, 2006). De acuerdo con la "Monografía de Coeficientes de Agostadero de la Península de Yucatán", se encuentran presentes 11 tipos de vegetación (Figura 2).

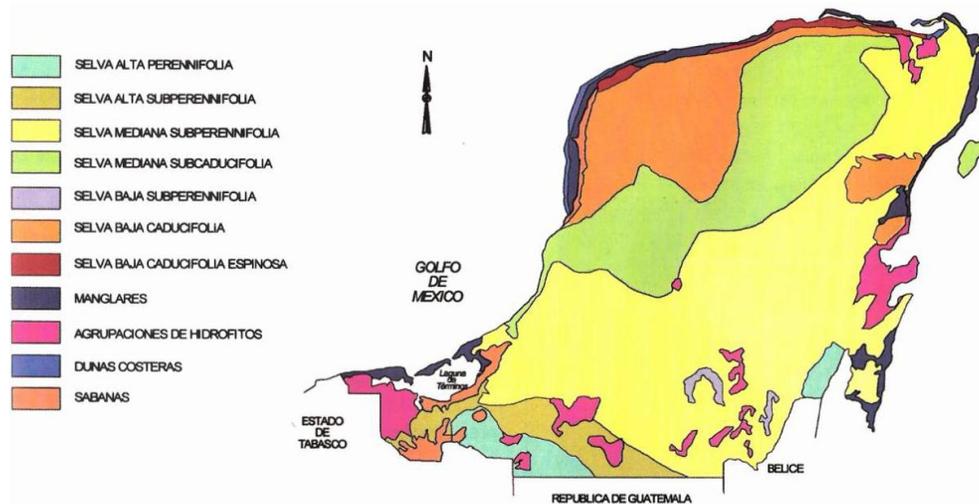


Figura 2. Tipos de vegetación en la península de Yucatán (Villegas Durán, y otros, 1998).

2.2. Plantas nectaríferas y poliníferas importantes en la región de Yucatán

La península de Yucatán se ha caracterizado por su flora melífera singular y endémica, influenciada por la estacionalidad; misma que incluye especies vegetales, las cuales, atendiendo a su actividad apícola, se clasifican en plantas nectaríferas y poliníferas; y otras plantas que secretan resinas utilizadas por las abejas para la producción de propóleos. La península destaca por su diversidad de especies vegetales, tanto herbáceas, arbustivas y arbóreas nativas o introducidas que florecen en diferentes épocas del año, lo que permite que siempre, existan plantas produciendo néctar y polen (INEGI, 2012).

Existe un alto porcentaje de flores aptas para ser pecoreadas por las abejas; de las 1,349 especies de plantas con flores reportadas para la flora de Yucatán por Arellano y otros (2003), 849 son melíferas que corresponden a 81 familias y 332 géneros. Las 849 especies consideradas representan el 68% del total de especies de plantas reportadas para Yucatán, lo que se considera un alto porcentaje (Flores Guido, 2010).

Aunque ya se conoce que la diversidad de especies melíferas es variada, se han descrito 33 especies principales y dentro estas 16 son poliníferas. En la Tabla 1 se enlistan las 16 especies poliníferas por su nombre común y se describen sus calendarios de floración (SEDUMA, 2015).

La lista descrita por Zapata Cauich (2004) se basa que en la miel se encuentran granos de polen en proporciones variables, procedentes de las plantas en las que han pecoreado las abejas, lo cual es un elemento importante, ya que es utilizado para indicar el origen botánico y geográfico de la misma. La presencia de polen en la miel se debe a diversos factores de los cuales el más sobresaliente son la morfología de la flor, donde pecorean las abejas; la posición de los nectarios; la posición y el

número de estambres y la cantidad de polen en ellos, así como la distancia de la fuente del néctar a las colmenas, entre otros (Cordova Cordova, 2009).

El ciclo de producción de miel en el estado se divide en tres períodos: precosecha (octubre - diciembre), cosecha (enero - mayo) y postcosecha (junio - septiembre); en cada periodo se presentan prevalencias de ciertas especies. Al comparar las prevalencias de especies en los periodos con las variedades poliníferas y por las flores endémicas se obtienen cuatro especies dominantes (Tabla 2).

De acuerdo a los datos presentados *Bursera simaruba* (Chakaj) resulta de interés para la recolección del polen al estar presente como flora dominante en el periodo de cosecha de miel; acompañada por otra parte por *Cordia dodecandra* (Ciricote), *Caesalpinia gaumeri* (Kitim-che), *Enterolobium cyclocarpum* (Piich) y *Manilkara zapota* (Zapote) que aunque no fueron detectados en los periodos de cosecha de miel son de importancia polinífera. En la Tabla 2 merece especial atención la *Senna spp.*, que aunque no es una especie identificada, al comprarlo con los calendarios de floración (Tabla 1) se puede observar que esté presente en los tres periodos de recolección de miel y la *Senna racemosa* florece todo el año.

Tabla 1. Calendario de floraciones nectaríferas y poliníferas de la península.

Nombre común	Nombre Científico	Nr	P	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Algarrobo	<i>Samanea saman</i>	•	•												
Box katsim	<i>Acacia gaumeri</i>	•	•												
Chakaj	<i>Bursera simaruba</i>	•	•												
Chechem	<i>Metopium brownei</i>	•	•												
Ciricote	<i>Cordia dodecandra</i>	•													
Cocoyol	<i>Acrocomia mexicana</i>		•												
Zak nikté o Flor de mayo	<i>Plumeria rubra</i>	•	•												
X'k'anlool o k'an ja' abin	<i>Senna racemosa</i>	•	•												
Kitim-che	<i>Caesalpinia gaumeri</i>		•												
Lluvia de oro	<i>Cassia fistula</i>	•	•												
Nance	<i>Byrsonima crassifolia</i>	•	•												
Piich	<i>Enterolobium cyclocarpum</i>		•												
Sak katsim	<i>Mimosa bahamensis</i>		•												
Sak-piich	<i>Acacia glomerosa</i>	•	•												
Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i>	•	•												
Zapote	<i>Manilkara zapota</i>	•	•												

Nr-Néctar, P-Polen. Fuente: (Zapata Cauich, 2004)

Tabla 2. Especies importantes productoras de polen encontradas en miles durante el ciclo de cosechas en Yucatán.

Nombre científico	Nombre maya	Pre cosecha	Cosecha	Pos cosecha
<i>Bursera simaruba</i>	Chakaj		M, MI, D, S	S, D
<i>Acacia gaumeri</i>	Box katsim			S
<i>Mimosa bahamensis</i>	Sak katsim	MI	MI, M	
<i>Senna spp.</i> *		MI	D, MI, M, S	MI

D=Dominante, S=Secundario, MI=Minoritario importante, M=Minoritario, *=Especie no identificada. Fuente: (Alfaro Bates, Ortíz Díaz, & González Acereto, 2010)

Existen pocos trabajos relacionados a análisis palinológicos de polen recolectado; sin embargo, en trabajos relacionados con mieles de la península de Yucatán, Arana y otros (2002), reportaron 250 especies polínicas presentes en 78 muestras, con un rango entre 2 y 17 especies por muestra y una media de 9.5 (Pacheco Herera, Moguel Ordóñez, Rivera Leyva, & Centeno Erguera, 2008).

Tanto Zapata Cauich (2004) como Alfaro Bates, Ortíz Díaz, y González Acereto (2010) en sus informes mencionan las principales especies encontradas en la miel, pero existen otras especies de importancia en la península, que a criterio de técnicos y productores de la región contribuyen en mayor o menor medida en la producción apícola. Entre las especies de importancia en la producción de polen apícola se encuentran: El katsim (*Acacia gaumeri* L.) también conocido como box katsim, su floración es de abril a junio, produce polen y néctar; el chum (*Cochlospermum vitifolium* Spreng) es buen productor de polen, florece de febrero a mayo; el k'aan lool (*Cassia racemosa* Mill.) florece todo el año es una especie productora de néctar y polen; el chechem (*Metopium brownei* Jacq.) conocido también como box chechem y kabab chechem, produce polen y néctar, florece de mayo a octubre; el chimay (*Acacia milleriana* Standl.), su floración va de febrero a abril, produce polen (INEGI, 2012).

2.3. Historia de la apicultura en Yucatán

El cuidado de las abejas ha tenido un papel importante en la tradición y en la economía de la región peninsular de Yucatán; primero con la meliponicultura, y posteriormente, con la apicultura, utilizando la especie *Apis mellifera* L.

Los mayas peninsulares trabajaban las abejas *Melipona* y *Trigona* (abejas nativas sin aguijón), propias de las zonas tropicales y subtropicales de México. La especie *Melipona beechii* Benett, fue utilizada para la producción de la miel y cera; durante la colonia los españoles impusieron el pago de un impuesto de estos medios. La demanda de los españoles que habitaban el centro del país era cubierta con los productos provenientes del puerto de Campeche.

A partir de la introducción de *Apis mellifera* L. a la península alrededor del año de 1911, se comenzó a fomentar la apicultura, aunque esta se consideraba más un pasatiempo, que un trabajo con técnicas establecidas. No fue hasta 1912, en el municipio de Izamal el Dr. Geoffrey Gaumer importó el material necesario para establecer las técnicas adecuadas de producción. Debido a que no existía una demanda sobre la calidad de la miel, el impacto que surtió fue muy pobre, no fue hasta años después que otros personajes impulsaron con mayor éxito la implementación de técnicas en la apicultura (Alfaro Bates, González Acereto, Viera Castro, Burgos Pérez, Martínez Hernández, & Ramírez Arriaga, 2010).

2.4. *Apis mellifera* L.

Las abejas son insectos del orden de los *Himenópteros*, pertenecientes al género *Apis* y especie *mellifera*. Estas vienen en sociedades llamadas colonias perfectamente organizadas, donde cada individuo realiza una función determinada de acuerdo a su edad y desarrollo físico. En la apicultura moderna la colonia es introducida en una caja construida por el hombre llamada colmena, ello permite criar

las abejas de manejo racional para beneficio económico del hombre (Programa nacional para el control de la abeja africana, 2014).

La taxonomía de *Apis mellifera* Linnaeus se describe a continuación:

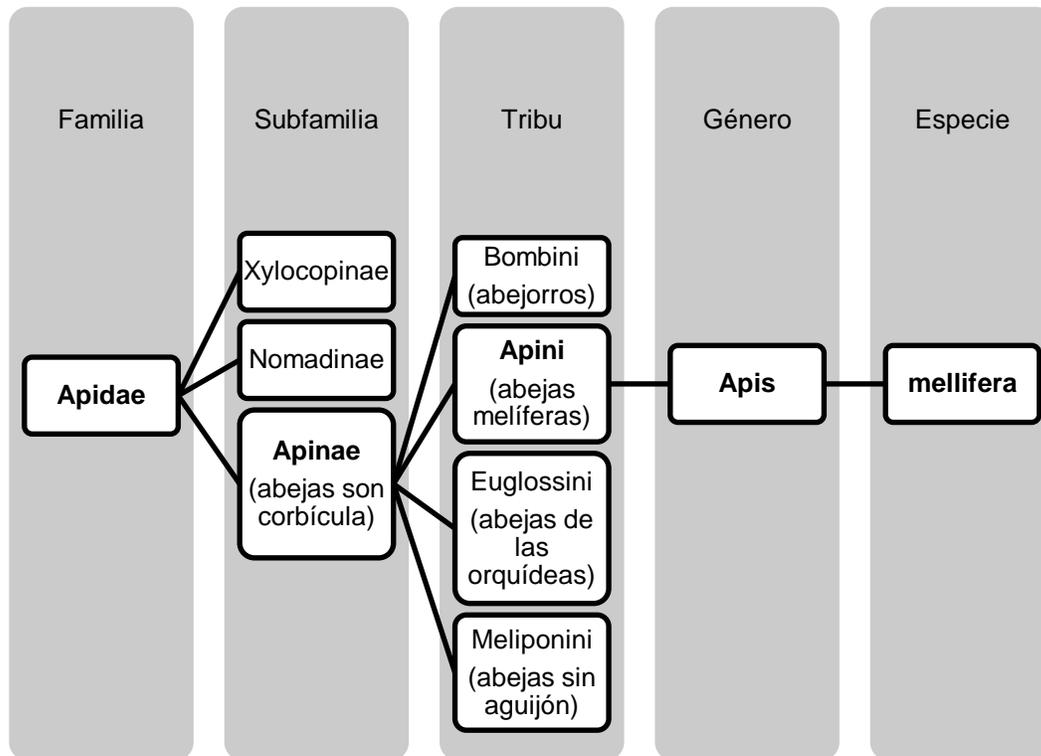


Figura 3. Clasificación simplificada de las abejas (Quezada Euán, 2005).

2.4.1. La colmena

Las colmenas de *Apis mellifera* L. están constituidas por una reina fecundada, de 0 a 300 zánganos y de 10000 a 40000 obreras; así como de una enorme cantidad de huevos, larvas y pupas. El número de individuos dentro de la colonia es dependiente de la época del año y la disponibilidad de néctar y polen (Media Medina & May Itzá, 2005).

Cada uno de los integrantes de estas grandes colmenas tiene funciones por demás definidas. Las obreras realizan labores de limpieza, alimentación de las larvas y la reina, construcción del panal, almacenamiento y deshidratación del néctar, defensa y regulación de la temperatura de la colmena, así como recolección de néctar, polen, resinas y agua. Los zánganos sexualmente maduros cumplen con la función de fecundar a las reinas vírgenes. La reina fecundada pone huevos que se desarrollan en obreras o zánganos.

El desarrollo de las abejas se divide en cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. El tiempo que tarda de huevo a adulto depende del tipo de individuo, las reinas tardan cerca de 16 días para completar toda la transición, mientras que los zánganos 24 días y las obreras entre 19-21 días.

2.4.2. 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 tiene un beneficio económico, alimenticio y medicinal para el ser humano (Programa nacional para el control de la abeja africana, 2014).

Miel. Sustancia azucarada producida a partir del néctar que recogen de las flores. Es el alimento básico de las abejas y fuente de energía necesaria para desarrollar todas las actividades de la colonia. Por su alto contenido en azúcares, la miel es una fuente de calorías.

La cera. Es producido por las glándulas cereras de las abejas entre su 13°-18° día 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.

La jalea real. Sustancia que las abejas jóvenes segregan entre su 4º-12º día de vida, para alimentar a las larvas durante sus 3 primeros días y a la reina durante toda su vida. La jalea es elaborada por la acción de las glándulas hipofaríngeas de las abejas al consumir polen, miel y agua. La jalea real es rica en vitamina B.

El propóleo. Es una especie 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 aseguran el calor y mantienen una perfecta higiene. En algunos países se utilizan extractos de propóleo en el campo de la medicina como cicatrizante, bactericida y fungicida.

El polen. 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 obtiene los elementos necesarios para formar los músculos, órganos vitales, alas, pelos y reponer los tejidos desgastados. Es rico en proteína, 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.

El veneno. Es producido por el propio cuerpo de la abeja obrera y lo utiliza exclusivamente como arma de defensa contra animales, insectos, personas y todo aquello que amenaza el funcionamiento de la colonia. Se utiliza para atender el reumatismo, artritis, dolor de los huesos, etc.

Polinización. Consiste en el transporte de los granos de polen de una flor a otra. Esta acción permite representar un beneficio para el agricultor, que ve aumentada en cantidad y calidad sus productos.

2.5. Las abejas y su alimentación

Las abejas melíferas colectan para su alimentación néctar y polen; las abejas proveen uno de los pocos sistemas en los que se puede examinar el pecoreo de proteína independiente de la toma de energía, ya que los individuos forrajean proteína (polen) y energía (néctar) de forma independiente (Woodward & Quinn, 2011).

2.5.1. Comportamiento de pecoreo

El comportamiento de pecoreo en la abejas es importante para determinar las producciones de la colmena. Hasta la fecha no se conoce lo suficiente acerca de este comportamiento, pero existen pequeños estudios que nos dan una idea de lo que realizan estos llegado el momento de recolectar polen y néctar.

Las abejas obreras normalmente visitan un solo tipo de flor durante sus vuelos de pecoreo. Esta constancia floral se debe a que las abejas aprenden los atributos de las flores como color, forma y olor, y usan esta información para incrementar su eficiencia. De esta manera las plantas con sus diferentes tipologías pueden competir y asegurar su polinización por las obreras. La elección de flores se dirige de acuerdo a la experiencia individual y también por la información trasferida dentro de la colonia; por lo cual la elecciones no son aleatorias, si no que tienden a reducir el tiempo de pecoreo, el riesgo y el costo energético para la colmena.

La organización eficiente del pecoreo depende de traspaso de información entre las abejas a través de rastros de feromonas o la danza de coleteo; esto permite que el tipo de colecta que se realiza en la colmena cambie de polen a néctar o agua según los requerimientos de la colmena. Las abejas generalmente pecorea en flores que se encuentran de 2 a 3 km de distancia, aunque se han registrado hasta los 8 y 14.4

km, pero distancias inferiores a los 5 km son las más comunes (Narváez Torres, 2013).

Las abejas colectan polen de muy pocas especies de plantas en una proporción mayor del 10%, las cuales pueden considerarse como un "recurso alimenticio importante", mientras que pueden colectar polen de un gran número de especies vegetales pero en pequeñas proporciones y a estas plantas les denomina "recurso alimenticio alternativo" (Cortopassi Laurino & Ramalho, 1988).

La correlación entre la cantidad de lluvia mensual con respecto a la carga de polen colectada mensualmente por las abejas es negativa, esto quiere decir que en los días más lluviosos existe una menor recolección en la colmena. La precipitación en los trópicos no solamente influye en el vuelo de las abejas sino también en la anthesis floral, en la secreción del néctar y la disponibilidad de polen. Los días lluviosos y nublados pueden afectar la actividad de las abejas de tal manera que disminuye la colección de polen y néctar, afectándose el desarrollo de la colonia, pero, si hace un buen tiempo, ésta se recuperaba rápidamente (Girón Vanderhuck, 1995).

2.5.2. Polen

Los granos de polen están encerrados en los sacos polínicos de los estambres y es el elemento fecundo de las plantas. Son de tamaño y forma variable, y generalmente se clasifican en dos categorías: Los pólenes ligeros, que son transportados sobre otras flores por el viento y los pólenes pesados, que son acarreados por insectos.

La morfología del polen, no solo permite su identificación sino que influye su preferencia para ser colectado por las abejas. Se conoce como polen apícola a una mezcla de pellets de polen de diferentes colores recolectados por *Apis mellifera* L. en flores de diversas especies, removido por movimientos complejos entre las patas y los apéndices bucales, compactado con néctar en las corbículas de sus patas

posteriores y transportado a la colmena. En la naturaleza, la oferta de polen varía con las floraciones, al igual que el flujo del néctar (Vit & Santiago, 2008).

El polen al igual que la miel, varía en su composición fisicoquímica dependiendo de la fuente floral de la que provenga; su color puede ser amarillo, naranja, crema, rojo, café, e inclusive negro (Moguel Ordóñez, Vivas Rodríguez, Martínez Ávalos, López Herrera, Mex Mex, & Alcalá Escamilla, 2010).

La NMX-FF-094-SCFI-2008 describe el polen de la siguiente manera: Se entiende por polen al gameto masculino de las flores que las abejas obreras recolectan, aglutinándolo en granos ovales con néctar y sustancias salivales y que el apicultor recolecta con trampas especiales para este fin. Por su composición, especialmente su riqueza en aminoácidos esenciales libres, se emplea en la alimentación humana como complemento de la dieta. El polen es el alimento básico en la dieta de las abejas que aporta las proteínas, vitaminas y minerales que las abejas necesitan.

2.5.2.1. Composición química

Para comprender la composición hay que recordar que las abejas recubren el polen de las flores con una mezcla de sustancias que regurgitan de su buche y de sus glándulas (Pierre & Yves, 2007).

La NMX-FF-094-SCFI-2008 establece que el polen debe cumplir ciertas especificaciones físicas y químicas en cuanto a su composición, estos parámetros son un indicativo de la calidad del polen y su valor nutrimental (Tabla 3).

Tabla 3. Especificaciones fisicoquímicas del polen

Parámetros	Valor mínimo	Valor máximo	Método de prueba
Humedad (secado al vacío 45 mm de Hg y 65°C por 24 hrs.	4.5 %	8 %	NOM-116-SSA1-1994
Cenizas en base seca	1.5 %	2.2 %	NMX-Y-093-SCFI-2003
Proteínas en base seca	12 %	18 %	NMX-F-608-NORMEX-2002
Grasa	2.5 %	6.5 %	NMX-F-615-NORMEX-2004
Fibra	0.27 %	0.70 %	NMX-Y-094-2001
pH	4		NMX-F-317-1978

Fuente: (NMX-FF-094-SCFI-2008, 2008)

Sin embargo, existen estudios en el estado de Yucatán donde la composición del polen excede los límites máximos permitidos en la norma, a pesar de que esto es una anomalía no quiere decir que el polen sea de mala calidad, si no que por el contrario ofrece un valor nutritivo mayor al esperado (Moguel Ordóñez, Vivas Rodríguez, Martínez Ávalos, López Herrera, Mex Mex, & Alcalá Escamilla, 2010).

En el polen va contenido, además de la información genética masculina, los elementos necesarios para que una serie de células se desarrollen y acompañen a esta información a lo largo de todo el estigma hasta que fecunda el óvulo. Por ello, su alto contenido de nutrientes, sobre todo proteínas (Pacheco Herera, Moguel Ordóñez, Rivera Leyva, & Centeno Erguera, 2008).

2.5.2.2. Morfología

Al estudio del polen se le denomina palinología y sirve para describir la morfología del polen, ya que este es único para cada especie vegetal por lo que es posible determinar el origen botánico de este, a través de técnicas de microscopía óptica y electrónica. Al estudio del polen en la miel se le denomina melisopalinología, que

permite determinar el origen de la miel a partir del estudio del polen contenido en esta (Cordova Cordova, 2009).

Un mejor conocimiento de la relación entre las abejas y las flores se puede obtener por medio de trabajos palinológicos, basados en el reconocimiento de cada tipo morfológico de polen presente en las muestras de miel y en la carga de polen colectada por las abejas. Estos estudios además sirven de apoyo en la identificación de la flora apícola de una zona, de esta forma se puede obtener un mejor aprovechamiento de las plantas útiles para las abejas, ya que de ellas depende el buen desarrollo de las colonias (Girón Vanderhuck, 1995).

El grano de polen es el microgametófito en reposo de los espermatófitos, y se origina en el saco polínico o microesporangio que se localiza en los estambres o microsporofilos. El grano de polen está recubierto por la intina o capa que limita inmediatamente con la célula polínica, y la exina que rodea la intina. La parte más externa del grano de polen presenta relieves variados de gran especificidad que permite su clasificación por parte de los especialistas, o bien, simplemente su observación como materia de estudio (Nogués, 1988).

Un grano de polen está constituido por dos partes fundamentales: la célula viva y la esporodermis o pared gruesa que la protege. La célula tiene un período de vida más o menos corto y en el polen fosilizado natural o artificialmente (acetólisis), está destruida (de Rivas, 1976).

Un grano de polen maduro consiste en dos células, una dentro de la otra (Figura 4). La célula del tubo tiene una célula generativa dentro de esta. La célula generativa se divide para producir dos espermatozoides. El núcleo de la célula del tubo guía la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico (o de polinización) después que el polen aterriza sobre el estigma de un gametofito femenino. Uno de dos espermatozoides se fusionará con la ovocélula para producir la siguiente generación

de esporofito. El segundo espermatozoide participará en la formación del endosperma, una estructura que proporcionará nutrición para el embrión (Scott F., 2005).

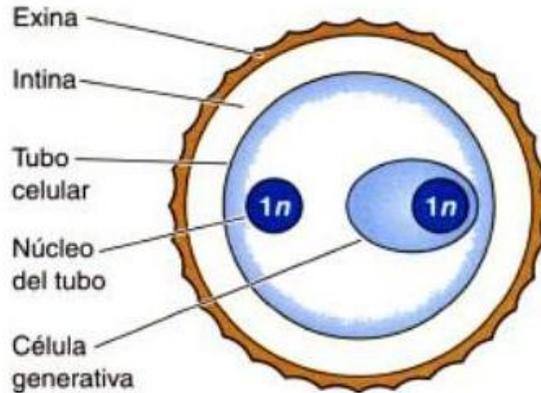


Figura 4. Esquema del grano de polen (Scott F., 2005).

La esporodermis, es "la membrana que rodea y protege la espora". Esta membrana está constituida a su vez por dos cubiertas concéntricas, denominadas intina y exina. Según los acuerdos del "Simposio APLF, Paría 1975" en la esporodermis se distinguen paredes, capas y estratos (Figura 5).

ESPORODERMIS	PAREDES	CAPAS (Erdtman 48)(Faegri 56)		ESTRATOS	
	EXINA	SEXINA	ECTEXINA	TECTUM	
		NEXINA		INFRACTECTUM	
	ENDEXINA		BASE		
	INTINA				

Figura 5. Estratificación de la esporodermis (de Rivas, 1976)

Intina. Se encuentra presente alrededor de la célula viva, es una pared de espesor regularmente homogénea. Su composición química aún no es del todo conocida,

pero se sabe que su componente principal es la celulosa, en un porcentaje discutido. También se han hallado sustancias pécticas, celosa, otros polisacáridos, enzimas y proteína. La intina se destruye fácilmente debido a su constitución química, debido a ello es un carácter poco utilizado en Taxonomía.

Exina. Se encuentra rodeando la intina, se definida como la pared más externa y resistente de la esporodermis. La exina se origina antes que la intina durante la formación del polen y su resistencia a la destrucción es una de las mayores dentro del reino vegetal, ya que soporta la acción de los ácidos y las bases concentradas, así como el calentamiento a 300 °C. El compuesto químico fundamental de la exina, llamado esporopoleina, se forma por polimerización oxidativa de carotenos y ésteres de caroteno en proporciones que varían de unas especies a otras (de Rivas, 1976).

Aberturas. El polen de angiospermas generalmente presenta adelgazamiento de la exina, conocida como aberturas, cuya función primordial es la salida del tubo polínico; además, en la morfología polínica, las aberturas son características esenciales para establecer el grado de parentesco entre los diversos grupos de plantas y clasificar los tipos polínicos. Los tipos básicos de aberturas están dados por la posición que ocupan éstas en los granos de polen, referidos a la tétrada original. Así, la abertura paralela y meridional al eje polar es conocida como colpo, generalmente se presenta en números de tres, por lo que el grano se llama tricolpado, y es característica de las dicotiledóneas. La abertura situada en los polos, perpendicular al eje polar, constituye el llamado sulco, y es típica de las monocotiledóneas. Existen otras aberturas derivadas del colpo que constituyen las aberturas colpadas, compuestas de una ectoabertura exterior y una endoabertura en la parte media; finalmente, al reducirse la ectoabertura se originan las aberturas circulares conocidas como poros. El número de aberturas en granos de polen se indica con los prefijos mono, di, tri, tetra, penta y hexa, antes de los términos sulcado, colpado, porado y colporado (Figura 6).



Figura 6. Clasificación de los granos de polen según el tipo de aberturas (de Rivas, 1976).

2.5.2.3. Producción y comercialización en Yucatán

La apicultura en México es una actividad lucrativa que favorece al sector rural, fundamentalmente al de tipo social que se encuentran en las áreas marginadas, donde la agricultura no se desarrolla en forma extensa, permitiendo aprovechar los recursos néctar-poliníferos. Ha sido tradicionalmente una actividad adicional de las actividades agropecuarias del campesino, particularmente en la región sureste donde se da de manera más acentuada.

Producción. El principal producto apícola de México es la miel de la cual se producen y se venden 114,002.98 toneladas, seguido por la cera con 1,048.74 toneladas, el propóleo con 65.34 toneladas y el polen con 29.12 toneladas. Al ver la producción a escala regional y estatal, se logra observar cuales son los principales productos de la colmena que se comercializan (Tabla 4) (INEGI, 2012).

Tabla 4. Volumen de venta de la producción y su contribución porcentual de los principales productos de la colmena.

Producción Toneladas	Nacional	%	Península de Yucatán	%	Estado de Yucatán	%
Total	115146.18	100.00	82823.60	100.00	20944.89	100.00
Miel	114002.98	99.01	82116.93	99.15	20862.42	99.61
Cera	1048.74	0.91	706.41	0.85	82.26	0.39
Propóleo	65.34	0.06	0.05	0.00	0.03	0.00
Polen	29.12	0.03	0.21	0.00	0.18	0.00

Fuente: (INEGI, 2012)

El estado de Yucatán ocupa el lugar 22 en producción de polen a nivel nacional y el primero contribuidor del polen en la Península de Yucatán. Esto indica que a nivel nacional existen otros estados que provechan de manera más integral los productos que se pueden obtener de las colmenas.

Destino de la producción. Al hablar de productos de la colmena y su comercialización es indispensable considerar que la península de Yucatán es una importante región productora de miel a nivel mundial. El 95.0% de la miel se destina al mercado internacional, siendo inclusive considerado dentro de los primeros exportadores y productores de calidad en Europa y Estado Unidos, por lo cual la información de comercialización de la península de Yucatán se centra en su principal producto, la miel. Es por eso que al observar los montos de producción de polen a nivel nacional, regional y estatal, no se cuentan con la información necesaria sobre la distribución del polen. México aún no figura a nivel internacional en producción de polen, pues es un recurso al cual no se le ha prestado al debida atención (INEGI, 2012).

2.6. Antioxidantes y fitoquímicos

Los alimentos vegetales son muy ricos en vitaminas antioxidantes, especialmente en vitamina C y betacaroteno, un precursor de la vitamina A. Además de los nutrientes, las plantas también contienen numerosos compuestos fitoquímicos (compuestos químicos vegetales) como los indoles, las isoflavonas y los polifenoles, que aunque no tienen valor nutricional alguno, intervienen en diversos procesos metabólicos del organismo.

Tomados en conjunto, estos nutrientes antioxidantes y fitoquímicos se conocen con el nombre de nutraceuticos, es decir, las partes de los alimentos que pueden proporcionar un beneficio médico o sanitario (Williams, 2002).

Si bien no se han podido identificar exactamente los mecanismos mediante los cuales los nutrientes antioxidantes y fitoquímicos ayudan a prevenir enfermedades crónicas como el cáncer o las afecciones cardíacas, se están estudiando diversas hipótesis. Varios nutraceuticos pueden inactivar enzimas, bloquear la formación de compuestos cancerígenos, prevenir la formación de radicales libres, alterar la estructura e integridad de las membranas celulares, competir con las hormonas naturales por los receptores celulares o suprimir la síntesis de ADN y proteínas.

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios.

Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales).

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono. Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2011).

2.6.1. Compuestos fenólicos

En el contexto del metabolismo, los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Figura 7).

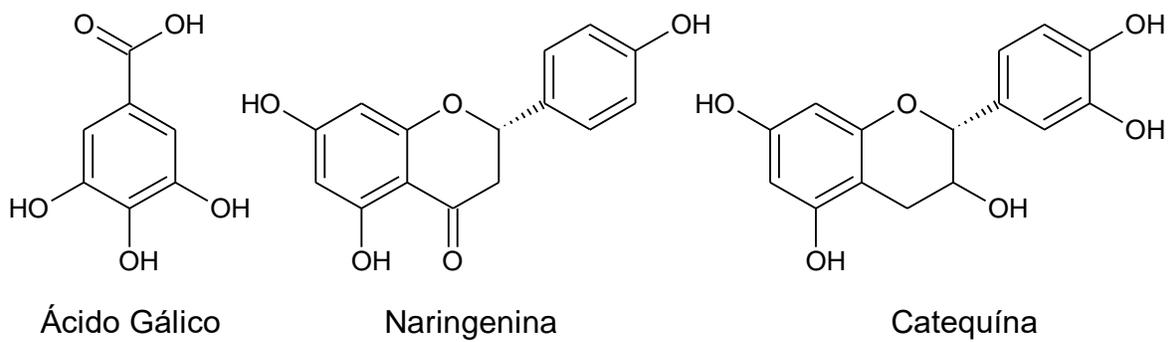


Figura 7. Ejemplos de compuestos fenólicos

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro.

Estos fitonutrientes incluyen un numeroso grupo de compuestos que han sido sujeto de una extensiva investigación como agentes preventivos de enfermedades. Los fenoles protegen a las plantas contra los daños oxidativos y llevan a cambio la misma función en el organismo humano. Las coloraciones azul, azul-rojo y violeta característicos de ciertas variedades de cerezas y uvas y el color púrpura de la berenjena se deben al contenido fenólico de estos vegetales (Chasquibol, y otros, 2003).

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores.

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides. Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un

punte de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2011).

2.6.2. Mecanismo antimicrobiano de fitoquímicos

Los mecanismos de acción de los fitoquímicos están definidos de acuerdo a la acción en la estructura bacteriana. Entre los niveles de interacción se encuentran (Sánchez García, 2012):

1. Interacción con componentes celulares externos
2. Interacción con componentes citoplasmáticos

Interacciones con componente celulares externos

Se ha observado que la presencia de una membrana exterior en Gram negativas que posee gran cantidad de lípidos, dificulta la entrada y acción de compuestos hidrofílicos. Por lo que uno de los principales efectos de los fitoquímicos que se han reportado, es producir un cambio en la hidrofobicidad celular.

Los compuestos fenólicos son hidrofóbicos por naturaleza y son activos contra membranas. Se ha demostrado que los aceites esenciales de plantas o con sus constituyentes fenólicos actúan contra patógenos bacterianos y levaduras, de modo que estos compuestos perturban la membrana celular resultando en una pérdida en el control quimiosmótico y por lo tanto la muerte celular.

Algunos fitoquímicos tales como los fenoles, alcoholes y bisbiguanidas son pequeñas moléculas que se ha visto pueden penetrar a la célula con facilidad. Las bacterias Gram positivas son generalmente sensibles a esta clase de agentes antimicrobianos.

Está bien establecido que al desestabilizar la membrana citoplasmática se altera la barrera de la permeabilidad originando la liberación de componentes intracelulares, potasio, fosfatos inorgánicos, proteínas y ácidos nucleicos, lo cual se refleja en un efecto bacteriostático. También puede haber disipación de protones, lo cual altera el transporte activo, fosforilación oxidativa y por consiguiente la síntesis de ATP en bacterias.

Interacciones con componentes citoplasmáticos

Algunos fitoquímicos (como el peróxido de hidrógeno y la proflavina) pueden actuar sobre ribosomas. Además se ha encontrado que la proflavina inhibe la síntesis de polinucleótidos en *Escherichia coli*.

Lin en el 2005, determinó que cuando se aplica una mezcla de extractos con alto contenido de compuestos fenólicos, como el orégano y el arándano, las propiedades antimicrobianas de la mezcla se incrementan de manera sustancial, además realizaron un estudio donde determinan que la inhibición de *Helicobacter pylori*, se debe a que los extractos alteran la producción de energía mediante la inhibición de la enzima prolin-deshidrogenasa la cual está presente en la membrana citoplásmica del microorganismo además mencionan que existe una marcada inhibición de la ureasa lo cual también afecta al microorganismo.

Nohynek y otros, demostraron en el 2006, el modo de acción antimicrobiano de compuestos fenólicos aislados de la frambuesa y de la fresa, los compuestos son del grupo de los elagitaninos, los cuales son capaces de desintegrar literalmente la membrana de diferentes cepas de *Salmonella*, esto lo determinaron por la liberación al medio de C14 galactosa-LPS. Tiempo después lo mismo se demostró para *Escherichia coli*.

2.7. Bacterias que afectan al hombre

Los microorganismos patógenos desempeñan un papel muy importante en brotes de enfermedades causadas por el consumo de alimentos, infecciones intrahospitalarias y ambulatorias. Los brotes por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se deben a que poseen dosis infecciosas bajas, y proliferan fácilmente en los alimentos y superficies, cuando encuentran condiciones propicias para su desarrollo (Castro del Campo, Chaidez Quiroz, Rubio Carrasco, & Valdez Torres, 2004).

2.7.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es la especie tipo del género *Escherichia*, que contiene sobre todo móviles bacilos gram negativa dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y la tribu *Escherichia*. Se puede recuperar fácilmente a partir de muestras clínicas en los medios de crecimiento general o selectivo a 37° C en condiciones aerobias. *Enterobacteriaceae* se identifica generalmente por medio de reacciones bioquímicas. Para fines epidemiológicos o clínicos, cepas de *Escherichia coli* a menudo se seleccionan a partir de placas de agar después de la identificación visual presuntiva. La prueba de indol, positivo en el 99% de las cepas de *Escherichia coli*, es la mejor prueba única para la diferenciación de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Nataro & Kaper, 1998).

2.7.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un patógeno humano importante que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados y a personas inmunocomprometidas en la comunidad. Además, puede ser causante de intoxicación por alimentos, debida a la ingestión de la enterotoxina B termoestable preformada, producida por una cepa. El género *Staphylococcus* está compuesto por cocos gram positivos de 0.5 a 1.5 µm de diámetro, que se agrupan en parejas y en tétradas, y que en forma característica se

dividen en más de un plano para formar racimos irregulares. Es anaerobio facultativo y habitualmente catalasa y coagulasa positivos; no esporulados, resistentes, ya que pueden sobrevivir a muchas condiciones ambientales adversas (Hurtado, de la Parte, & Brito, 2002).

2.8. Enfermedades que afectan a las abejas

Existen diversas enfermedades que afectan que afectan las colmenas de *Apis mellifera* L., padecimientos que tienen impacto en los individuos y por consiguiente afectan la riqueza de la colmena, impidiendo la recolección, almacenamiento y producción de sus provisiones (Carrillo Rodríguez & Medina Medina, 2016). Se reconocen más de 20 enfermedades que afectan a *Apis mellifera* L., pero menos de 10 son de seria importancia; el apicultor tiene que prestar atención a la identificación de aquellas que afectan a la cría debido a que éstas son las que afectan el "núcleo" de la colmena. Entre las enfermedades de mayor importancia en la cría se encuentran Loque Europea y Loque Americana teniendo diferentes agentes causales.

2.8.1. *Melissococcus pluton*

A pesar que se sabe que la Loque Europea involucra un complejo número de bacterias, se reconoce a *Melissococcus pluton* como el primer agente en aparece en la infección. Esta enfermedad recibe otros nombres como cría avinagrada, cría rancia, loque benigna, etc., es la segunda enfermedad de importancia que afectan a la cría y aunque sus implicaciones son menores a la de la Loque Americana, no deja de ser importante su monitoreo.

Melissococcus pluton es un coco que no forma esporas y mide 1 μm de largo por 0.7 μm de ancho, pueden encontrarse como diplococos pero crece frecuentemente en cadenas. Esta se describe en algunos síntomas similares a la loque americana,

como las crías salteadas, pero en esta ocasión la cría no operculada casi siempre es la afectada y se percibe un olor agrio parecido al vinagre o a la grasa rancia y las escama que se forman son fácilmente desprendible, a diferencia de *Paenibacillus larvae*. El tratamiento es a base de tetraciclinas y la estreptomicina, otra alternativa es el cambio de reina por una resistente.

2.8.2. *Paenibacillus larvae*

Es el agente causal de la Loque Americana, esta enfermedad se conoce con diversos nombres como peste maligna, peste viscosa, pudrición de la cría, cría putrefacta, etc., es altamente contagiosa y después de la varroasis es la enfermedad que provoca más pérdidas económicas a nivel mundial. *Paenibacillus larvae* puede encontrarse en dos formas, la vegetativa cuando se reproducen en las larvas y como espora fuera del cuerpo (forma de resistencia). En su forma vegetativa es un microorganismo aeróbico, gram positivo de 3-5 μm de largo por 0.5 μm de ancho, que crece agrupándose en cadenas. En su forma resistente, la espora mide 1.5 μm de largo por 0.8 μm de ancho.

La enfermedad se caracteriza cuando en los panales se puede observar que la cría se ve salteada, los opérculos se visualizan oscuros, hundidos, con aspecto grasiento e incluso algunos con una pequeña perforación donde el olor perceptible es fétido. El método de identificación para este padecimiento es el cuadro clínico y el método del "palillo". El tratamiento es la calcinación de la colmena, pero si no existe la posibilidad de realizarla puede ser controlada mediante medicamentos del grupo de las sulfas o tetraciclinas; sin embargo, se debe tener en cuenta que estos fármacos se encuentran prohibidos en muchos países (Programa nacional para el control de la abeja africana, 2014).

Capítulo 3 JUSTIFICACIÓN

La diversidad de vegetación del estado de Yucatán permite el sustento de la apicultura; sin embargo, los productores no tienen la apicultura como una actividad primaria, lo que la convierte en un trabajo de medio tiempo. Es conocido que la región de la península de Yucatán es el principal exportador de miel del país, del cual los apicultores obtienen ingresos; sin embargo, existe un gran potencial para la producción de polen donde los apicultores podrían obtener mayores ingresos. Este trabajo no solo plantea el estudio del polen por su valor nutracéutico, si no como un impulso del polen como una alternativa más para el aprovechamiento integral de los productos de la colmena.

Aunque no existen estudios sobre la capacidad antimicrobiana del polen apícola en nuestra región, si existen pocos estudios de esta propiedad en otros países. El interés de realizar este estudio surge debido a que existen la valoración de compuestos en otros productos del colmenar que presentan esta actividad, y esta se ha notado que está relacionado con la vegetación que pecorea *Apis mellifera* L.; por consiguiente el polen corbicular al ser recolectado de igual manera de la floración circundante de la región, esta variación de lugares podría ser un factor importante a considerar para realizar este estudio.

Teniendo a considerar que los estudios previos plantean una relación entre el tipo de vegetación donde se realiza la recolección del polen apícola, y esta varía en el transcurso de las estaciones del año; resulta de interés poder evaluar si el potencial antimicrobiano se modifica no solo por el tipo de vegetación entre localidades, sino también en el transcurso del año.

Capítulo 4 HIPÓTESIS

Los compuestos bioactivos aislados de extractos de polen apícola de *Apis mellifera* L., presentan actividad antimicrobiana dependiendo del contenido de polifenoles en la muestra y su origen botánico.

Capítulo 5 OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

- Determinar el aporte nutricional, el origen floral, el contenido fitoquímico y capacidad antimicrobiana de polen pecoreado por *Apis mellifera L.* recolectado en la zona centro del estado de Yucatán.

5.2. Objetivos Específicos

- Identificar el origen floral del polen.
- Caracterizar los principales componentes nutricionales del polen.
- Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en el polen.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos fenólicos del polen mediante ensayos *in vitro*.
- Determinar el color de los extractos por métodos espectrofotométricos.
- Determinar el perfil de fluorescencia total en los extractos etanólicos de polen y analizarlo mediante MCR-ALS.

Capítulo 6 MATERIALES Y MÉTODOS

En el apiario se instalaron trampas de piso para la captura de polen, utilizando colonias de 2-3 alzas y con las características necesarias reportadas por Moguel Ordóñez y otros (2010). La recolección de polen se realizó en intervalos de 15 días y el trampeo consistió en 5 días de apertura de trampa y 10 de descanso (Figura 8).

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Actividad	Recolecta de polen					Descanso									
Día	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Actividad	Recolecta de polen					Descanso									

Figura 8. Calendario de apertura y cierre de trampas

El trampeo se realizó a principios y mediados de cada mes por 2 años, obteniéndose un total de 96 muestras (2 años x 12 meses x 4 muestras). Posteriormente la muestras se homogenizaron correspondiendo al mes y al año de colecta quedando 24 muestras para su análisis (Figura 9).

Las muestras frescas se trataron para su conservación secando a 60°C por 24 horas, se limpiaron de partículas no pertenecientes al polen como hojas, hormigas y partes de abejas; posteriormente se envasaron en frascos estériles para su conservación y posterior análisis.

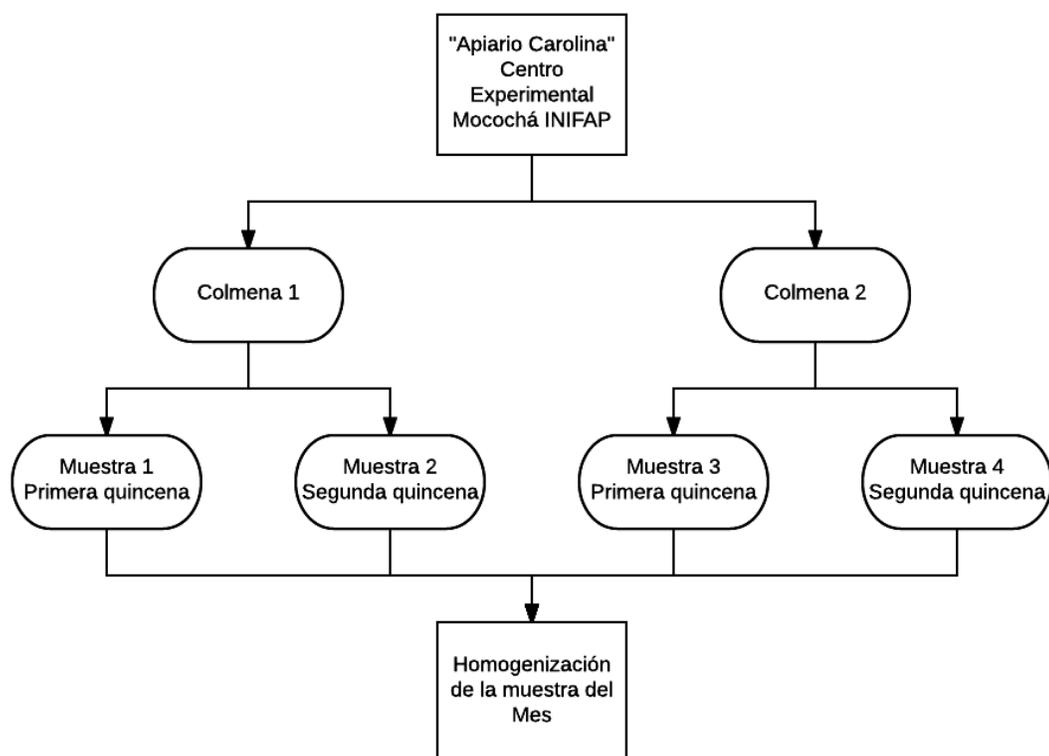


Figura 9. Secuencia de homogenizado de muestras para la obtención de un mes

6.1. Determinación de origen floral

6.1.1. Acetólisis

Para el análisis palinológico de las muestras de polen, se seguirá la técnica publicada por (Louveaux, Maurizio, & Vorwohl, 1978)

Se pesaron 0.2 g de polen en un tubo de centrifuga de 15 mL y se le añadieron 18 mL de agua destilada; la solución se colocó en un baño María a 60°C durante 10 min, se centrifugó posteriormente a 3000 rpm durante 15 min. Se decantó y se agregaron 10 mL de agua a temperatura ambiente, se agitó nuevamente y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. La solución se decantó nuevamente y el material polinífero se suspendió en aproximadamente 5 mL de ácido acético glacial QP seguido de agitó y centrifugó a 3000 rpm durante 5 min, a cada tubo se le añadió

lentamente 5 mL de la solución acetolítica (anhídrido acético y ácido sulfúrico 9:1 (v/v)), se sometieron a baño de agua a 90°C durante 20 min. Posteriormente se añadió 8 mL de anhídrido acético, se agitó y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. Por último se decantó y se procedió a lavar dos veces con aproximadamente 12 mL de agua destilada.

El sedimento de la muestra se montó en un porta objetos utilizando una pequeña porción de gelatina glicerizada grado reactivo, se calentó ligeramente, se homogenizó y se colocó un cubre objetos. Se elaboraron dos laminillas para cada muestra.

6.1.2. Identificación de gránulos de polen

Para la cuantificación, medición e identificación de los gránulos de polen se utilizó un microscopio MOTIC[®] provisto de analizador de imágenes. Se contaron los gránulos por cada preparación y se midieron utilizando el software del microscopio. Para la identificación de los granos de polen se tomó como referencia el libro Flora Palinológica de la Reserva de Sian Ka'an, Quintana Roo, México (Villanueva G., Palacios Chávez, & Ludlow Wiechers, 1991). Se identificaron las especies polínicas que se encontraron en las muestras, y se determinó el porcentaje de cada especie para determinar la importancia de las especies vegetales como fuente polinífera. Se determinó la Abundancia, Hábito y Ocurrencia.

6.2. Caracterización fisicoquímica

6.2.1. Humedad

Se determinó la humedad residual de las muestras después del tratamiento de conservación descrita en la NMX-FF-094-SCFI-2008. Se pesó una cantidad de muestra de 2 gramos en una la cápsula de cerámica previamente a peso constante;

se introdujo la cápsula y se mantuvo la temperatura a 100°C en una estufa de convección por 24 horas. Posteriormente se transfirieron un desecador; se dejaron enfriar a la temperatura ambiente y se pesaron en una balanza analítica. Realizando un duplicado por muestra.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(P - P1)}{P2} \times 100$$

P = Peso del recipiente con la muestra húmeda, en gramos.

P1 = Peso del recipiente con la muestra seca.

P2 = Peso de la muestra en gramos.

6.2.2. Cenizas

A partir de las muestras con las que se determinaron la humedad, se colocaron los crisoles con muestra en una parrilla y se quemó lentamente el material hasta que ya no desprendió humos, evitando que se proyecte fuera del crisol. Luego se llevó el crisol a una mufla y se efectuó la calcinación completa a 600°C por 4 horas. Dejando enfriar en la mufla, transfiriéndolo al desecador para su completo enfriamiento y determinar la masa del crisol con cenizas.

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(P - p) \times 100}{M}$$

P = Masa del crisol con las cenizas en gramos.

p = Masa de crisol vacío en gramos.

M = Masa de la muestra en gramos.

6.2.3. Proteína Cruda

Se pesó aproximadamente medio gramo de muestra en medio círculo de papel filtro Whatman® #40 en la balanza analítica y se pasó a un tubo de ensayo para digestión marca Buchi®, se añadió 8 g de catalizador (sulfato de sodio anhidro; sulfato de cobre 20:1 p:p), posteriormente se adicionó 20 mL de ácido sulfúrico químicamente puro. Lugo se colocó el matraz en el digestor y calentar cuidadosamente hasta que todo el material esté carbonizado, aumentar la temperatura hasta que la disolución quedó completamente clara y dejar por 15 minutos más a temperatura media. Inmediatamente se colocó el tubo de ensayo a un sistema de destilación, el cual previamente se le ha colocado en la salida del refrigerante un matraz Erlenmeyer de 500 mL.

Las condiciones de destilación fueron las siguientes: 50 mL de ácido bórico en el matraz Erlenmeyer, se adicionó 10 mL de agua, 115 mL de Hidróxido de sodio al (33%), tiempo de reacción de 15 segundos, tiempo de destilación 8 minutos, presión de vapor de agua máximo y succión automático.

Se destiló hasta que haya pasado el tiempo indicado, dando un aproximado de recuperado de 250 mL a 300 mL. Se retiró el matraz receptor y se tituló con ácido clorhídrico 0.2 N utilizando como indicador una solución de rojo de metilo-verde de bromocresol (1:5 v/v al 0.2%). El Nitrógeno presente en la muestra, expresado en por ciento se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{m}$$

V = Volumen de ácido clorhídrico empleado en la titulación, en cm³

N = Normalidad del ácido clorhídrico

m = Masa de la muestra en g.

0.014 = Miliequivalente del nitrógeno.

El por ciento de proteínas se obtuvo multiplicando el por ciento de nitrógeno obtenido por el factor correspondiente.

6.2.4. Grasa Cruda

Para el contenido de grasa cruda se pesó 3 gramos de muestra finamente sobre papel filtro y se empacó para introducirlo en el cartucho o dedal; se cubrió con una porción de algodón. Se colocó el cartucho dentro del extractor Soxhlet. En la parte inferior se ajustó un vaso Buchi[®] (llevado previamente a peso constante por calentamiento a 100 – 110°C). Se dejó circular el refrigerante. Se añadió 130 mL de éter de petróleo por el extremo superior del refrigerante. Se dejó circular el refrigerante y se programó con las siguientes condiciones: Disolvente éter de petróleo, 25 ciclos de reflujo, nivel de extracción 7 cm. Se efectuó la extracción y se dejó la programación para la recuperación del disolvente. Posteriormente se evaporó el éter en la estufa de convección a 100°C por 30 min. Se pasó al desecador hasta enfriar y se pesó.

$$\% \text{ de extracto etéreo} = \frac{(P - p)}{M} \times 100$$

P = Masa en gramos del matraz con grasa.

p = Masa en gramos del matraz sin grasa.

M = Masa en gramos de la muestra.

6.2.5. pH

Se determinó utilizando una solución de polen de 0.05 g en 25 mL de agua libre de carbonatos (solución al 2% de polen) con un potenciómetro correctamente calibrado.

La determinación se realizó por duplicado. El agua libre de carbonatos se obtiene a partir de agua destilada hervida por 30 minutos y dejada a enfriar para su utilización.

6.3. Evaluación de fracción fenólica

6.3.1. Extracción etanólica

A partir de de la muestras trituradas, se pesaron 2 gramos de polen triturado por cada una de las muestras y se maceraron en morteros de vidrio con 7.5 mL de etanol al 70%, posteriormente se traspasaron a tubos Corning® y con el mismo volumen (7.5 mL) se recupero todo lo posible de la muestra.

Seguidamente se homogenizó la muestra en un vortex y seguidamente se calentó en baño maría a 70°C por 30 minutos, nuevamente se homogenizó en vortex y finalmente se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos.

Para terminar el sobrenadante se filtró en vasos de precipitado con papel filtro de poro grueso, y los extractos filtrados se almacenaron en tubos de 15 mL envueltos en papel aluminio. A partir de los extractos se hicieron las determinaciones de fenoles totales, flavonoides y flavonas y dihidroflavonas.

6.3.2. Fenoles totales

Se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Brat, Alter, y Amiot (2005) con el reactivo de Folin-Cioaltea, usando ácido gálico como estándar.

Curva de calibración. Se utilizó una solución estándar de ácido gálico en agua destilada (1 mg/mL), de la cual se tomaron volúmenes de 0 a 240 μ L completando los volúmenes a 1000 μ L con agua destilada. Los volúmenes y concentraciones se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones para curva de calibración de fenoles totales

Concentración final de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de la solución estándar (μL)	Volumen de agua destilada (μL)
0	0	1000
30	30	970
60	60	940
90	90	910
120	120	880
150	150	850
180	180	820
210	210	790
240	240	760

Activación de la muestra o estándar. A 100 μL de cada uno de los extractos y puntos de la curva de calibración (por triplicado), se le agregaron 500 μL de reactivo de Folin-Cioaltea (diluido 1:10 en agua destilada), se agitó por 30 segundos y se dejó reposar durante dos minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregó 400 μL de Na_2CO_3 (75 mg/L), se incubó por 15 min a 50°C y finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Medición. La absorbancia de las muestras y estándares se determinaron a una longitud de onda de 760 nm.

Cuantificación. Empleando la ecuación de la curva de ácido gálico se calculó el contenido de fenoles de las muestras. Los resultados se expresaran en μg de ácido gálico por mL de extracto (μg equivalentes de ácido gálico/mL extracto). Posteriormente se realizaron los cálculos para la obtención en mg equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de polen en base seca.

6.3.3. Flavonoides totales

Se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Lee y otros (2003), usando catequina como estándar.

Curva de calibración. Se utilizó una solución estándar de catequina en metanol (1 mg/mL), de la cual se tomaron volúmenes de 0 a 560 μ L completando los volúmenes a 1000 μ L con metanol. Los volúmenes y concentraciones se describen en la Tabla 6.

Activación de la muestra o estándar. A 250 μ L de cada uno de los extractos y puntos de la curva de calibración (por triplicado), se le agregaron 250 μ L de una solución de NaNO₂ (5% p/v). Pasados 5 minutos, se adicionaron 125 μ L de una solución acuosa de AlCl₃•6H₂O (10% p/v). Después de 6 minutos, se adicionaron 124 μ L de NaOH 1.0M.

Tabla 6. Concentraciones para curva de calibración de flavonoides totales

Concentración final de catequina (μ g/mL)	Volumen de la solución estándar (μ L)	Volumen de agua destilada (μ L)
0	0	1000
40	40	960
80	80	920
120	120	880
160	160	840
200	200	800
240	240	760
280	280	720

Medición. Se determinó la absorbancia de las muestras y los estándares a una longitud de onda de 490 nm.

Cuantificación. Empleando la ecuación de la curva de calibración se calculó el contenido de flavonoides totales de la muestra. Los resultados se expresaron en μg de catequina por mL de extracto (μg equivalentes de catequina/mL extracto). Posteriormente se realizaron los cálculos para la obtención en mg equivalentes de catequina por 100 gramos de polen en base seca.

6.3.4. Flavonas y dihidroflavonas totales

El contenido total de compuestos flavonoides y dihidroflavonas se mediaron empleando el método reportado por Popova y otros (2005).

Curva de calibración. Se utilizó una solución estándar de naringenina en metanol (1 mg/mL), de la cual se tomaron volúmenes de 0 a 500 μL completando los volúmenes a 1000 μL con metanol. Los volúmenes y concentraciones se describen en la Tabla 7.

Activación de la muestra o estándar. A 125 μL de cada uno de los extractos y puntos de la curva de calibración (por triplicado), se le agregó 250 μL de una solución de 2,4-dinitrofenil hidracina (1g de 2,4-dinitrofenil hidracina en 2 mL de ácido sulfúrico al 96%, llevados a un volumen final de 100 mL de metanol). La mezcla se calentó a 50°C durante 50 min. Las muestras o estándares se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 min y se diluyeron a un volumen final de 1.75 mL con hidróxido de potasio en metanol al 10% (p/v). De la solución anterior se tomaron 200 μL y se le adicionaron 1.0 mL de metanol, se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min. La absorbancia del sobrenadante se determinó a una longitud de onda de 486 o 495 nm.

Tabla 7. Concentraciones para curva de calibración de flavonas y dihidroflavonas totales

Concentración final de naringenina ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de la solución estándar (μL)	Volumen de agua destilada (μL)
0	0	1000
50	50	950
100	100	900
200	200	800
300	300	700
400	400	600
500	500	500

Cuantificación. Empleando la ecuación de la curva de calibración se calculó el contenido de flavonas y dihidroflavonas totales de la muestra. Los resultados se expresaran en μg de naringenina por mL de extracto (μg equivalentes de naringenina/mL extracto). Posteriormente se realizaron los cálculos para la obtención en mg equivalentes de naringenina por 100 gramos de polen en base seca.

6.4. Determinación de Color

Para la determinación de color se realizó en los extractos etanólicos utilizando el método empleado por Arana López (2002) con leves modificaciones. Se utilizó etanol al 70% para blanquear el espectrofotómetro UV-VIS (Agilent 8453), posteriormente los extractos previamente centrifugados a 2500 rpm por 10 min se utilizaron para enjuagar la celda y posteriormente rellenarla con la misma muestras (esto se realiza con el fin de evitar cualquier variación en la medición). Se limpiaron las paredes de la celda con papel especial para evitar ralladuras y se determinó el porcentaje de transmitancia de cada muestra para cada valor de longitud de onda (Tabla 8).

Tabla 8. Longitudes de onda (m μ)

X	Y	Z
435.5	489.5	422.2
461.2	515.2	432.0
544.3	529.8	438.6
564.1	541.4	444.4
577.4	551.8	450.1
588.7	561.9	455.9
599.6	572.5	462.0
610.9	584.8	468.7
624.2	600.8	477.7
645.9	627.3	495.2

Los factores de conversión fueron para $X=0.09086$, $Y=0.10000$ y $Z=0.11814$ a 2° de observación iluminante D65 (Medio día). El tono fue determinado a partir de la longitud de onda dominante (Tabla 9).

Tabla 9. Tonos de color

Ámbito de longitud de onda en nanómetros	Tono
400 - 465	Violeta
465 - 482	Azul
482 - 497	Azul-verdoso
497 - 530	Verde
530 - 575	Verde-amarillento
575 - 580	Amarillo
580 - 587	Anaranjado-amarillento
587- 598	Anaranjado
598 - 620	Anaranjado-rojizo
620 - 700	Rojo
400 - 530c	Púrpura-azuloso
530c - 700	Púrpura-rojizo

6.5. Evaluación antimicrobiana

6.5.1. Difusión en disco

Se utilizaron cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923, y *Escherichia coli* 25922, las cuales fueron cultivadas en medio Agar Mueller Hinton a 37° C durante 12 horas. El inóculo utilizado fue de 0.5 en la escala McFarland, lo cual equivale a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) y 0.1 en absorbancia. Posteriormente el medio Agar Mueller Hinton previamente esterilizado se vertió en placas de plástico. Una vez que el medio solidificó se dispersaron las células con la ayuda de un hisopo, se dejaron reposar 15 min y se colocaron discos de papel filtros, en donde se les adicionaron extractos fenólicos de polen apícola del estado de Yucatán a diferentes concentraciones. Además de los tratamientos se colocaron un control positivo el cual consistía en etanol al 70%. Las cajas Petri se incubaron a 37° C durante 24 horas. Los resultados fueron observados transcurridos el tiempo de incubación. La formación de halos transparentes alrededor de los discos representan la inhibición de crecimiento microbiano (Schwalbe, Steele Moore, & C. Good, 2007).

6.5.2. Difusión en pozo.

Para esta metodología se utilizaron las cepas *Melissococcus pluton* 49.3 y *Paenibacillus larvae* JM 87 del laboratorio Medicina Regenerativa 2 de la Universidad de Desarrollo - Clínica Alemana en Santiago de Chile. Se utilizó medio MP y J sólido respectivamente para realización de las cajas de cultivo a 3/4 de su capacidad, con cultivos frescos se realizó una solución de 0.5 escala McFarland (1×10^6 bacterias) en medio LB líquido. Posteriormente se colocó 100 µL de la bacteria en suspensión sobre el medio con un asa estéril, dejando reposar para que se absorba, con un punzón para biopsia de 8 mm se marcaron los pozos necesarios a distancias equidistantes y con una punta de jeringa estéril se retiraron el agar de los pozos marcados; por último se colocaron 100 µL de cada extracto, utilizando el etanol al

70% como control positivo para el crecimiento de las bacterias. Posteriormente se dejaron encubar las cajas a 35°C por cinco días, los primeros días hacia arriba hasta la absorción del extracto se giraron las cajas. Para *Melissococcus pluton* 49.3 se utilizó el sistema para anaerobiosis Anaerocult® de la marca Merck y para *Paenibacillus larvae* JM 87 en un sistema de microaerofilia que consta de una vela en un recipiente cerrado.

6.5.3. Concentración mínima bacteriostática (CMB)

Se determinó la concentración mínima bacteriostática de los extractos de polen apícola, utilizando *Paenibacillus larvae* JM 87. Para la realización de esta prueba se utilizó placas de 96 pozos, con 100 µl de medio J líquido con una concentración de 1×10^5 bacterias. Los medios antes de ser inoculados se esterilizaron en calor húmedo a 121°C, o 105 Kg/cm². Posteriormente, a cada tubo con medio se le agregó 100 µl de la dilución del extracto. Cada concentración se realizó por duplicado, debido a que la muestra diluida en el medio presentaba turbidez se realizó un blanco para cada concentración evaluada.

La preparación de los medios con la bacteria se realizó a partir de una caja fresca del patógeno. Primeramente se realizó la suspensión de una colonia a 0.5 McFarland (1×10^6 bacterias) en el medio respectivo y posteriormente se diluyó hasta una concentración de 1×10^5 bacterias. Las placas de microdilución se incubaron a 35°C durante 5 días en microaerofilia. Pasado el tiempo de incubación se leyeron en un lector de microplaca (Sunrice TECAN) a 595 nm. Las diferencias entre los controles positivos y negativos, junto a las muestras y sus blancos indicaron crecimiento o inhibición bacteriana.

6.6. Perfil de fluorescencia

A partir de los extractos etanólicos de las muestras se prepararon soluciones con metanol de la siguiente manera; los extractos se homogenizaron y se centrifugaron nuevamente a 2500 rpm por 10 min y a partir del sobrenadante se realizó una dilución 1:500 v/v metanol.

Luego se obtuvieron los espectros de excitación-emisión por fluorescencia total, con celda de cuarzo de tres mL y paso óptico de un centímetro. La longitud de onda de excitación fue 220 - 450 nm cada 10 nm, y de emisión de 250 - 600 nm cada 2 nm, con un slit de emisión y de excitación de 10 nm. A los espectros se les eliminó la dispersión del *Raileigh* y *Ramman* primario y secundario mediante una rutina de cálculo usando matlab (espectros corregidos).

Los espectros corregidos fueron concatenados de forma vertical (incremento del tamaño de las columnas "*column wise*") y analizados por MCR. Se aplicó inicialización con el espectro más puro ("*pure method*"), dirección espectros de emisión (columnas), considerando un 10% de ruido y ALS con no negatividad en ambos modos. El número de componentes extraídos fue determinado mediante PCA según su importancia en explicar la variabilidad de los datos ("*eigenvalue*"); a partir de ello se obtuvieron modelos para describir la fluorescencia presente en las muestras.

6.7. Análisis Estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) simple para evaluar las muestras por mes de recolección, entre meses y año de recolección contra todas las variables estudiadas a un nivel de significancia del 5%, y las diferencias entre medias fueron obtenidas a través de la prueba de Diferencias Mínima Significativa (DMS).

Para evaluar si existió relación entre las variables se determinó el coeficiente de correlación de Pearson, la cual es una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. Para estas pruebas se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS CENTURION XV.

Capítulo 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización fisicoquímica

En México existe una normativa vigente que establece los parámetros fisicoquímicos del polen comercializado en el territorio nacional que es la NMX-FF-094-SCFI-2008. En el **ANEXO 1** se encuentran los resultados obtenidos de los análisis realizados durante el estudio de calidad, a las muestras mensuales de polen recolectado durante dos años consecutivos en el municipio de Mocochoá, Yucatán.

Resulta de vital importancia los parámetros que marca la norma mexicana, pero es también indispensable que se tomen las medidas pertinentes para conocer la variabilidad en la cosecha de polen apícola en las diferentes regiones del país, ya que debido a la gran heterogeneidad de la geografía mexicana es posible la existencia de pólenes con características diferentes a las ya reportadas.

A continuación se muestra un resumen de los valores mínimos y máximos de los parámetros analizados a las muestras:

Tabla 10. Máximos y mínimos de la composición fisicoquímica del polen analizado.

	% Humedad	% Materia Seca	% Cenizas	% Proteína Cruda	% Grasa Cruda	pH
Mínimo	5.51 ± 0.08	80.62 ± 0.25	1.64 ± 0.03	17.93 ± 0.26	1.51 ± 0.02	4.00 ± 0.00
Máximo	19.38 ± 0.25	94.49 ± 0.08	3.27 ± 0.06	36.62 ± 0.31	7.84 ± 0.01	5.28 ± 0.02

El contenido de Cenizas, Proteína Cruda y Grasa Cruda se expresan como % en base seca.

7.1.1. Humedad

El porcentaje de humedad obtenido de las muestras osciló entre 5.51 ± 0.08 % para Y-07 y 19.38 ± 0.25 % para Y-15. De acuerdo a la NMX-FF-094-SCFI-2008 los

valores deben encontrarse entre el 4.5 y 8%, observando que la mayoría de las muestras por encima del rango y solo seis de ellas dentro de la misma. Para poder conservar la calidad del polen, la humedad juega un papel muy importante ya que si existe un exceso tanto la vida de anaquel y sus características organolépticas se pueden perder.

Los resultados observados pueden indicar que el procedimiento de secado no siempre es adecuado para todo tipo de polen debido a las diferentes características que presentan de acuerdo al mes de colecta. En la Figura 10 se puede observar que la humedad del polen varía entre años de recolección, ya que en el mismo mes de colecta, la humedad del polen varió aún empleando el mismo método de secado en ambas muestras. Esto indica que la humedad del polen se ve influenciada claramente por las condiciones agroclimáticas, por lo cual se debe considerar estas al momento de procesar el polen para su envasado, debido a que en años con mayor humedad se requerirá mayores tiempos de secado (Tabla 11).

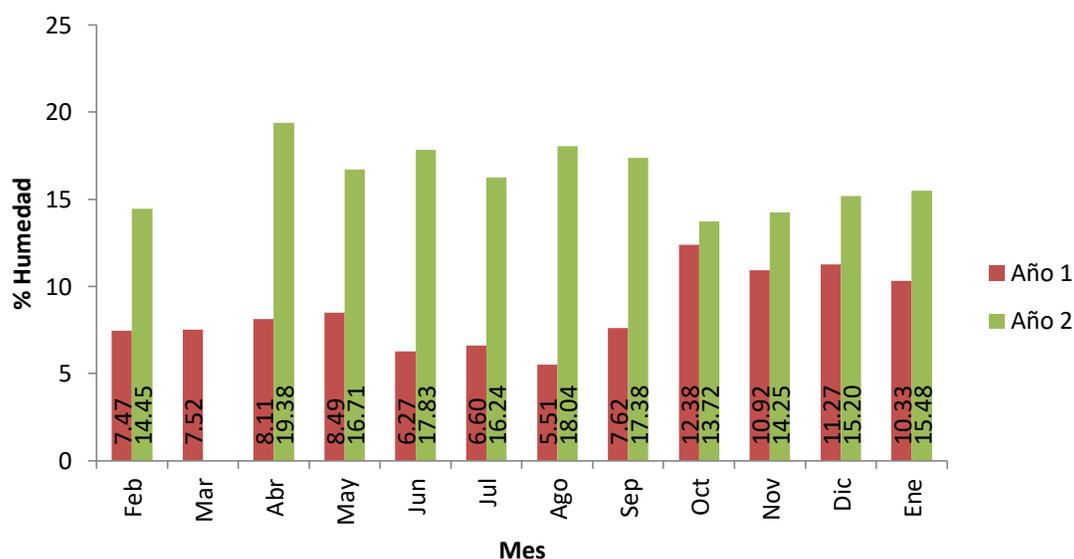


Figura 10. Porcentaje de humedad de polen recolectado en dos años consecutivos.

También se tiene que tener en cuenta que un exceso en el proceso de secado al aumentando la temperatura y tiempo de secado, puede provocar la pérdida de las características organolépticas y funcionales. El polen con exceso de secado a humedades menores al 3%, puede generar decoloración, oxidación lipídica, generar olores desagradables y rancidez (Mesa Valencia, 2015).

Tabla 11. Contenido de humedad de las muestras de polen en diferentes años de colecta.

Año	% Humedad
Año 1	8.54 ± 2.18 ^b
Año 2	16.24 ± 1.77 ^a

^{a, b} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

A pesar de que estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el porcentaje de humedad con respecto a los meses (Figura 11), se puede observar que en los meses de Octubre a Enero las desviaciones estándares de las muestras fueron menores en relación al resto del año. Esto coincide en cierta manera con el periodo de pre-cosecha donde el clima se caracteriza por el frío húmedo de la región; es decir que se debe considerar la humedad relativa del medio ambiente en los periodos de cosecha de polen.

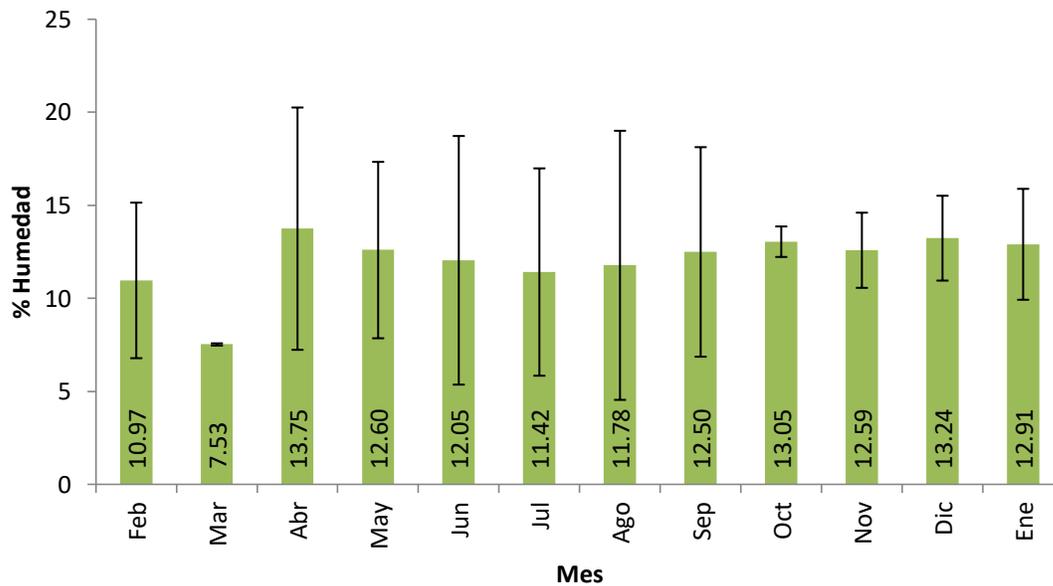


Figura 11. Promedios de porcentaje de humedad y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.

En los meses de frío el agua del medio ambiente tiende a condensarse sobre las superficies disminuyendo la presión parcial del agua en el medio ambiente, por lo que la humedad presente en el polen al encontrarse en la parte inferior de la colmena (un sistema cálido) tenderá a evaporarse al medio ambiente, de aquí surge que en estos meses las desviaciones en el contenido de humedad sean más estables; a comparación de los meses de postcosecha donde las lluvias aumentan el contenido de humedad en el medio ambiente y este tendrá a migrar al polen por su baja actividad del agua.

Molina Urbina y otros (2008), reportan valores de 4.88 a 19.51% de humedad para muestras recolectadas en Chiapas siendo aún más elevadas de las reportadas en este trabajo y Mesa Valencia (2015) encontró valores entre 2.7 ± 0.03 % y 8.9 ± 0.04 % para polen apícola colombiano menores a los encontrado en el polen estudiado. Estas variaciones con el polen colombiano puede deberse al tipo de clima presente en ese país; en cambio los resultados similares encontrados con el polen de Chiapas

puede ser debido a que se encuentra más cercano a la península de Yucatán y con un clima más parecido.

7.1.2. Materia seca

Los resultados de porcentaje de materia seca fluctuaron entre 80.62 ± 0.25 % para Y-15 y 94.49 ± 0.08 % para Y-07 (ANEXO 1), aunque este no es un parámetro de control de calidad se tiene que considerar que a nivel comercial un material con mayor porcentaje de materia seca representa una ventaja para los productores debido a que la compra-venta se realiza en estos términos para evitar la variación por aumento o disminución del peso del polen. Es decir la producción de polen con altos contenidos de materia seca será más redituable para el productor debido a que al pasar por el proceso de secado su volumen de producción no se verá tan afectado. Aunque no se encuentran diferencias significativas al comparar los diferentes meses ($P > 0.05$), si se encontraron cuando se compararon entre los años de recolección ($P < 0.05$) siendo de $91.46\% \pm 2.18^a$ para el Año 1 y $83.76\% \pm 1.77^b$ para el Año 2 (Tabla 10), siendo semejante a lo encontrado con el contenido de humedad.

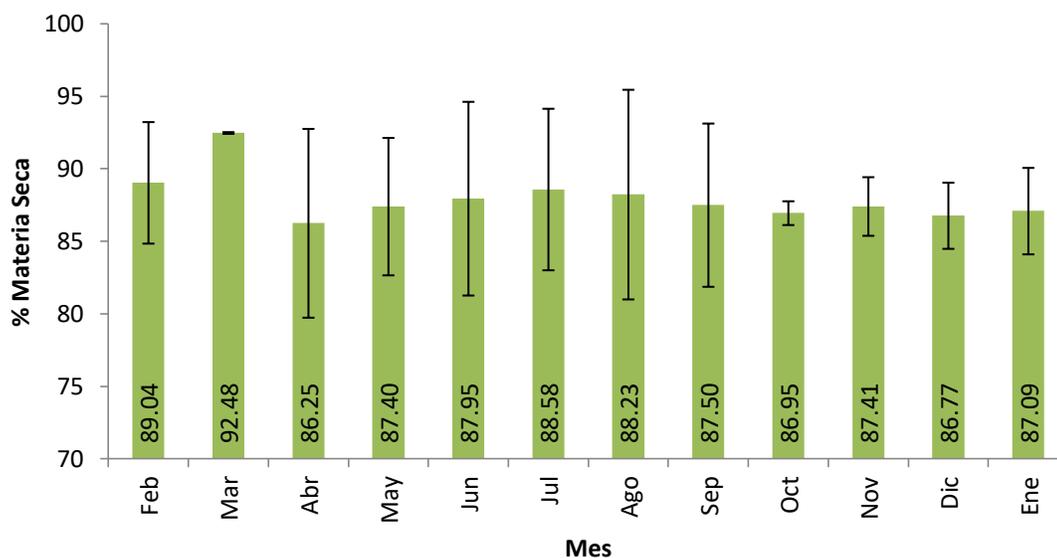


Figura 12. Promedios de porcentaje de materia seca y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.

Es importante resaltar que el comportamiento del contenido de materia seca de igual manera que en los parámetros anteriores, se mantiene más estable en los meses de Octubre a Enero, aunque el mayor porcentaje de materia seca se obtuvo en mayo correspondiendo al periodo de cosecha caracterizado por la sequía. Esto es importante ya que este mes los apicultores no verán tan afectados en la reducción del polen al momento del secado, por lo cual podrían tener mayores ganancias, aunque estos resultados deberán compararse con los rendimientos de cosecha.

7.1.3. Cenizas

Las muestras de polen presentaron resultados que oscilaron entre 1.64 ± 0.03 % para Y-24 y 3.27 ± 0.06 % para Y-15 (Figura 13). De acuerdo a la NMX-FF-094-SCFI-2008 los valores recomendados deben encontrarse entre 1.5 y 2.2%. A pesar de que varias de las muestras se encuentran por encima del rango recomendado, resultados similares son mencionados por López Herrera y otros (2009) donde los valores reportados también exceden los límites permitidos por la norma mexicana

(1.5 - 2.9%); Molina Urbina y otros (2008) reportaron valores entre 1.9 a 3.53% para polen chiapaneco; Mesa Valencia (2015) encontró $1.7\% \pm 0.01$ a $2.7\% \pm 0.01\%$ para polen colombiano. Esto no puede considerarse como valores inadecuados en las muestras analizadas, ya que a mayor contenido de material inorgánico mayor contenido de minerales presentes en la muestra. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los meses de recolección (Tabla 12), pero no entre los años muestreados, destacando los meses de Octubre, Noviembre, Diciembre, Abril y Julio con los mayores contenidos de cenizas; es importante puntualizar que Abril aunque se encuentra dentro de los valores elevados, éstos tiene una mayor desviación.

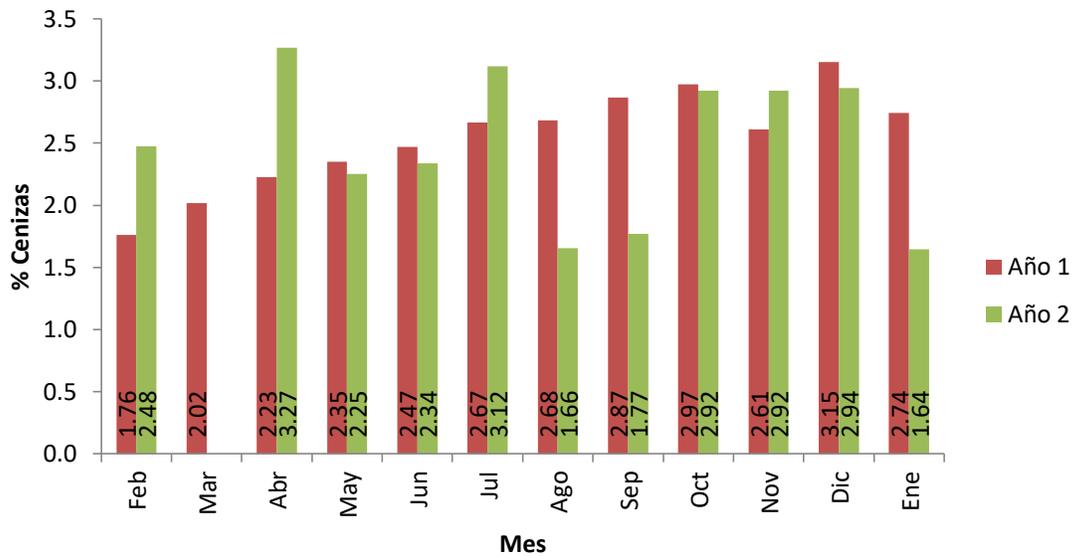


Figura 13. Porcentaje de cenizas en base seca de polen recolectado en dos años consecutivos.

Tabla 12. Contenido de cenizas entre meses de muestreo.

Mes	% Cenizas
Febrero	2.12 ± 0.42 ^f
Marzo	2.02 ± 0.16 ^f
Abril	2.75 ± 0.60 ^{abcde}
Mayo	2.3 ± 0.20 ^{def}
Junio	2.4 ± 0.09 ^{bcdef}
Julio	2.89 ± 0.28 ^{abc}
Agosto	2.17 ± 0.59 ^{ef}
Septiembre	2.32 ± 0.64 ^{cdef}
Octubre	2.95 ± 0.06 ^{ab}
Noviembre	2.77 ± 0.19 ^{abcd}
Diciembre	3.05 ± 0.15 ^a
Enero	2.20 ± 0.64 ^{def}

a, b, c, d, f Medias con distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la Figura 14 se puede observar una tendencia al aumento del contenido de cenizas entre los meses de Enero a Diciembre, indicando mayor contenido de minerales conforme pasaron los meses. Esta tendencia se hizo más evidente entre los periodos del calendario apibotánico, encontrando diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre los períodos de cosecha, precosecha y postcosecha destacando el periodo de precosecha como el de mayor contenido de minerales (Tabla 13).

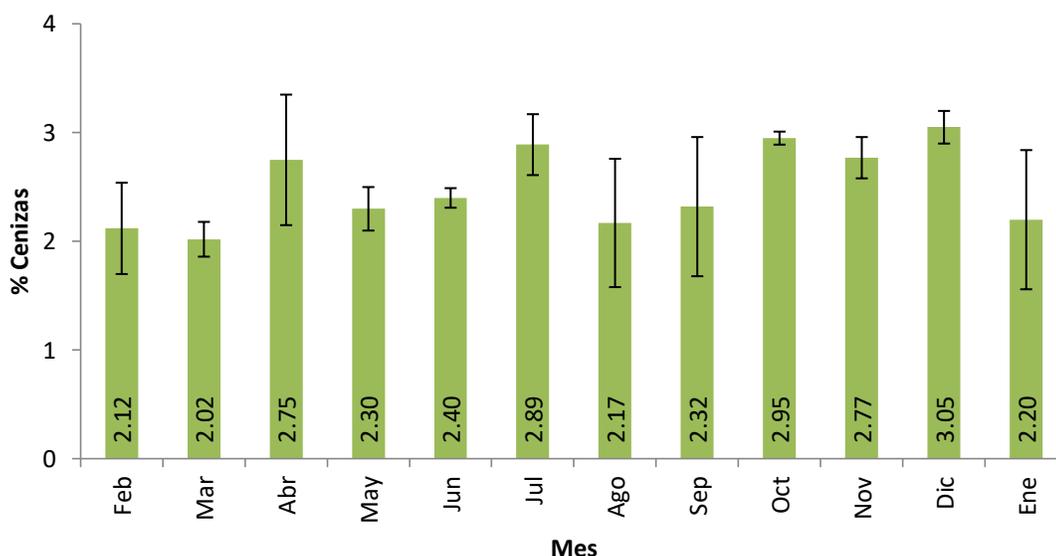


Figura 14. Promedios de porcentaje de cenizas y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.

Tabla 13. Contenido de cenizas en muestras de polen en los diferentes períodos de calendario apibotánico.

Etapa	% Cenizas
Cosecha	2.30 ± 0.49 ^b
Postcosecha	2.44 ± 0.97 ^b
Precosecha	2.92 ± 0.18 ^a

^{a, b} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.1.4. Proteína cruda

Los valores encontrados oscilaron entre 17.93 ± 0.26 % y 36.62 ± 0.31 % para Y-01 y Y-18 respectivamente encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los meses de colecta (Tabla 14).

Tabla 14. Contenido de proteína cruda entre meses de muestreo.

Mes	% Proteína Cruda
Febrero	19.63 ± 1.98 ^e
Marzo	21.9 ± 0.52 ^{cde}
Abril	26.28 ± 1.70 ^{abc}
Mayo	22.76 ± 3.90 ^{cde}
Junio	23.04 ± 1.08 ^c
Julio	29.55 ± 8.16 ^a
Agosto	21.8 ± 1.43 ^{cde}
Septiembre	23.31 ± 2.89 ^{cde}
Octubre	28.78 ± 1.52 ^{ab}
Noviembre	25.39 ± 1.62 ^{abc}
Diciembre	24.55 ± 2.03 ^{bcd}
Enero	20.30 ± 1.47 ^{de}

a, b, c, d, e Medias con distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

De acuerdo a la norma el rango permitido de proteína es de 12 - 18%, encontrando muestras por encima del valor antes mencionado, esto no implica que la calidad del polen sea menor; por el contrario, su valor nutrimental resulta ser mayor. López Herrera y otros (2009) también reportan valores elevados en proteína para muestras de polen de Campeche (16.3 - 26.7%), esto indica que la región puede ser considerada como un importante productor de polen con alto valor proteico.

Otros resultados son 7.00 - 17.5% para polen chiapaneco (Molina Urbina y otros, 2008) y 16.2 ± 0.00 - 25.5 ± 0.02 % para polen colombiano (Mesa Valencia, 2015). Los amplios rangos de proteína encontrados, se explica por la variedad en el origen botánico, época del año y lugar geográfico de recolección.

En cuanto al comportamiento del contenido de proteína cruda durante el año como se muestra en la Figura 15 se pueden distinguir tres picos con alto contenido de

proteína en las muestras; cada uno de los picos corresponde a los períodos del calendario apibotánico, siendo el mes de Abril para la etapa de Cosecha, Julio para la etapa de postcosecha y octubre para la etapa de precosecha. El mes de julio a pesar de que presenta un alto contenido de proteína cruda también presentó la mayor desviación estándar. Sin embargo, se encontraron diferencias entre los periodos del calendario apibotánico, siendo el período de precosecha con el mayor contenido de proteína cruda, similar al de post cosecha tal como se muestra en la Tabla 15.

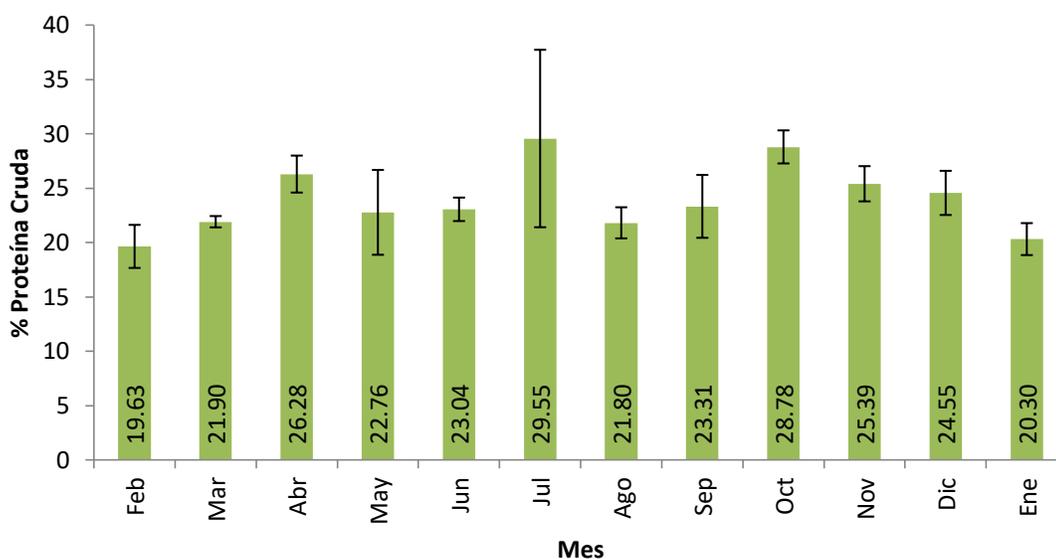


Figura 15. Promedios de porcentaje de proteína cruda y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.

Tabla 15. Contenido de cenizas en muestras de polen en los diferentes períodos de calendario apibotánico.

Etapa	% Proteína Cruda
Cosecha	22.21 ± 3.27 ^b
Postcosecha	24.42 ± 5.03 ^{ab}
Precosecha	26.24 ± 2.47 ^a

^{a, b} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Pacheco Herrera (2009) en su trabajo reporta que durante el mes de julio se presenta el menor número de especies en floración, y lo cual puede deberse a que las lluvias impiden el pecoreo a grandes distancias limitando a las abejas al pecoreo en las floraciones más cercanas. Teniendo en cuenta estos factores y que las floraciones no siempre son iguales durante los años, esto podría explicar las fluctuación tan notable que se encontraron entre años y además pudo existir floraciones atípicas de algún recurso botánico.

7.1.5. Grasa Cruda

La norma mexicana establece un rango de 2.5 a 6.5% de contenido de grasa cruda. Los materiales analizados se encontraron entre 1.51 ± 0.02 % para Y-03 y 7.84 ± 0.01 % para Y-19. Algunos autores reportan 2.88 - 7.62% para polen chiapaneco (Molina Urbina y otros, 2008) y 2.7 ± 0.03 % a 9.6 ± 0.05 % para polen colombiano (Mesa Valencia, 2015).

Se encontraron diferencias significativas tanto entre las muestras, como entre los meses (Tabla 16), pero no entre los años de muestreo. En cuanto al comportamiento de este parámetro como se observa es uno de los más variables aunque se puede distinguir nuevamente que el periodo de precosecha (Octubre a Diciembre) tiene una menor desviación estándar y una leve tendencia a ir incrementando conforme pasaron los meses.

Tabla 16. Contenido de Grasa Cruda (B.S.) del polen entre meses de muestreo.

Mes	% Grasa Cruda
Febrero	3.82 ± 0.77 ^{abcd}
Marzo	2.48 ± 0.20 ^{cd}
Abril	2.31 ± 0.93 ^f
Mayo	4.82 ± 0.91 ^{abc}
Junio	5.40 ± 1.18 ^{ab}
Julio	2.76 ± 1.14 ^{df}
Agosto	5.31 ± 2.91 ^{ab}
Septiembre	5.78 ± 2.46 ^a
Octubre	3.41 ± 0.78 ^{bcd}
Noviembre	4.38 ± 0.82 ^{abcd}
Diciembre	5.19 ± 0.31 ^{ab}
Enero	3.01 ± 0.97 ^{cd}

a, b, c, d, f Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sin embargo, se puede observar ver que en el período comprendido de Junio a Septiembre (Postcosecha) de acuerdo a la Tabla 17 presentó el mayor contenido de grasa cruda, esto puede ser dado por la variabilidad de las desviación estándar.

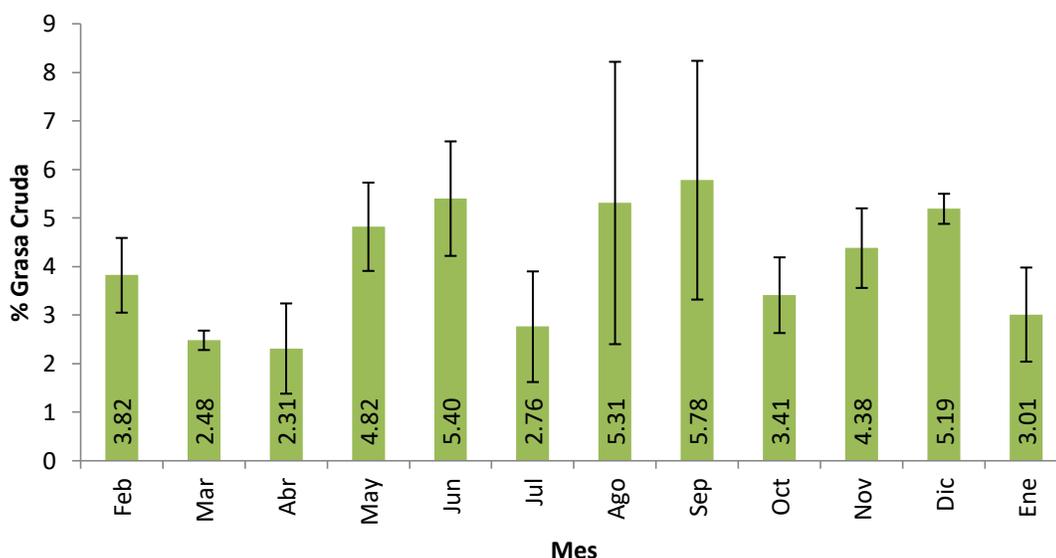


Figura 16. Promedios de porcentaje grasa cruda y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.

Tabla 17. Contenido de Grasa Cruda (B.S.) en muestras de polen en los diferentes períodos de calendario apibotánico.

Etapa	% Grasa Cruda
Cosecha	3.38 ± 1.22 ^b
Postcosecha	4.81 ± 2.23 ^a
Precosecha	4.32 ± 0.97 ^{ab}

^{a, b} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El contenido de extracto crudo o grasa cruda tiene una dualidad en cuanto a su importancia ya que existen ciertos ácidos grasos como el linolénico, mirístico y láurico que tienen propiedades bactericidas y antifúngicas, pero también se menciona que otros ácidos grasos pueden promover el enranciamiento de la muestra (Mesa Valencia, 2015).

7.1.6. pH

Las muestras se encontraron en un rango de 4.00 ± 0.00 para Y-24 y 5.28 ± 0.02 para Y-02, la norma establece solo un valor mínimo de 4 y no establece un valor máximo. Otras estudios revelan valores de 4.25 - 5.80 para polen chiapaneco (Molina Urbina y otros, 2008)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los meses de recolección (Tabla 18) y el año de recolección, siendo de $4.89 \pm 0.26a$ en el Año 1 y $4.45 \pm 0.34b$ en el Año 2. En cuanto al comportamiento del pH conforme al transcurrió del año se puede observar en la Figura 17 pequeños ciclos oscilantes siendo más evidente en los meses de inicio de cosecha (Enero, Febrero y Marzo), observándose en la Tabla 19 que esta etapa es la que presenta una desviación mayor. Es importante señalar que a pesar de valores por encima de la NMX-FF-094-SCFI-2008 para el contenido de humedad, los valores de pH superiores a 4 indican que no existe por el momento una fermentación de las muestras almacenadas, por lo cual han conservado una estabilidad bastante larga sin alguna degradación aparente.

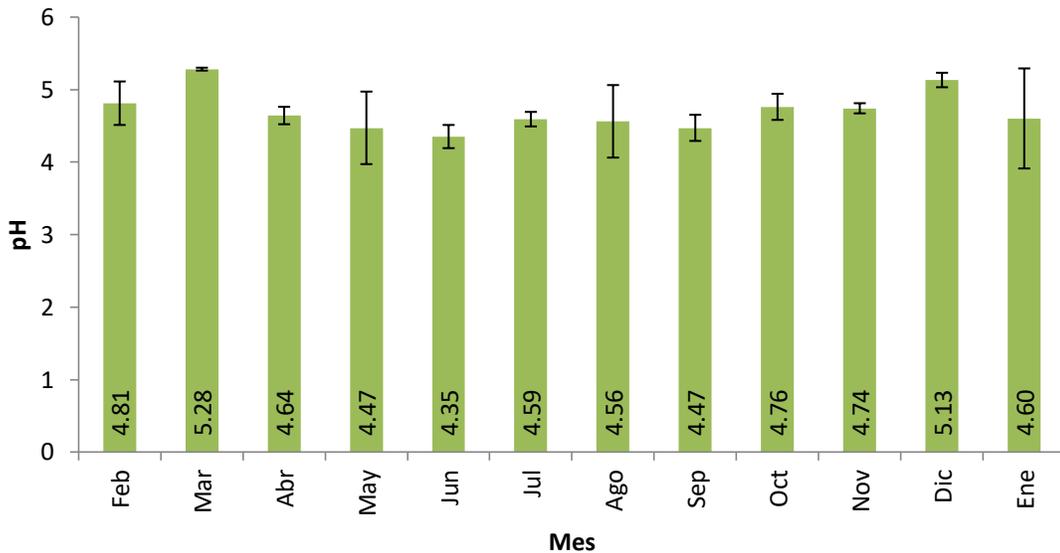


Figura 17. Promedios de pH y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.

Tabla 18. Valor promedio de pH del polen entre meses de muestreo.

Mes	pH
Febrero	4.81 ± 0.30 ^{abc}
Marzo	5.28 ± 0.02 ^a
Abril	4.64 ± 0.12 ^{bc}
Mayo	4.47 ± 0.50 ^c
Junio	4.35 ± 0.16 ^c
Julio	4.59 ± 0.10 ^c
Agosto	4.56 ± 0.50 ^c
Septiembre	4.47 ± 0.18 ^c
Octubre	4.76 ± 0.18 ^{abc}
Noviembre	4.74 ± 0.07 ^{abc}
Diciembre	5.13 ± 0.10 ^{ab}
Enero	4.60 ± 0.69 ^c

^{a, b, c} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 19. Valor de pH en muestras de polen en los diferentes períodos de calendario apibotánico.

Etapa	% Grasa Cruda
Cosecha	4.70 ± 0.46 ^{ab}
Postcosecha	4.49 ± 0.27 ^a
Precosecha	4.88 ± 0.22 ^b

^{a, b} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de moléculas, entre ellos los flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres. Estos compuestos presentes en los producto de la colmena son de importancia debido a que le proporcionan

propiedades bacterianas, fungicidas y antivirales. Se conoce que *Apis mellifera* L. colecta de diversas plantas materiales para la elaboración de su productos como miel, polen, ceras y propóleos, por lo que la composición química variará de acuerdo a la flora de cada región (Bedascarrasbure y otros, 2004).

El polen es el la principal fuente de proteínas de las abejas, provienen de diferentes plantas de acuerdo al ecosistema donde se encuentre el apiario; la flora circundante a esta región pueden biosintetizar compuestos bioactivos como polifenoles y sus derivados, estos pueden ser transferidos al polen de tal manera que se correlaciona con su origen floral (Araneda Durán y otros, 2014).

En el **ANEXO 2** se encuentran los resultados obtenidos de los análisis realizados durante el estudio de fracción fenólica a los extractos de muestras mensuales de polen recolectado durante dos años consecutivos en el municipio de Mocochá, Yucatán. A continuación se muestra un resumen de los valores mínimos y máximos de los parámetros analizados a las muestras:

Tabla 20. Máximos y Mínimos de la composición fenólica del polen analizado.

CLAVE	FENOLES	FLAVONOIDES	FLAVONONAS
Mínimo	61.67 ± 2.72	279.69 ± 9.94	359.25 ± 14.37
	164.67 µg/mL	746.04 µg/mL	
Máximo	155.40 ± 0.69	735.05 ± 3.29	1306.77 ± 25.82
	403.99 µg/mL	2000.05 µg/mL	

Los parámetros se expresan como mg equivalentes del estándar por 100 gramos de polen en base seca, siendo los estándares para fenoles = ácido gálico, para flavonoides = catequina y para flavononas = naringenina. Debajo se encuentran la equivalencia en µg equivalentes del estándar por mL del extracto.

7.2.1. Fenoles

Las cantidades encontradas asilaron entre 61.67 ± 2.72 para Y-19 y 155.40 ± 0.69 para Y- 22 mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de polen en base seca. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto entre las muestras, como entre los meses de recolección (Tabla 21), pero no entre los años.

Tabla 21. Contenido de fenoles entre meses de muestreo.

Mes	Fenoles
Febrero	107.68 ± 30.07^{bcde}
Marzo	140.88 ± 3.81^{ab}
Abril	94.15 ± 2.10^{cdef}
Mayo	75.08 ± 15.12^{ef}
Junio	69.31 ± 2.48^f
Julio	117.51 ± 4.23^{bcd}
Agosto	100.75 ± 42.94^{de}
Septiembre	100.99 ± 37.87^{de}
Octubre	124.19 ± 13.05^{abcd}
Noviembre	136.34 ± 17.45^{abc}
Diciembre	148.97 ± 2.39^a
Enero	112.22 ± 44.16^{bcd}

a, b, c, d, e, f Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al comportamiento del contenido de fenoles a lo largo del año podemos observar en la Figura 18 que de Enero a Marzo hay un incremento en el contenido decayendo al final del periodo de cosecha hasta antes del comienzo de las lluvias (postcosecha), hasta ir incrementando al final del periodo de precosecha. Todos estos datos son comprobados al realizar el análisis (Tabla 22), donde se puede determinar que la mayor concentración de compuestos fenólicos se encuentra en la etapa de precosecha.

Tabla 22. Contenido de fenoles en muestras de polen en los diferentes períodos de calendario apibotánico.

Etapa	Fenoles
Cosecha	103.12 ± 32.45 ^b
Postcosecha	97.14 ± 32.18 ^b
Precosecha	137.70 ± 15.97 ^a

^{a, b} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

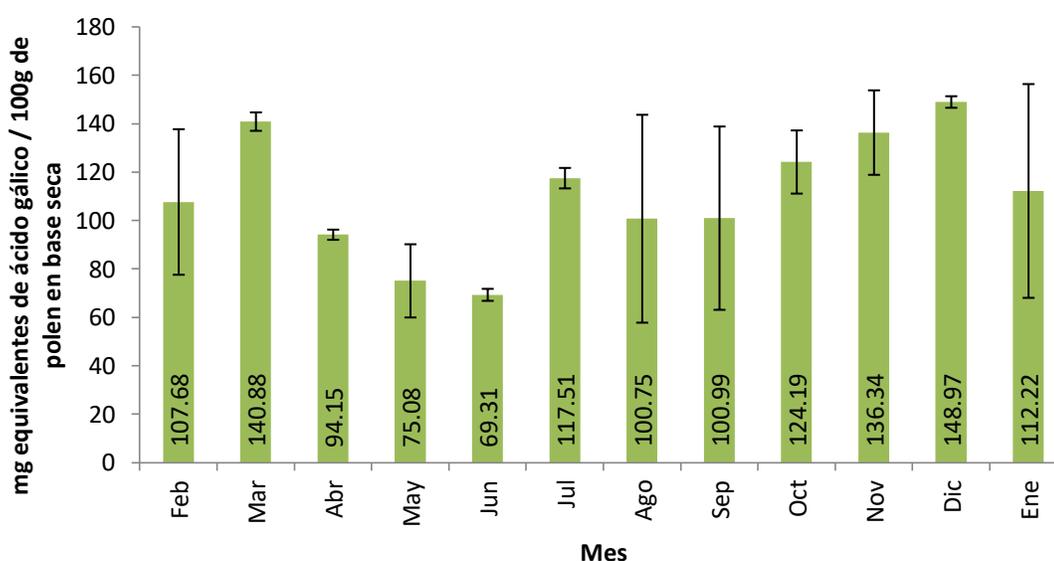


Figura 18. Promedios de fenoles y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.

Comparando los resultados, por su parte Araneda Durán y otros (2014) reporta 1289 - 1541 mg equivalentes de ácido gálico por 100g de pan de abeja base seca, siendo superiores a los encatrados en este estudio, esto se puede deber a que el pan de abeja es sometido a un proceso de fermentación y degradación enzimática donde los hidroxilos de los ácidos fenólicos puede estar más expuestos y por consiguiente dar un mayor contenido, aunque también se tiene que tener en cuenta que la variación entre los países debido a que estos resultados son de Chile.

Molina Urbina y otros (2008), reportan valores de 291.1767 - 452.7829 μg equivalentes de ácido gálico por mL de extracto para polen de Chiapas, siendo similar a los obtenidos en las mediciones de las muestras que van de 164.67 - 403.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Mesa Valencia (2015) encontró 1380 ± 5.10 a 2572.5 ± 211.0 mg equivalentes de ácido gálico por 100g de polen seco en extractos metanólicos siendo superiores también a lo encontrado aunque en este caso el polen pertenece a Colombia.

7.2.2. Flavonoides

El contenido de flavonoides varió entre 279.69 ± 9.94 para Y-20 a 749.85 ± 18.64 mg equivalentes de catequina por 100g de polen en base seca para Y-02. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto entre las muestras, como entre los meses de muestreo (Tabla 23), como entre los años de recolección (Tabla 24).

Molina Urbina y otros (2008) reportan valores entre 308.9751 - 2039.664 μg equivalentes de catequina por mL de extracto, siendo similares a los encontrados en este estudio que van entre 746.04 - 2000.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Mesa Valencia (2015) reportó valores entre 17.8 ± 0.30 a 33.7 ± 0.91 mg equivalentes de quercetina por g de polen seco en extractos metanólicos.

Tabla 23. Contenido de flavonoides entre meses de muestreo.

Mes	Flavonoides
Febrero	632.60 ± 6.88 ^{abc}
Marzo	749.85 ± 18.65 ^a
Abril	414.76 ± 12.23 ^{de}
Mayo	373.94 ± 79.70 ^e
Junio	383.94 ± 79.64 ^e
Julio	409.04 ± 57.15 ^e
Agosto	456.36 ± 98.82 ^{de}
Septiembre	417.91 ± 151.61 ^e
Octubre	566.61 ± 153.77 ^{bcd}
Noviembre	594.95 ± 31.63 ^{bc}
Diciembre	662.51 ± 74.03 ^{ab}
Enero	540.90 ± 120.45 ^{cd}

^{a, b, c, d, e} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 24. Contenido de flavonoides en diferentes años de colecta.

AÑO	Flavonoides
Año 1	566.21 ± 123.49 ^a
Año 2	455.61 ± 142.67 ^b

^{a, b} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al comportamiento del contenido de flavonoides con respecto al año como se observa en la Figura 19 se visualiza dos pendientes de Enero a Marzo pertenecientes al comienzo de la etapa de cosecha y otra de Abril a Diciembre de manera progresiva. Los valores más bajos en el contenido de flavonoides concuerdan con la época de postcosecha. Esto se puede observar de manera más clara en el análisis estadístico realizado a las estas del calendario apibotánico contra el contenido de flavonoides totales (Tabla 25); sin embargo a pesar que el periodo de

precosecha y cosecha estadísticamente son iguales, la variabilidad es más amplia en el período de cosecha.

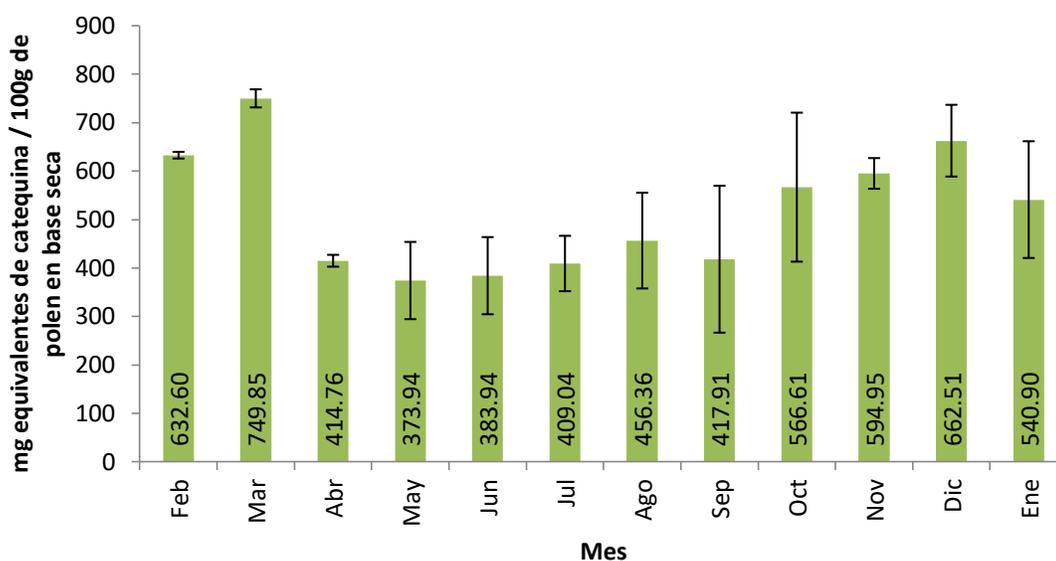


Figura 19. Promedios de flavonoides y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.

Tabla 25. Contenido de flavonoides en los diferentes períodos de calendario apibotánico.

Etapa	Flavonoides
Cosecha	535.98 ± 152.71 ^a
Postcosecha	418.66 ± 101.70 ^b
Precosecha	611.43 ± 101.01 ^a

^{a, b} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.2.3. Flavononas

El contenido de flavononas varió entre 349.25 ± 14.37 a 1306.77 ± 25.82 mg equivalentes de naringenina por 100g de polen en base seca para Y-15 y Y-01

respectivamente. Se encontraron diferencias significativa ($p < 0.05$) entre las muestras y entre la año de recolección (Tabla 26), pero no entre los meses de muestreo ($p > 0.05$).

Tabla 26. Contenido de flavononas en diferentes años de colecta

AÑO	Flavononas
Año 1	908.29 ± 248.54 ^a
Año 2	585.95 ± 162.64 ^b

^{a, b} Distintas literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al comportamiento de las flavononas en el transcurso del año, como se observa en la Figura 20 se tiene ciclos de alza y descenso de las concentraciones. No se han encontrado reportes de este parámetro de la región pero estos resultados servirán como futuras referencias.

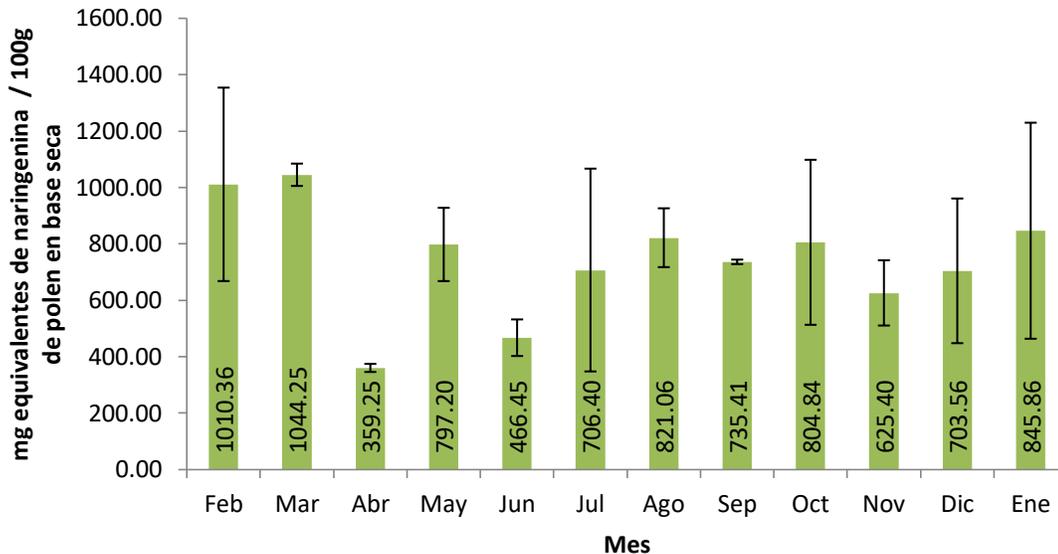


Figura 20. Promedios de flavononas y desviación estándar de las muestras por mes de recolección.

Se encontró que existe una correlación entre el contenido de fenoles y flavonoides, así como entre flavonoides y flavononas, siendo $r = 0.7828$ y $r = 0.3874$ con $p < 0.05$ y nivel de confianza del 95.0 %.

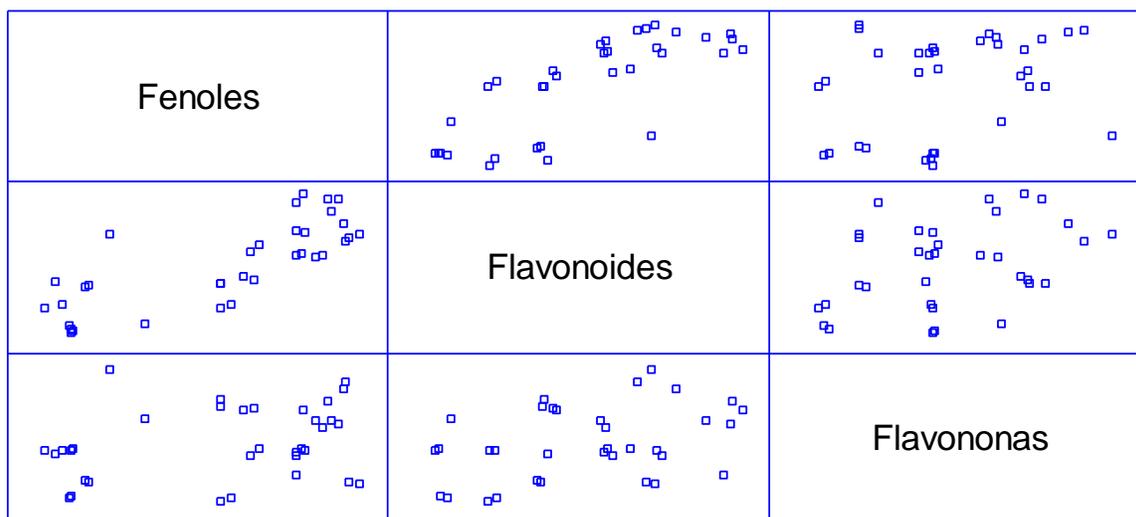


Figura 21. Correlación de compuestos polifenólicos

Araneda Durán y otros (2014), establecieron variaciones del contenido de compuestos polifenólicos de cuanto a su ubicación geográfica y mencionan una correspondencia entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales y flavonoides en el origen botánico. Las correlaciones encontradas son congruentes al compararlos con la ruta del ácido siquímico de donde se sintetizan los compuestos de interés. Los primeros en ser sintetizados son los ácidos fenólicos y a partir de ellos comienza la condensación de los anillos para la obtención de flavonoides y posteriormente las flavononas, de esto surge que la correlación sea más fuerte entre los dos primeros y disminuya entre los flavonoides y flavononas.

7.3. Determinación de color

En el **ANEXO 3** se encuentran los resultados obtenidos de los análisis realizados durante la determinación de color a los extractos de las muestras mensuales de

polen recolectado durante dos años consecutivos en el municipio de Mocochoá, Yucatán. A continuación se muestra un resumen de los valores mínimos y máximos de los parámetros analizados a las muestras:

Tabla 27. Máximos y mínimos en la medición de color de los extractos etanólicos.

	h	C	L	a	b
Mínimo	91.43 ± 0.20	37.65 ± 1.26	76.91 ± 2.36	-18.18 ± 0.17	34.38 ± 1.34
Máximo	114.07 ± 0.72	82.93 ± 0.65	94.96 ± 0.36	-2.02 ± 0.32	82.88 ± 0.65

Chroma (C), Luminosidad (L), a y b no cuentan con unidades. Ángulo Hue (h) como su nombre lo indica es en grados.

Todos los parámetros calculados contaron con diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto entre muestras, mes, etapa del calendario apibotánico y año; para fines prácticos y debido a los objetivos planteados en este trabajo solo se presentarán los datos de acuerdo a los meses de muestreo.

Tabla 28. Parámetros de color en los extractos etanólicos de polen

Mes	h	C	L	a	b
Feb	100.12 ± 7.44 ^b	65.49 ± 13.82 ^{ab}	86.90 ± 5.14 ^{cd}	-9.96 ± 5.94 ^{abc}	64.28 ± 15.00 ^{ab}
Mar	102.21 ± 0.38 ^{ab}	60.88 ± 0.92 ^{abc}	89.25 ± 0.25 ^{abcd}	-12.88 ± 0.21 ^{bcde}	59.50 ± 0.98 ^{abc}
Abr	109.58 ± 0.62 ^a	53.15 ± 2.02 ^{bc}	93.62 ± 0.46 ^a	-17.80 ± 0.13 ^e	50.07 ± 2.09 ^{bc}
May	107.41 ± 1.04 ^a	56.81 ± 1.21 ^{bc}	91.93 ± 0.96 ^{ab}	-17.01 ± 1.28 ^e	54.19 ± 0.94 ^{bc}
Jun	106.74 ± 0.84 ^a	52.96 ± 2.18 ^c	91.12 ± 1.41 ^{ab}	-15.23 ± 0.24 ^{de}	50.72 ± 2.30 ^c
Jul	106.41 ± 8.41 ^a	53.00 ± 17.04 ^c	90.76 ± 4.74 ^{abc}	-12.86 ± 2.73 ^{cde}	49.15 ± 16.26 ^c
Ago	100.63 ± 2.71 ^b	64.41 ± 5.39 ^{ab}	88.33 ± 1.79 ^{bdc}	-11.66 ± 1.99 ^{bcd}	63.28 ± 5.85 ^{ab}
Sep	97.68 ± 4.77 ^b	66.77 ± 12.26 ^{ab}	85.32 ± 2.88 ^{de}	-8.05 ± 3.90 ^{ab}	66.09 ± 12.85 ^a
Oct	97.59 ± 0.44 ^b	66.96 ± 3.13 ^{ab}	85.12 ± 1.17 ^{de}	-8.83 ± 0.17 ^{abc}	66.37 ± 3.17 ^a
Nov	95.79 ± 0.70 ^b	70.21 ± 1.16 ^a	82.22 ± 2.42 ^e	-7.09 ± 0.91 ^a	69.84 ± 1.12 ^a
Dic	96.23 ± 5.26 ^b	71.29 ± 10.39 ^a	81.56 ± 5.83 ^e	-6.94 ± 5.41 ^a	70.68 ± 10.95 ^a
Ene	99.52 ± 8.19 ^b	68.80 ± 15.55 ^a	86.39 ± 5.63 ^d	-9.46 ± 7.07 ^{abc}	67.58 ± 16.84 ^a

Distintas literales en la misma columna indica diferencias significativas ($p < 0.05$). El Ángulo Hue (h) se expresa como grados de giro, mientras que Chroma (C), Luminosidad (L), a y b no cuentan con unidades.

Los valores de Ángulo Hue (h) encontrados en los extractos de polen fueron de 95.79 ± 0.70 a 109.58 ± 0.62 grados que son valores que van entre el color amarillo y verde bajo, tal como se muestra en la Figura 22. Sin embargo, este parámetro coincide sus mayores valores a finales del periodo de cosecha y principios de postcosecha, es decir valores con un color más cercano al verde, mientras que en el periodo de precosecha los valores son más cercanos al color amarillo.

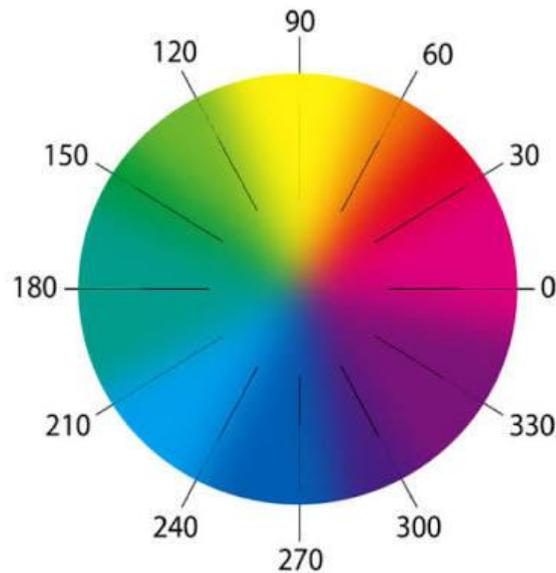


Figura 22. Relación entre los grados y el color en ángulo Hue

Para los valores de Chroma (C) los valores fueron de 52.96 ± 2.18 a 71.29 ± 10.39 que son valores de saturación por encima del centro (cero) es decir los colores no tienden a gris si no a colores más sólidos e incluso el periodo de precosecha cuenta con los colores más consistentes, muestras que los colores de en el periodo de cosecha y postcosecha tienden a ser más opacos tal como se muestra en la Figura 23.

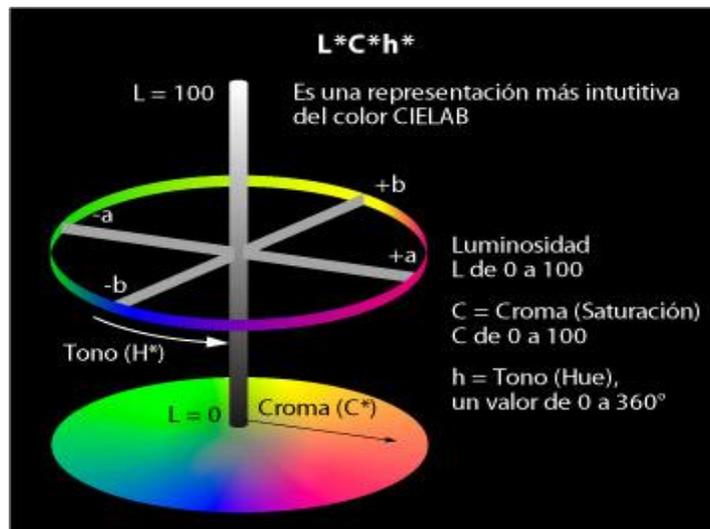


Figura 23. Diagrama de color L*C*h*a*b*

El parámetro de Luminosidad (L) el periodo de precosecha cuenta con los valores más pequeños es decir que menos brillan o reflejan la luz, mientras que las etapas de cosecha y postcosecha tienden a refractar más la luz (Figura 23); en esta ocasión los valores van de 81.56 ± 5.83 a 93.62 ± 0.46 .

En el caso del parámetro *a* los valores van de -17.80 ± 0.13 a -6.94 ± 5.41 , por lo cual sabiendo que *+a* tiende a colores rojos y *-a* a colores verdes (Figura 24), todos los extractos tienden a ser con tonalidades verdes, encontrando los tonos más fuertes en los periodos de cosecha y post cosecha, muestras que en la etapa de precosecha los valores son menores a cero pero tienden a cero.

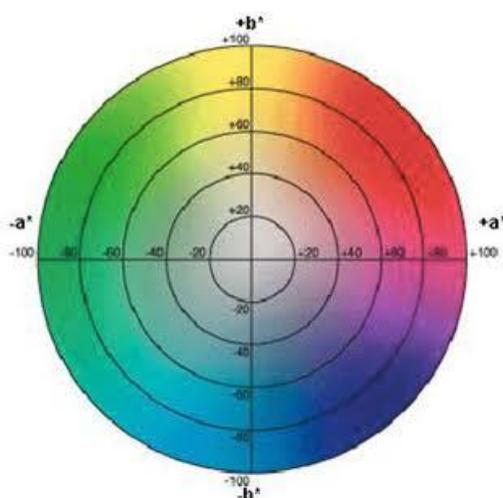


Figura 24. Diagrama de color a^*b^*

En el parámetro b los valores van de 49.15 ± 16.26 a 70.68 ± 10.95 , en esta cuestión el valor de $+b$ tiende a colores amarillos y $-b$ a los colores azules (Figura 24), todos los extractos tienden a ser amarillos, encontrando los tonos más fuertes en el periodo de precosecha y los colores menos fuertes en las otras dos etapas del calendario apibotánico.

A continuación se corrió un análisis multivariado (correlaciones) en el paquete estadístico STATGRAPHICS CENTURION XV, para determinar si existe alguna relación entre los parámetros de color obtenidos y el contenido de los compuestos fenólicos. Los resultados se expresan en la Tabla 29, cada intersección entre una columna y una fila representa un bloque donde se exhiben los datos de la correlación.

Tabla 29. Correlaciones entre los parámetros de color y los compuestos fenólicos

	h	C	L	a	b
Fenoles	-0,6954	0,6690	-0,6814	0,7356	0,6766
	(66)	(66)	(66)	(66)	(66)
	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Flavonoides	-0,6197	0,6398	-0,5923	0,5912	0,6485
	(66)	(66)	(66)	(66)	(66)
	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Flavononas	-0,3861	0,3867	-0,3185	0,3300	0,3770
	(66)	(66)	(66)	(66)	(66)
	0,0014	0,0013	0,0092	0,0068	0,0018

Ángulo Hue (h), Chroma (C), Luminosidad (L). El primer número de un bloque indican los coeficientes de correlación. También se muestra, entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente, con un nivel de confianza del 95,0%

De manera general podemos observar que tanto fenoles como flavonoides presentaron valores de $P < 0.05$ lo cual indican que tienen alguna correlación con los parámetros de color analizados (tercer valor del bloque en color rojo), pero también podemos notar que la correlación (primer valor de cada bloque) desciende entre filas, es decir Fenoles>Flavonoides>flavonas y dihiroflavonas ya sea de manera positiva o negativa; sin embargo las mejores correlaciones se obtuvieron por tal motivo para los fenoles totales.

Los extractos con color amarillo y leves tonalidades verdes ($a < 0$ y $b > 0$) tendrán mayores contenidos de compuestos fenólicos. Y estas características de los extractos etanólicos coinciden con el periodo de precosecha (octubre a diciembre), por lo cual se recomienda la coleta en estos meses para obtener polen apícola con características peculiares.

La correlación de Luminosidad (L) con fenoles, se explica de la siguiente manera, los valores más bajos de L para los extractos (muestras que reflejan menos la luz) obtuvieron mayores concentraciones de Fenoles, que aquellos que presentaron valores más cercanos a 100 (muestran que reflejan más la luz), tal como se muestra en la Figura 25. El comportamiento es similar para flavonoides, flavonas y dihidroflavonas pero con una menor correlación.

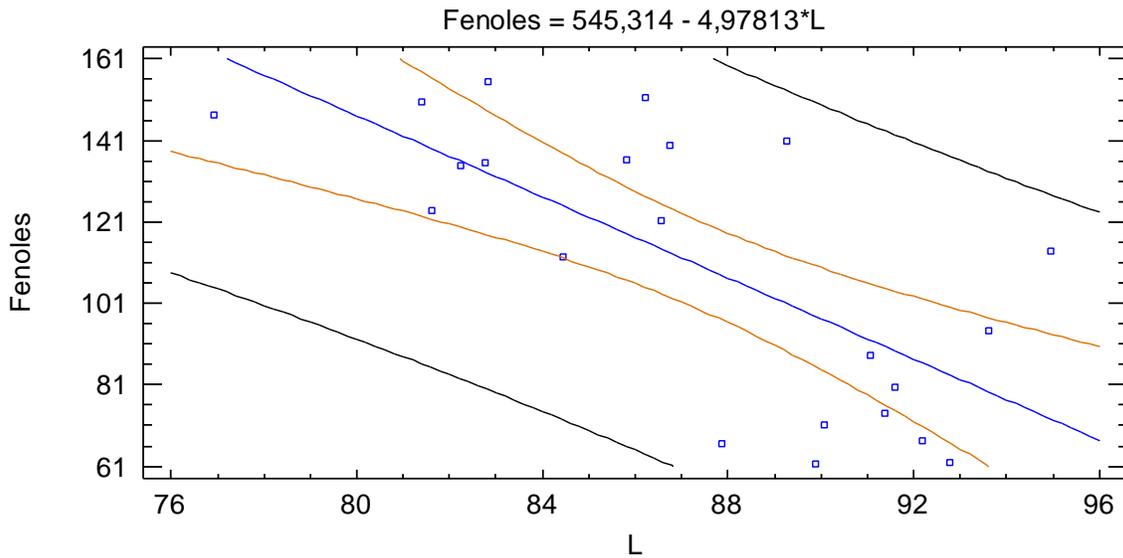


Figura 25. Gráfica de modelo ajustado para L y fenoles.

En el caso de la correlación de *a* con el contenido de Fenoles en los extractos etanólicos indica que valores por debajo de cero, pero cercanos a cero tendrán mayores concentraciones, tal como se muestra en la Figura 26; de la misma manera ocurre con el contenido de flavonoides y, flavonas y dihidroflavonas pero en estos casos con menores correlaciones

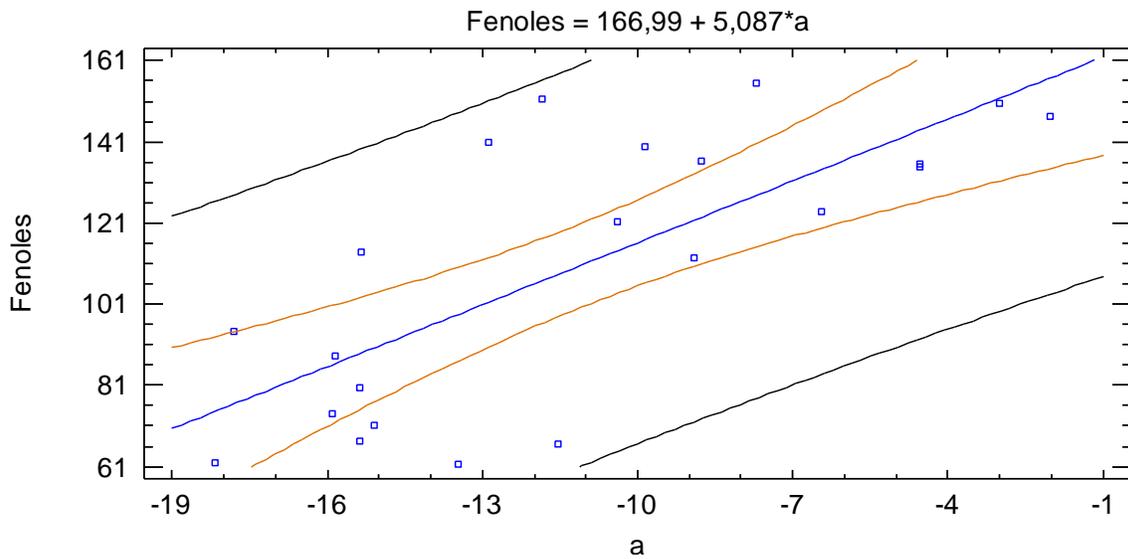


Figura 26. Gráfica de modelo ajustado para *a* y fenoles.

Para el parámetro *b* con el contenido de Fenoles indica que extractos con valores mayores (color amarillo más intenso) tendrán mayores concentraciones, tal como se muestra en la Figura 27; siendo similar el comportamiento con el contenido de flavonoides, flavonas y dihidroflavonas pero en estos casos con menor correlación.

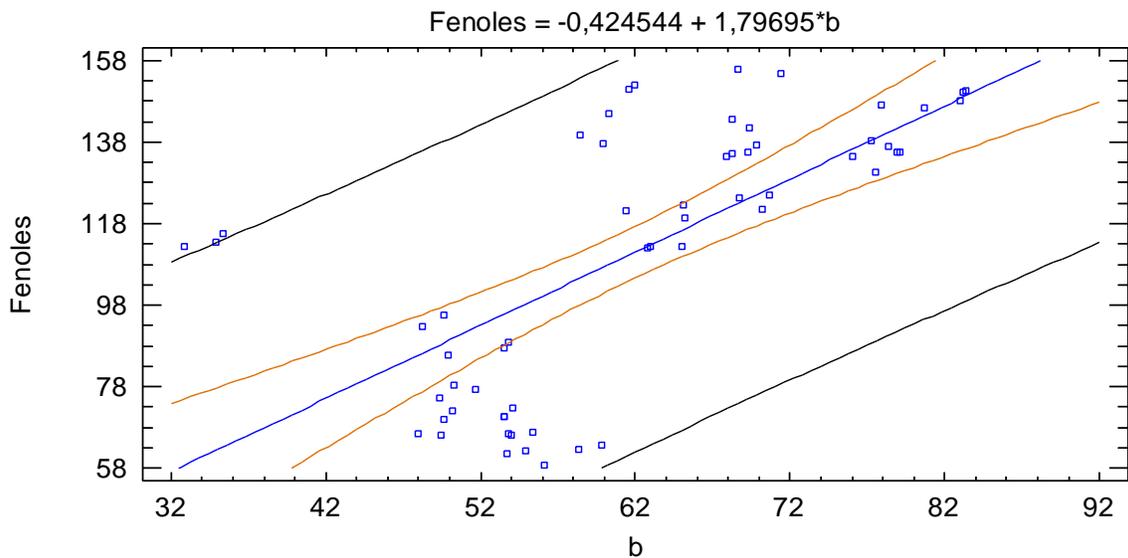


Figura 27. Gráfica de modelo ajustado para *b* y fenoles.

7.4. Evaluación antimicrobiana

En el ANEXO 4 y ANEXO 5 se encuentran los resultados obtenidos de los análisis realizados durante el estudio de la actividad antimicrobiana por difusión en disco, mientras que en el ANEXO 6 a los extractos de muestras mensuales de polen recolectado durante dos años consecutivos en el municipio de Mocoohá, Yucatán.

7.4.1. Difusión en disco

Las muestras Y-02 pertenecientes al mes de Marzo del Año 1 y Y-21 perteneciente al mes de Octubre del Año 2 fueron las dos muestras que presentaron mayor contenido de flavonoides con $2000.05 \pm 49.73 \mu\text{g/mL}$ y $1960.72 \pm 8.78 \mu\text{g/mL}$ de extracto respectivamente.

Por el contrario las muestras Y-05 pertenecientes al mes de Junio del Año 1 y Y-20 perteneciente al mes de Septiembre del Año 2 fueron las dos muestras que presentaron menor contenido de flavonoides con $792.18 \pm 22.59 \mu\text{g/mL}$ y $746.04 \pm 26.53 \mu\text{g/mL}$ de extracto respectivamente.

Sin embargo, como se puede observar en la Figura 28 y Figura 29 ambas muestras con mayor contenido de flavonoides no presentaron actividad a $50 \mu\text{g}$ de flavonoides para ninguna de las dos bacterias estudiadas, mientras que a $150 \mu\text{g}$ la muestra Y-02 solo presentó actividad contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y la muestra Y-21 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

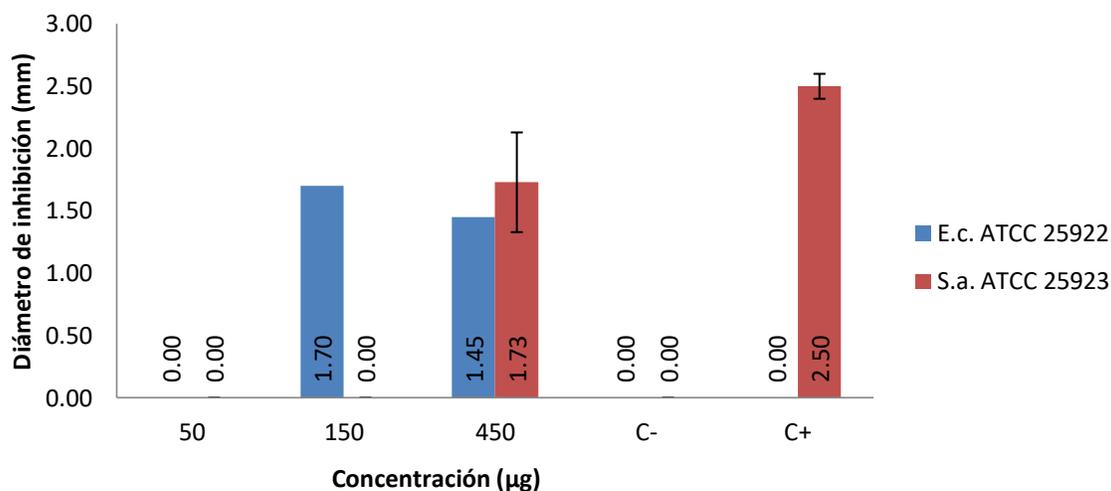


Figura 28. Halos de inhibición de la muestra Y-02 contra *E. coli* y *S. aureus* por el método de difusión en disco.

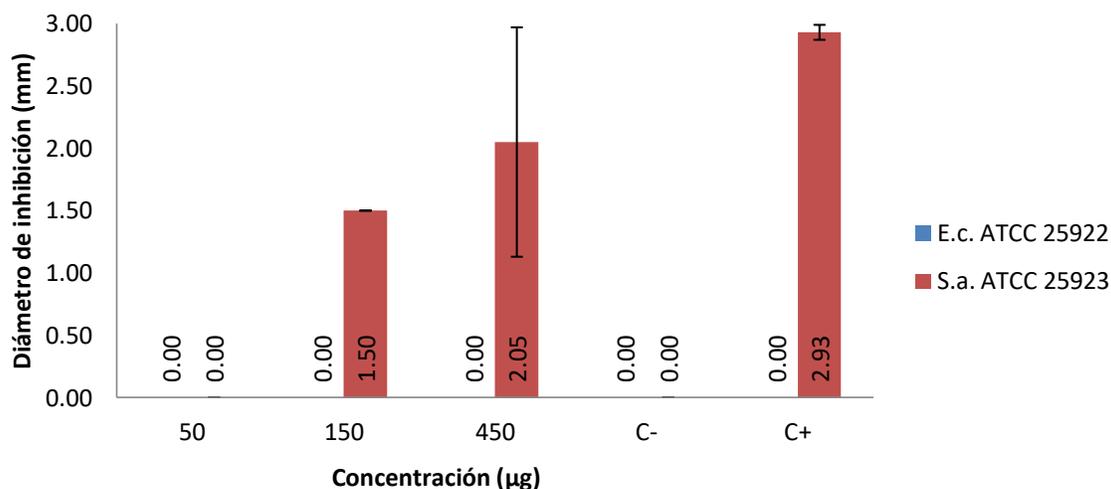


Figura 29. Halos de inhibición de la muestra Y-21 contra *E. coli* y *S. aureus* por el método de difusión en disco.

Caso contrario con las muestras Y-05 y Y-20 (Figura 30 y Figura 31), ya que ambas presentaron actividad a partir de los 50 µg para ambas bacterias, si se compra que a pesar del contenido de flavonoides de las muestras estas se probaron a las mismas

concentraciones se puede mencionar que la muestras provienen de meses diferentes y años diferentes.

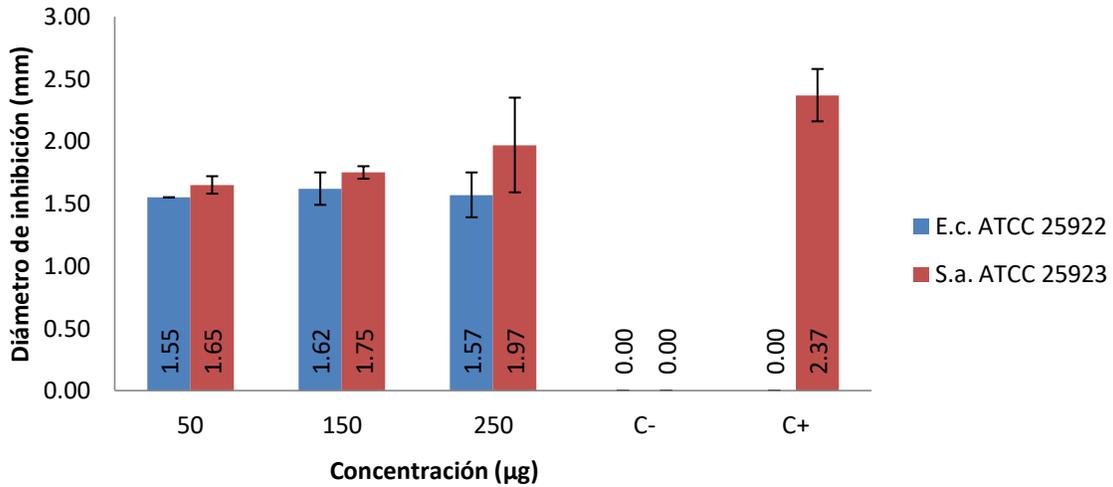


Figura 30. Halos de inhibición de la muestra Y-05 contra *E. coli* y *S. aureus* por el método de difusión en disco.

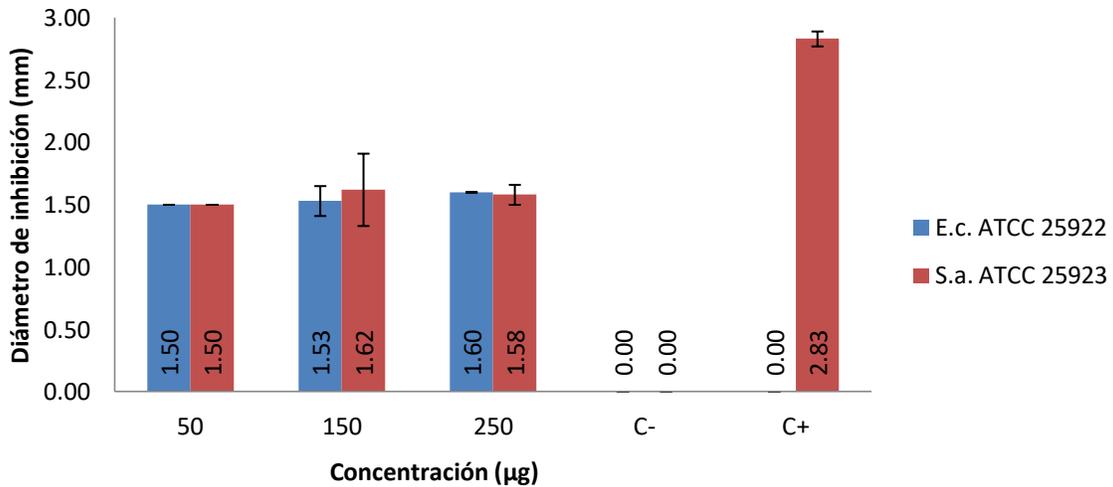


Figura 31. Halos de inhibición de la muestra Y-20 contra *E. coli* y *S. aureus* por el método de difusión en disco.

De los datos anteriores es importante recalcar que Capres y otros (2007) realizaron el mismo procedimiento para muestras de polen en dos regiones de Brasil y

encontraron actividad contra *Staphylococcus aureus* en el estado de Alagoas mientras que no se encontró actividad en el estado de Parana, por lo cual podemos corroborar que la ubicación geográfica donde se recolecta el polen es importante. A pesar que en este trabajo no se realizó actividad contra *Escherichia coli* si se realizó contra *Pseudomonas aeruginosa* otra bacteria gram negativa, y caso contrario a lo antes mencionado los pólenes recolectados en los dos estados de Brasil si presentaron actividad contra esta bacteria gram negativa.

Nuevamente Carpes y otros (2009) realizaron un estudio similar al mencionado anteriormente, pero esta vez en la región sur de Brazil, donde no encontraron actividad antibacteriana contra ninguna de los 9 microorganismos ensayados entre ellos *Staphylococcus aureus* y dos bacterias gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*). Carpes menciona que a pesar del alto contenido de compuestos fenólicos estos no presentaban actividad contra ninguno de los patógenos, por lo que no siempre un alto contenidos de fenoles nos garantiza una alta actividad antimicrobiana, si no que depende de la calidad de estos fenoles lo que les confiere dicha capacidad.

Molina Urbina y otros (2008), por su parte encontró actividad nuevamente solo contra *Staphylococcus aureus* y en este caso si se estudió contra *Escherichia coli* sin encontrar un efecto, en este reporte se evaluó la actividad de pólenes de cuatro zonas de Chiapas y aunque ha sido un referente para este trabajo y sus resultados en esta ocasión podemos mencionar que los extractos del polen de estudiados presentaron actividad contra ambas bacterias.

Cabe aclarar que en las Figura 32 y Figura 33, la muestra Y-04 y Y-17 no se midió la inhibición a 250 µg, si no a 450 µg, pero por cuestiones de espacio no se agregaron estos datos, aunque se pueden comprobar en los anexos. Debido a que esta técnica se considera como cualitativa o semi-cuantitativa en las figuras siguientes se

muestras aquellas muestras que presentaron de mayor a menor actividad de izquierda a derecha.

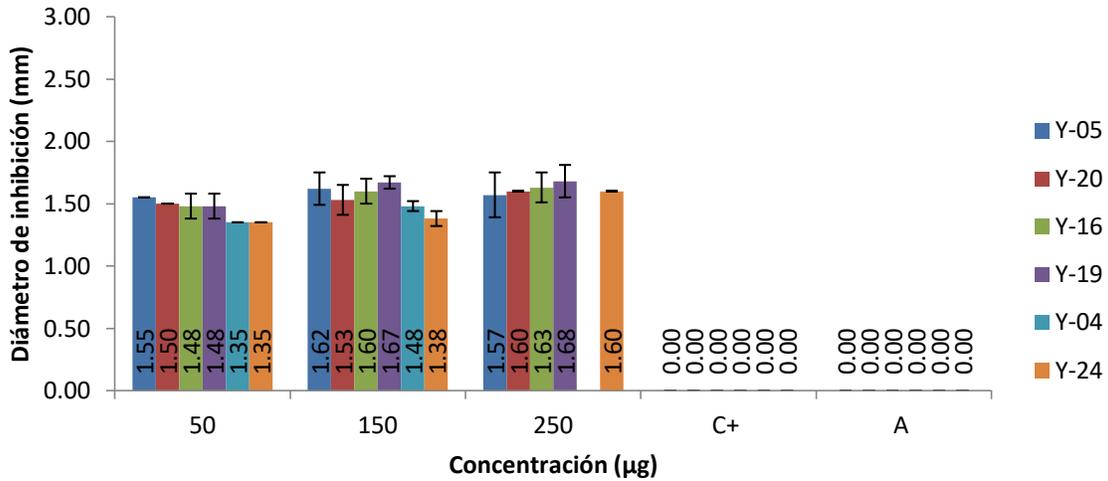


Figura 32. Halos de inhibición de las muestras que presentaron mayor diámetro contra *Escherichia coli* ATCC 25922 por el método de difusión en disco

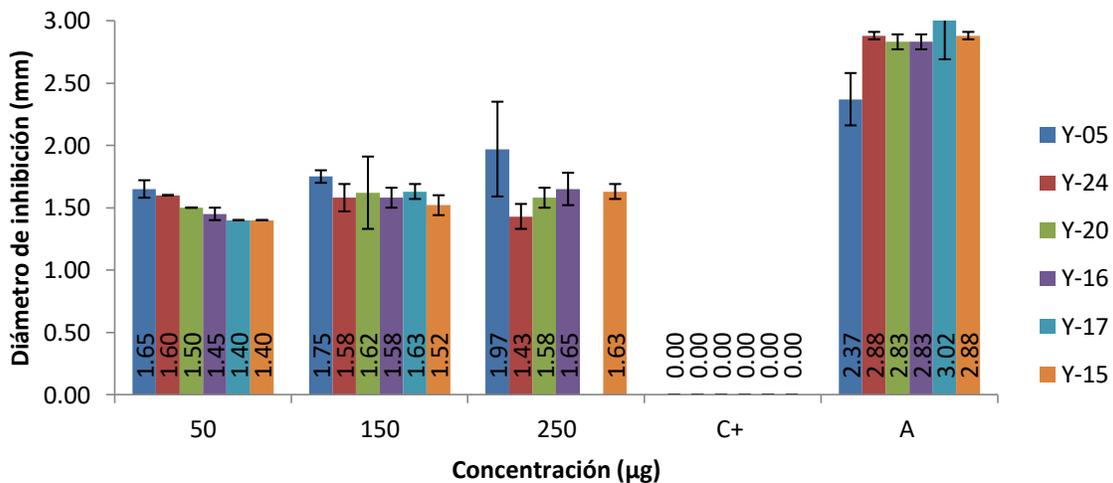


Figura 33. Halos de inhibición de las muestras que presentaron mayor diámetro contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión en disco

Como se puede observar en las Figura 32 y Figura 33 las muestras Y-05, Y-16 y Y-20 tuvieron actividad contra ambas cepas a diferencia de lo reportado por Molina y otros (2008) los cuales reportaron actividad únicamente contra una bacteria. De esto surgen más interrogantes para responder por lo cual es necesaria la verificación de la floración presente en las muestras, para saber si esta sigue un patrón específico, y como ésta es influenciada por la estación del año y el tipo de vegetación en el cual recolectaron polen las abejas. Es importante subrayar que las muestras estudiadas presentaron mejores actividades contra las dos bacterias estudiadas que por la bibliografía consultada en este documento.

Capres y otros (2007) determinan que para una misma muestra con diferentes procesos de extracción, cada uno de estos extractos tenía diferentes contenidos de compuestos fenólicos y debido a esto es la variación de resultados que obtuvieron. Esto se explica de manera que se varía la concentración del etanol para la extracción, la polaridad de la solución va cambiando, entre menor contenido de etanol mayor será la hidrofilia de la solución y viceversa. Debido a que los fenoles son hidrofóbicos era de esperarse que a mayores concentraciones de etanol mayor sea la extracción de estos compuestos. En este estudio la concentración de etanol utilizada para las extracciones de las muestras fue de 70% por lo se extrajo el mismo tipo de componentes fenólicos en cada una de las muestras.

En la Tabla 30 se muestran las correlaciones entre el contenido de compuestos fenólicos, porcentaje de grasa cruda y los diámetros a 50 y 150 µg de flavonoides tanto para *Escherichia coli* ATCC 25922 como para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Las concentraciones de 250 y 450 µg no se pudieron analizar debido a que no todas las muestras fueron procesadas a dichas concentraciones. De manera general podemos ver que hubo significancias para fenoles, flavonoides y porcentaje de grasa cruda, siendo para este último parámetro las únicas correlaciones positivas para 50 µg contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y 150 µg contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De tal manera que la actividad de las muestras no está dada

por la concentración de los parámetros, en esta ocasión la actividad podría dar por el tipo de fenol o grasa cruda presente. Debido a que el porcentaje de ácidos grasos presentó una correlación positiva sugerimos que los extractos de polen recolectados en el periodo de postcosecha serían candidatos a tener mayores actividades antibacterianas.

Tabla 30. Correlaciones entre los compuestos fenólicos, porcentaje de grasa cruda y diámetro de inhibición contra *E. coli* y *S. aureus*.

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	ATCC 25922		ATCC 25923	
	50 µg	150 µg	50 µg	150 µg
Fenoles	-0,6147	-0,5322	-0,3742	-0,3416
	(44)	(44)	(44)	(44)
	0,0000	0,0002	0,0123	0,0232
Flavonoides	-0,6072	-0,6604	-0,4129	-0,4541
	(44)	(44)	(44)	(44)
	0,0000	0,0000	0,0053	0,0020
Flavononas	-0,1578	-0,1377	-0,2307	-0,0778
	(44)	(44)	(44)	(44)
	0,3062	0,3729	0,1319	0,6157
% Grasa Cruda	0,4846	0,1730	0,0868	0,3051
	(44)	(44)	(44)	(44)
	0,0009	0,2615	0,5752	0,0441

Las concentraciones están estresadas en µg de flavonoides. El primer número de un bloque indican los coeficientes de correlación. También se muestra, entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente, con un nivel de confianza del 95,0%

7.4.2. Difusión en pozo

Se evaluaron 21 extractos etanólicos de polen de *Apis mellifera* L. pertenecientes a la región centro del estado de Yucatán contra *Melissococcus pluton* 49.3 y *Paenibacillus larvae* JM 87.

Las muestras Y-12 pertenecientes al mes de Noviembre del Año 1 y Y-18 pertenecientes al mes de Julio del Año 2 fueron las dos muestras que presentaron mayores áreas bajo las curvas de polifenoles con 47,169 y 44,430 respectivamente. Por el contrario las muestras Y-24 perteneciente al mes de Enero y Y-15 perteneciente al mes de Abril del Año 2 fueron las dos muestras que presentaron menores áreas bajo la curva de polifenoles con 11,230 y 6,357 respectivamente.

Se realizó una correlación entre los diámetros de la técnica de difusión en pozo de las dos bacterias ensayadas y las áreas bajo la curva de los tres compuestos encontrados en las matrices de emisión, sin encontrar correlaciones significativas para ninguno de los parámetros.

Se encontraron una actividad bacteriostática contra el agente causal de la Loque Europea y actividad antibacteriana contra el agente causal de la Loque Americana. Para *Melissococcus pluton* se encontró que la muestra con mayor actividad bacteriostática fue la Y-05 y Y-09 pertenecientes al mes de Junio y Octubre del primer año de recolección, éstas presentaron diámetros de actividad de 2.45 ± 0.35 y 2.05 ± 0.35 cm respectivamente, mientras que las muestras Y-18 y Y-24 pertenecientes a los meses de Julio y Enero del segundo de cosecha presentaron menor diámetro de actividad con 0.73 ± 1.03 y 1.65 ± 0.07 cm respectivamente como se muestra en la Figura 34.

Para *Paenibacillus larvae* JM 87 se encontró que la muestra con mayor actividad fue la Y-23 y Y-22 perteneciente al mes de Noviembre y Diciembre del segundo año de

recolección. Ambas muestras presentaron diámetros de inhibición de 3.48 ± 1.31 y 3.18 ± 0.60 cm respectivamente, por lo contrario las muestras Y-18 y Y-17 referentes a los meses de Julio y Junio del año dos de cosecha fueron aquellas que presentaron menor diámetro de inhibición con 1.00 ± 0.14 y 1.18 ± 0.32 cm respectivamente como se muestra en la Figura 35.

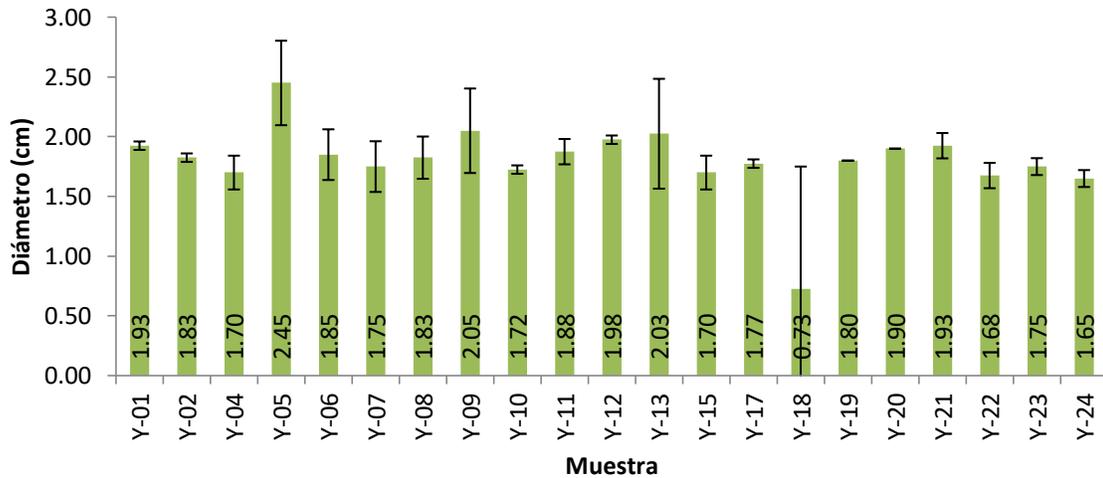


Figura 34. Diámetros de actividad contra *Melissococcus pluton* 49.3 de extractos etanólicos.

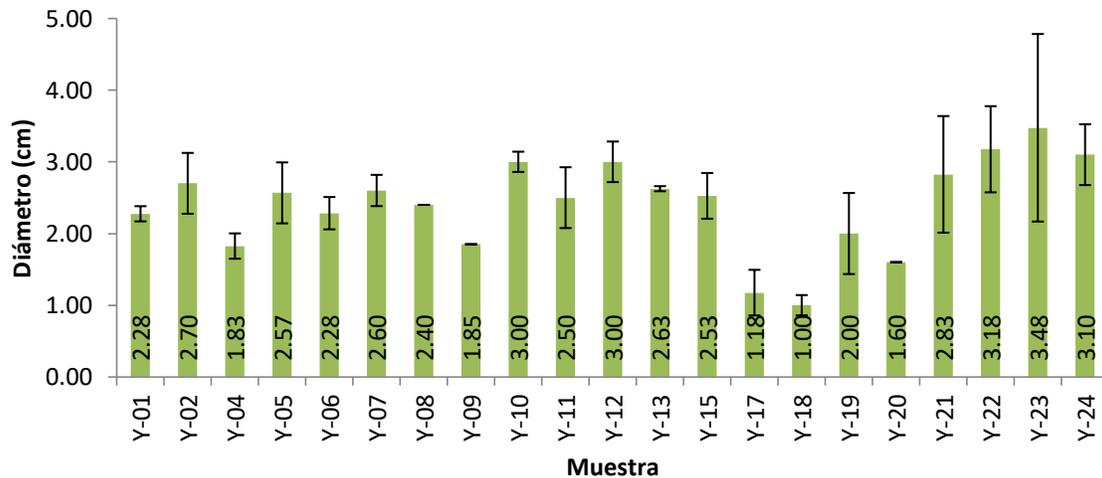


Figura 35. Diámetros de inhibición contra *Paenibacillus larvae* JM 87 de extractos etanólicos.

Carrillo Rodríguez y Medina Medina (2016) reportaron derivado del programa de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo (DEAR) y de la Campaña Nacional contra la Varroosis de las abejas del SENASICA - SAGARPA la prevalencia de ciertas enfermedades y parásitos en las colonias de abejas melíferas del estado de Yucatán. Estos autores reportan que en campo no presentaron signos visibles de ninguno de los agentes causales de loque americana y loque europea; sin embargo, al realizar los análisis por PCR de punto final para la identificación de dichas enfermedades, encontraron la existencia de *Melissococcus pluton* en el 12.4% de los apiarios que fueron muestreados y no se reportó *P. larvae* en ninguna de las colonias.

Estos autores reportan que aunque las colmenas dieron positivo, la enfermedad no se encontraba desarrollada debido a factores como la inmunidad de la abeja, su interacción con el ecosistema y su nutrición, así como su comportamiento higiénico. Todos estos factores pueden influir en la existencia de los agentes sin la presencia de síntomas; sin embargo, encontrar productos naturales es de importancia para disminuir la posibilidad de la afectación de dichos agentes causales.

Sin embargo los resultados obtenidos vienen a dar pauta para entender este fenómeno ocurrido en los apiarios de Yucatán, debido a que se encontró que el polen de todo el año presenta actividad contra el agente causal de la Loque Americana explicando porque Carrillo Rodríguez y Medina Medina (2016) no encontraron este patógeno en toda la región; y de igual manera con el agente causal de la Loque Europea, debido a que los resultados de este trabajo encontró que algunos de los agentes en los extractos le confieren una actividad bacteriostática contra esta patógeno y que impide su rápido crecimiento (junto con otros factores) permitiendo sobrevivir a las larvas hasta llegar a ser abejas adultas.

7.4.3. Concentración mínima bacteriostática (CMB)

Debido a que los extractos de polen presentaron actividad bacteriostática contra *Melissococcus pluton* 49.3 en las pruebas de difusión en pozo se descartó la posibilidad de continuar las pruebas de microdilución y se prosiguió con *Paenibacillus larvae* JM 87 quien presentaba halos de inhibición más definidos por los extractos. Durante el procedimiento de microdilución se observó que el control de etanol al 70% presentaba una inhibición de la bacteria, esto se debe a que las placas de 96 pozos se sellaban al momento de colocar la tapa evitando la evaporación del solvente, fenómeno que no ocurría en las cajas de petri. Por tal motivo se decidió hacer una curva de inhibición de *Paenibacillus larvae* JM 87 contra las diluciones de etanol, los resultados se encuentran en la Figura 36.

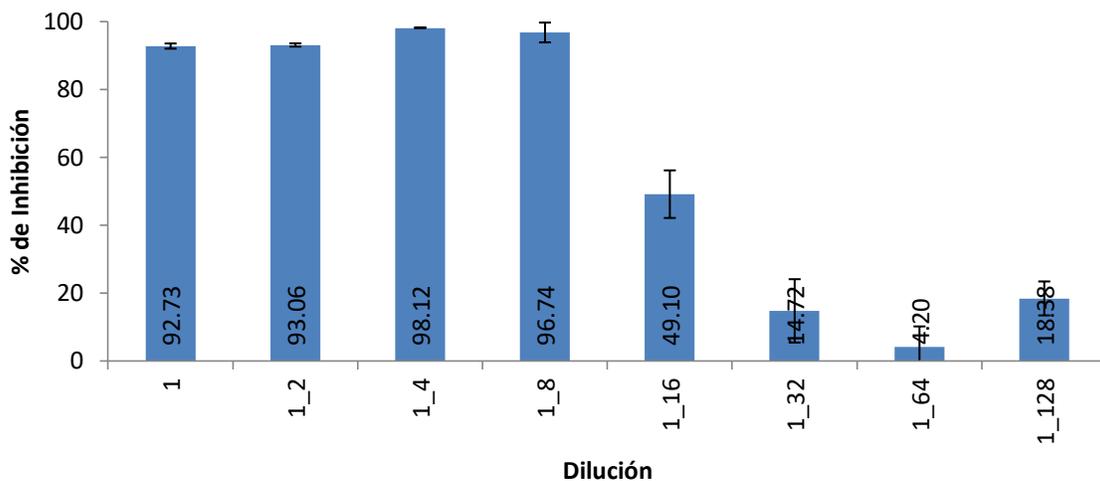


Figura 36. Curva de inhibición de *Paenibacillus larvae* JM 87 contra diluciones de etanol.

Debido a los resultados obtenidos se decidió que el experimento partirá de la dilución 1:16 muestra/medio J que es equivalente a 8.33 mg de muestra extraída en un mL de etanol al 70%. Se realizó una dilución seriada en múltiplos de 2 hasta la mayor

que fue de 1024 diluciones. Los resultados de seis de las muestras se encuentran en la Tabla 31.

Tabla 31. Curvas de inhibición de *Paenibacillus larvae* JM 87 con extractos de polen.

% de Inhibición	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Y-08	105 ± 3	100 ± 0	100 ± 0	99 ± 0	99 ± 0	90 ± 1	15 ± 2
Y-09	96 ± 8	100 ± 2	98 ± 0	99 ± 0	98 ± 1	85 ± 2	38 ± 4
Y-10	116 ± 20	99 ± 0	98 ± 1	98 ± 0	99 ± 0	-10 ± 7	21 ± 7
Y-21	104 ± 2	101 ± 2	98 ± 1	99 ± 1	25 ± 20	6 ± 3	-16 ± 3
Y-22	112 ± 4	99 ± 1	99 ± 0	99 ± 0	90 ± 1	25 ± 32	30 ± 3
Y-23	104 ± 3	99 ± 0	57 ± 62	99 ± 1	-26 ± 13	30 ± 7	30 ± 17
Y-24	101 ± 4	99 ± 1	99 ± 1	47 ± 7	48 ± 7	-5 ± 16	22 ± 2

Se determinó que la mejor CMB 90 de las 6 muestras analizadas fue el de la muestra Y-08, que a una dilución de 1:512 que es equivalente a una extracción de 0.26 mg por un mL de etanol al 70%. La muestra Y-08 corresponde al mes de Septiembre del Año 1, este mes corresponde al final del periodo de post-cosecha e inicios de pre-cosecha.

7.5. Perfil de fluorescencia

7.5.1. Análisis de matrices de emisión por MCR-ALS

Se obtuvieron los perfiles de fluorescencia de 21 de los extractos etanólicos de las muestras de polen recolectadas en la región centro del estado de Yucatán. El estudio mediante MCR arrojó la presencia de 3 tipos de componentes según su eigenvalue, por lo que el perfil de fluorescencia de las muestras se describe bien por un modelo de 3 componentes. Los componentes determinados se observan en la Figura 37.

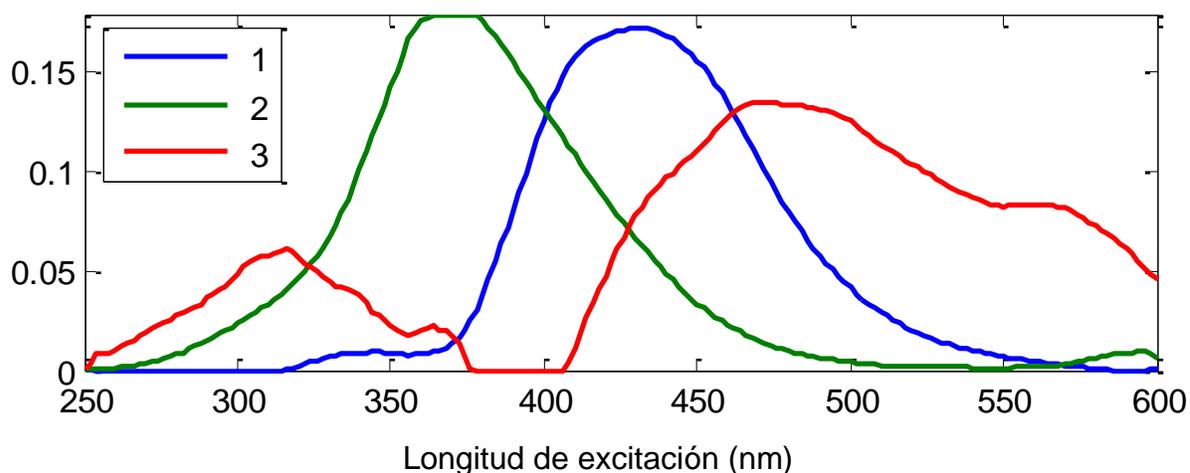


Figura 37. Espectro de emisión promedio de los tres componentes extraídos mediante MCR-ALS. Compuestos fenólicos (azul #1), triptófano (verde #2) y productos de la reacción de Maillard (rojo #3).

El primer componente en color azul presenta un máximo de emisión de 370 nm, y podría estar relacionado a los compuestos fenólicos presentes en los extractos de polen, los fenoles presentan máximo de emisión de 410 nm. El segundo de estos componentes en color verde presenta una longitud de onda máxima de emisión de 435 nm, y se puede relacionar particularmente con el triptófano que es con aminoácidos aromáticos, el triptófano presenta una longitud de onda de emisión máxima de 348 nm. El tercer componente en color rojo tiene máximo de emisión a 475 nm correspondería a productos de la reacción de Maillard, contenidos en un único componente, los que presentan un máximo de emisión de 467 nm (Sanhueza Rojas, 2016). El desplazamiento de las emisiones de puede deber a él disolvente en el que se diluyeron las muestras, aunque estas mediciones podrían ser los primeros reportes de esta técnica en extractos de pólenes de *Apis mellifera* L. en la región centro del estado de Yucatán.

Consecutivamente, se calcularon las concentraciones referentes de los tres fluoróforos en cada una de las muestras. Para ello se calcula el área bajo la curva de cada componente y se le asigna arbitrariamente el valor de la unidad a los

componentes de la primera muestra (Y-01). En la Figura 38 y Tabla 32 se encuentran los espectros de excitación de los tres componentes fluorescentes en las muestras por MCR para las 21 muestras y las concentraciones relativas respectivamente.

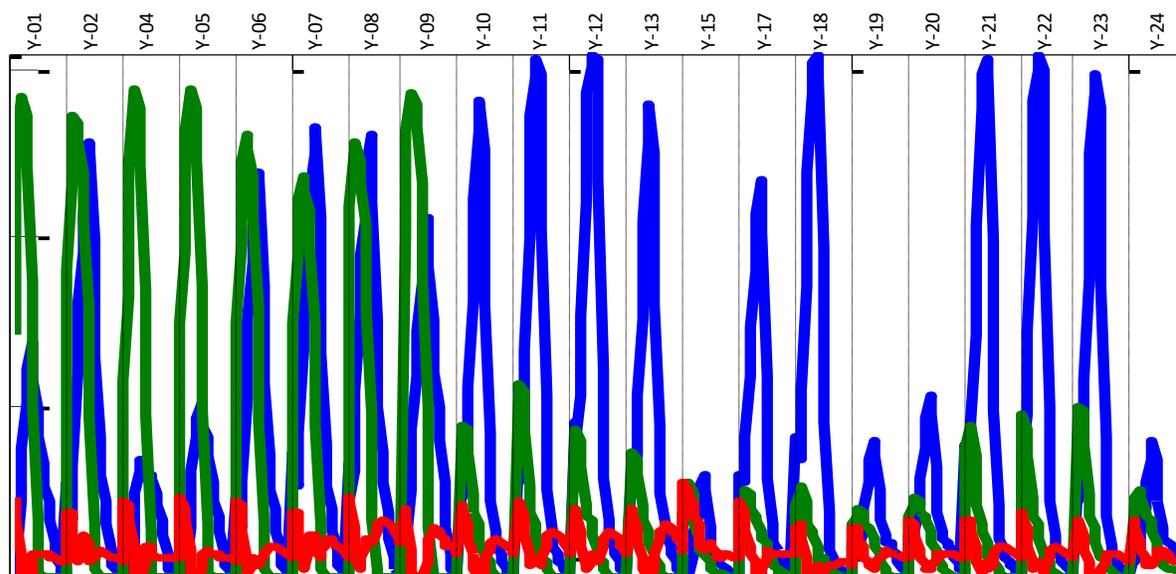


Figura 38. Espectros de excitación de los cuatro componentes extraídos mediante MCR para las muestras de extractos etanólicos de polen.

Primeramente se puede observar que el área bajo la curva corresponde con los resultados previos encontrados para los compuestos fenólicos, encontrándose áreas mayores para los periodos de pre cosecha e inicios de cosecha. En el caso de las áreas para los aminoácido aromáticos como el triptófano encontramos que existe una diferencia significativa entre el primer año de cosecha y el segundo, pero en este caso estamos hablando de un proceso de extracción, las proteínas tienden a precipitar en etanol, sin embargo las muestras previo a la extracción fueron molidas por lo que explica su presencia en los extractos y la variación de los aminoácidos aromáticos puede deberse a una diferencia en la composición de la proteína. Por último los datos pertenecientes a la reacción de Maillard son muy parecidos en todos los casos, por lo que nos indica que a pesar de que las primeras muestras tiene

mayor tiempo almacenadas todas presentan un grado de descomposición inferior a los compuestos de interés.

Tabla 32. Concentraciones relativas de los componentes extraídos en pólenes recolectados en la zona centro del estado de Yucatán.

Año	Mes	Clave	Compuestos Fenólicos	Aminoácidos Fluorescentes	Compuestos de Maillard
Año 1	Febrero	Y-01	20347	39519	5247
	Marzo	Y-02	38035	38735	6122
	Abril	Y-03			
	Mayo	Y-04	11936	38269	5571
	Junio	Y-05	15707	40027	5468
	Julio	Y-06	34923	36700	6055
	Agosto	Y-07	40799	34127	7400
	Septiembre	Y-08	40130	37509	9730
	Octubre	Y-09	35669	42357	6500
	Noviembre	Y-10	36352	10024	6813
	Diciembre	Y-11	42939	11762	7994
	Enero	Y-12	47169	9692	7329
Año 2	Febrero	Y-13	36598	8288	7828
	Marzo	Y-14			
	Abril	Y-15	6357	5738	8859
	Mayo	Y-16			
	Junio	Y-17	31243	7768	5618
	Julio	Y-18	44430	6385	3174
	Agosto	Y-19	11450	5823	5267
	Septiembre	Y-20	15146	6993	5172
	Octubre	Y-21	43101	9504	5666
	Noviembre	Y-22	43696	10247	5733
	Diciembre	Y-23	38257	10634	4437
	Enero	Y-24	11230	7614	4984

7.6. Determinación de origen floral

A partir del análisis de la actividad antibacteriana de los extractos contra cuatro patógenos, se determinó que la muestra que presentaba una mejor actividad contra 3 de los cuatro patógenos fue la Y-05, que corresponde al mes de Septiembre del año 1 de muestreo.

Se obtuvo que el 40.7% de la muestra correspondía a *Fuirena* sp. mientras que las tres especies se encontraban en porcentajes menores al 14% (*Brosimum alcastrum*, *Eragrostis prolifera* y *P. ichnanthoides*), de igual manera se encontró algunas especies de la familia compositae pero en menor conteo.

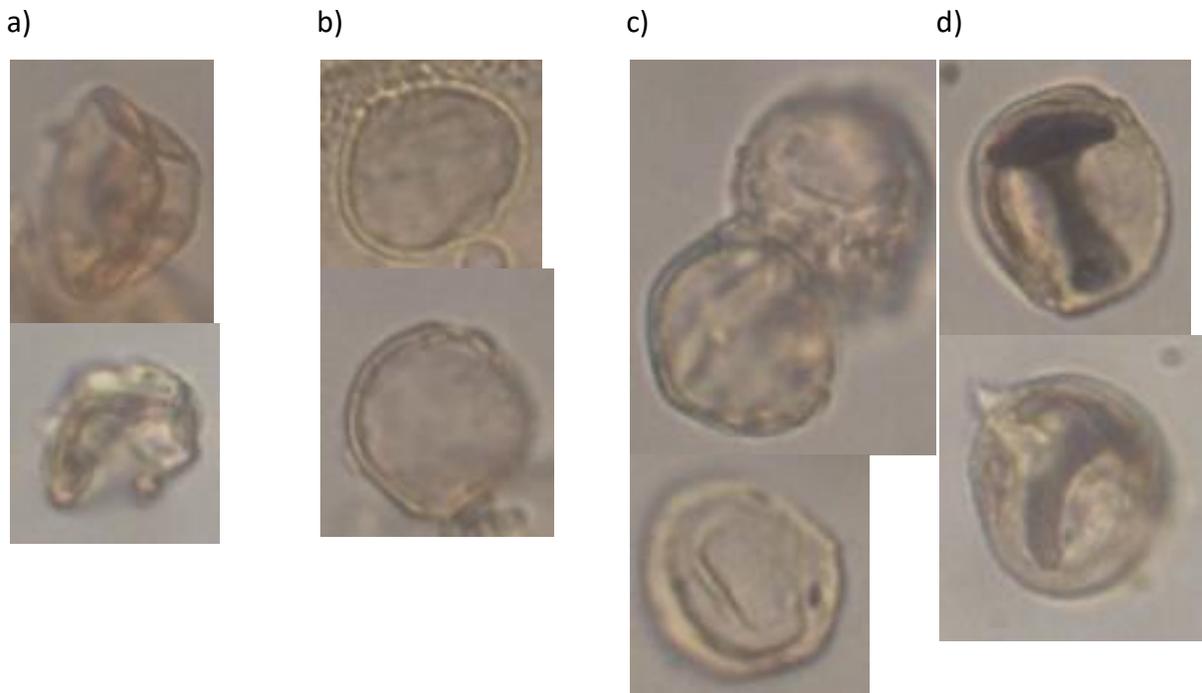


Figura 39. Análisis palinológico de muestra Y-05, las imágenes conservan su proporción. a) *Fuirena* sp., b) *Brosimum alcastrum*, c) *E. prolifera* y d) *P. ichnanthoides*

Pacheco Herrera (2009) reportó para la zona centro de Yucatán la especies presentes en el mes de septiembre mayormente son las hierbas y ausencia de enredaderas; sin embargo, la gráfica de hábitos de especies para el apiario concuerda con los análisis de compuestos fenólicos, siendo los meses de pre cosecha y cosecha (los que presentaron mayores contenidos) presentan los picos más altos de floraciones de hierbas (Figura 40).

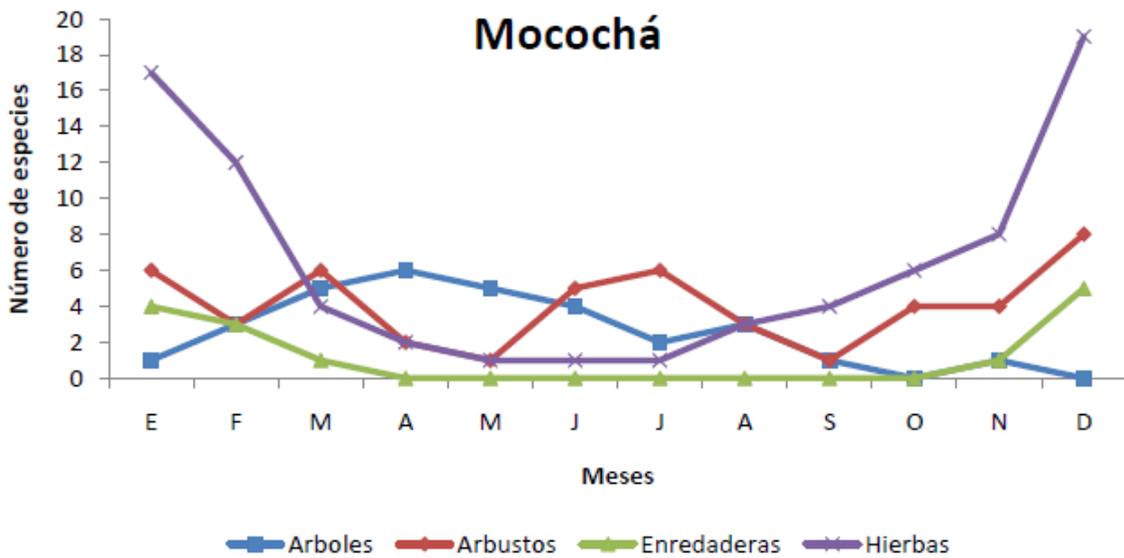


Figura 40. Hábito de las especies vegetales que florecen en el apiario experimental de la zona centro del estado de Yucatán (Pacheco Herrera, 2009).

Capítulo 8 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de valor nutricional en este trabajo se propone la revisión de los límites mencionados en la NMX-FF-094-SCFI-2008, debido a que se ha notado que existe muestras que presentan valores por encima de reportado en este y otros estudios.

Se encontró que el pH y la concentración de flavonoides se ven influenciados por las muestras de manera individual, como por el promedio del mes y el año de recolección. Mientras que para el parámetro de humedad, materia seca y flavonas, se observó que está influenciada por las diferentes muestras y el promedio del año en que es recolectada, pero no por el mes. En el caso de las cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fenoles se ven influenciada por las muestras de manera individual y por el promedio mes de recolección, pero no por el promedio del año.

Las muestras de polen recolectadas en el centro del estado de Yucatán presentan actividad inhibitoria tanto para bacterias gram-negativas como para gram-positivas. Se encontró actividad inhibitoria contra *Paenibacillus larvae* un patógeno importante que afecta a las abejas.

Los parámetros de color están correlacionados de la siguiente manera fenoles>flavonoides>flavonas y dihidroflavonas ya sea una correlación positiva o negativa, es decir, mientras la muestra sea más luminosa tenderá a haber menor contenido de polifenoles, mientras que en los otros parámetros el valor sea positivo existirá un mayor contenido; existiendo la posibilidad de poder determinar la importancia de los compuestos fenólicos en una muestra de polen de acuerdo al color que presentan.

Existe una mejor correlación entre el porcentaje de grasa cruda y actividad antibacteriana; pudiendo ser el contenido de grasas con compuestos como el

linolénico, mirístico y láurico que ha sido reportado con actividad antibacteriana y antifúngica los que aporten mayor actividad.

La determinación del estudio de la floración presente en la muestra es de importancia para identificar las posibles causas que contribuyan o aporten para la obtención de muestras con mayor actividad antibacteriana. La muestra que presentó la mayor actividad contra los microorganismos perteneció al mes de septiembre del primer año de recolecta encontrándose que la floración de hierbas podrían contribuir a la actividad antimicrobiana.

Capítulo 9 ANEXOS

ANEXO 1. Composición fisicoquímica del polen recolectado

AÑO	MES	CLAVE	% Humedad	% Materia Seca	% Cenizas	% Proteína Cruda	% Grasa Cruda	pH
Año 1	Febrero	Y-01	7.47 ± 1.77 ^{kl}	92.53 ± 1.77 ^{cd}	1.76 ± 0.17 ^k	17.93 ± 0.26 ^o	3.17 ± 0.32 ^{hijk}	5.07 ± 0.02 ^{de}
	Marzo	Y-02	7.52 ± 0.06 ^{kl}	92.48 ± 0.06 ^{cd}	2.02 ± 0.16 ^j	21.90 ± 0.52 ^{ijkl}	2.48 ± 0.20 ^{klm}	5.28 ± 0.02 ^a
	Abril	Y-03	8.11 ± 0.04 ^k	91.89 ± 0.04 ^d	2.23 ± 0.07 ^{ij}	24.86 ± 0.52 ^f	1.51 ± 0.02 ^m	4.77 ± 0.00 ^{gh}
	Mayo	Y-04	8.49 ± 0.05 ^k	91.51 ± 0.05 ^d	2.35 ± 0.00 ^{hi}	26.13 ± 0.01 ^{de}	4.04 ± 0.17 ^{efgh}	4.91 ± 0.06 ^f
	Junio	Y-05	6.27 ± 0.08 ^{mn}	93.73 ± 0.08 ^{ab}	2.47 ± 0.02 ^{gh}	22.11 ± 0.01 ^{ijk}	6.41 ± 0.05 ^b	4.49 ± 0.01 ^k
	Julio	Y-06	6.60 ± 0.06 ^{lm}	93.40 ± 0.06 ^{bc}	2.67 ± 0.02 ^{efg}	22.49 ± 0.00 ^{hij}	3.72 ± 0.48 ^{ghij}	4.51 ± 0.01 ^k
	Agosto	Y-07	5.51 ± 0.08 ⁿ	94.49 ± 0.08 ^a	2.68 ± 0.13 ^{efg}	23.03 ± 0.01 ^h	2.79 ± 0.00 ^{ijkl}	4.99 ± 0.05 ^{ef}
	Septiembre	Y-08	7.62 ± 0.01 ^{kl}	92.38 ± 0.01 ^{cd}	2.87 ± 0.00 ^{de}	25.80 ± 0.03 ^e	4.04 ± 0.04 ^{efgh}	4.63 ± 0.04 ^{ij}
	Octubre	Y-09	12.38 ± 0.35 ⁱ	87.62 ± 0.35 ^f	2.97 ± 0.04 ^{bcd}	30.03 ± 0.56 ^b	2.74 ± 0.09 ^{kl}	4.92 ± 0.09 ^f
	Noviembre	Y-10	10.92 ± 1.00 ^j	89.08 ± 1.00 ^e	2.61 ± 0.05 ^{fg}	26.79 ± 0.01 ^d	5.09 ± 0.04 ^{cde}	4.80 ± 0.00 ^g
	Diciembre	Y-11	11.27 ± 0.07 ^j	88.73 ± 0.07 ^e	3.15 ± 0.08 ^{ab}	26.29 ± 0.27 ^{de}	5.44 ± 0.07 ^{bcd}	5.09 ± 0.16 ^{cd}
	Año 2	Enero	Y-12	10.33 ± 0.04 ^j	89.67 ± 0.04 ^e	2.74 ± 0.06 ^{def}	21.54 ± 0.56 ^{kl}	3.84 ± 0.02 ^{fghi}
Febrero		Y-13	14.45 ± 0.81 ^{fgh}	85.55 ± 0.81 ^{ghi}	2.48 ± 0.00 ^{gh}	21.34 ± 0.29 ^{lm}	4.46 ± 0.06 ^{defg}	4.55 ± 0.02 ^{jk}
Marzo		Y-14	-	-	-	-	-	-
Abril		Y-15	19.38 ± 0.25 ^a	80.62 ± 0.25 ⁿ	3.27 ± 0.06 ^a	27.70 ± 0.59 ^c	3.11 ± 0.02 ^{hijk}	4.58 ± 0.04 ^{jk}
Mayo		Y-16	16.71 ± 0.13 ^{cd}	83.29 ± 0.13 ^{kl}	2.25 ± 0.34 ^{hi}	19.38 ± 0.30 ^{n̄}	5.61 ± 0.07 ^{bc}	4.04 ± 0.00 ^{n̄n̄}
Junio		Y-17	17.83 ± 0.48 ^b	82.17 ± 0.48 ^m	2.34 ± 0.07 ^{hi}	23.96 ± 0.28 ^g	4.38 ± 0.21 ^{defg}	4.21 ± 0.00 ^m
Julio		Y-18	16.24 ± 0.03 ^{de}	83.76 ± 0.03 ^{jk}	3.12 ± 0.16 ^{abc}	36.62 ± 0.31 ^a	1.81 ± 0.01 ^{km}	4.67 ± 0.01 ^{hi}
Agosto		Y-19	18.04 ± 0.32 ^b	81.96 ± 0.32 ^m	1.66 ± 0.00 ^k	20.57 ± 0.31 ⁿ	7.84 ± 0.01 ^a	4.13 ± 0.01 ^{mn}
Septiembre		Y-20	17.38 ± 0.01 ^{bc}	82.62 ± 0.01 ^{lm}	1.77 ± 0.13 ^k	20.81 ± 0.30 ^{mn}	7.52 ± 2.46 ^a	4.32 ± 0.02 ^l
Octubre		Y-21	13.72 ± 0.34 ⁿ	86.28 ± 0.34 ^g	2.92 ± 0.09 ^{cd}	27.52 ± 0.57 ^c	4.08 ± 0.01 ^{efgh}	4.61 ± 0.00 ^{ij}
Noviembre		Y-22	14.25 ± 0.35 ^{gh}	85.75 ± 0.35 ^{gh}	2.92 ± 0.10 ^{cd}	23.98 ± 0.02 ^g	3.67 ± 0.10 ^{ghij}	4.69 ± 0.01 ^{hi}
Diciembre		Y-23	15.20 ± 0.46 ^{efg}	84.80 ± 0.46 ^{hij}	2.94 ± 0.11 ^{bcd}	22.80 ± 0.29 ^{hi}	4.93 ± 0.13 ^{cdef}	5.16 ± 0.00 ^{bc}
Enero	Y-24	15.48 ± 0.19 ^{ef}	84.52 ± 0.19 ^{ij}	1.64 ± 0.03 ^k	19.06 ± 0.29 ^{n̄}	2.17 ± 0.07 ^{klm}	4.00 ± 0.00 ^{n̄}	

Medias con distintas literales en la misma columna indica diferencias significativas ($p < 0.05$). El contenido de Cenizas, Proteína Cruda y Grasa Cruda se expresan como % en base seca. Rayas en columnas o filas indican que no se contó con las muestras para el análisis.

ANEXO 2. Composición fenólica del polen recolectado

AÑO	MES	CLAVE	Fenoles	Flavonoides	Flavononas
Año 1	Febrero	Y-01	80.44 ± 4.65 ^j	630.20 ± 9.33 ^b	1306.77 ± 25.82 ^a
	Marzo	Y-02	140.88 ± 3.84 ^c	749.85 ± 18.64 ^a	1044.25 ± 39.61 ^c
	Abril	Y-03	-	-	-
	Mayo	Y-04	62.00 ± 0.51 ⁿ	460.39 ± 2.35 ^{fg}	690.31 ± 33.22 ^e
	Junio	Y-05	67.42 ± 2.04 ^{lm}	297.05 ± 8.47 ^{jk}	411.03 ± 11.76 ^h
	Julio	Y-06	121.15 ± 1.61 ^f	470.98 ± 5.71 ^f	1017.61 ± 15.50 ^c
	Agosto	Y-07	139.81 ± 4.76 ^{cd}	546.25 ± 5.34 ^e	909.61 ± 35.68 ^d
	Septiembre	Y-08	135.55 ± 1.26 ^e	556.14 ± 6.86 ^{de}	732.93 ± 12.30 ^e
	Octubre	Y-09	112.29 ± 0.14 ^g	454.33 ± 1.54 ^{fg}	1057.43 ± 34.44 ^c
	Noviembre	Y-10	123.64 ± 1.80 ^f	573.27 ± 15.44 ^d	722.69 ± 39.61 ^e
	Diciembre	Y-11	147.30 ± 0.91 ^b	727.06 ± 19.03 ^a	921.32 ± 17.22 ^d
	Enero	Y-12	150.45 ± 0.30 ^b	627.38 ± 31.05 ^b	1177.19 ± 34.45 ^b
Año 2	Febrero	Y-13	134.89 ± 3.95 ^e	635.01 ± 5.65 ^b	713.95 ± 30.04 ^e
	Marzo	Y-14	-	-	-
	Abril	Y-15	94.15 ± 2.11 ^h	414.76 ± 12.23 ^h	359.25 ± 14.37 ^h
	Mayo	Y-16	88.15 ± 1.19 ^j	316.31 ± 15.66 ^j	904.09 ± 61.99 ^d
	Junio	Y-17	71.19 ± 0.75 ^{kl}	441.87 ± 8.12 ^g	521.86 ± 14.37 ^{fg}
	Julio	Y-18	113.87 ± 1.57 ^g	367.75 ± 11.09 ⁱ	395.19 ± 18.28 ^h
	Agosto	Y-19	61.67 ± 2.72 ⁿ	366.47 ± 12.08 ^j	732.50 ± 3.92 ^e
	Septiembre	Y-20	66.43 ± 0.29 ^m	279.69 ± 9.94 ^k	737.89 ± 3.92 ^e
	Octubre	Y-21	136.09 ± 1.13 ^{de}	735.05 ± 3.29 ^a	552.24 ± 20.90 ^f
	Noviembre	Y-22	155.40 ± 0.69 ^a	627.47 ± 0.94 ^b	528.11 ± 28.73 ^{fg}
	Diciembre	Y-23	151.47 ± 0.59 ^{ab}	597.97 ± 29.02 ^c	485.81 ± 36.57 ^g
	Enero	Y-24	73.98 ± 1.75 ^k	411.18 ± 3.19 ^h	514.52 ± 3.92 ^{fg}

Medias con distintas literales en la misma columna indica diferencias significativas ($p < 0.05$). Los parámetros se expresan como mg equivalentes del estándar por 100 gramos de polen en base seca, siendo los estándares para fenoles = ácido gálico, para flavonoides = catequina y para flavononas = naringenina.

ANEXO 3. Determinación de color en los extractos etanólicos

AÑO	MES	CLAVE	Ángulo Hue (H)	Chroma (C)	Luminosidad (L)	a	b
Año 1	Febrero	Y-01	106.91±0.48 ^{de}	52.90±0.81 ^{kl}	91.58±0.24 ^{bcde}	-15.38±0.21 ^{jk}	50.61±0.90 ^{ij}
	Marzo	Y-02	102.21±0.38 ^{fg}	60.88±0.92 ^f	89.25±0.25 ^{ef}	-12.88±0.21 ⁱ	59.50±0.98 ^{ef}
	Abril	Y-03	-	-	-	-	-
	Mayo	Y-04	108.35±0.26 ^c	57.74±1.01 ^{gh}	92.79±0.15 ^{abc}	-18.18±0.17 ^l	54.81±1.03 ^g
	Junio	Y-05	107.41±0.42 ^d	51.36±0.84 ^l	92.18±0.31 ^{bcd}	-15.36±0.20 ^{jk}	49.01±0.90 ^j
	Julio	Y-06	98.76±0.68 ⁱ	68.36±4.07 ^d	86.57±1.78 ^{gh}	-10.38±0.24 ^g	63.93±2.15 ^d
	Agosto	Y-07	98.19±0.24 ⁱ	69.20±0.77 ^d	86.75±0.15 ^{gh}	-9.86±0.25 ^g	68.50±0.79 ^c
	Septiembre	Y-08	93.36±0.90 ^m	77.92±1.46 ^c	82.75±0.99 ^{ij}	-4.55±1.12 ^c	77.78±1.53 ^b
	Octubre	Y-09	97.96±0.24 ^{ij}	64.23±1.23 ^e	84.44±1.41 ^{hi}	-8.90±0.23 ^f	63.61±1.24 ^d
	Noviembre	Y-10	95.28±0.58 ^l	70.16±1.04 ^d	81.60±2.64 ^j	-6.46±0.78 ^d	69.86±1.00 ^c
	Diciembre	Y-11	91.43±0.20 ⁿ	80.61±2.58 ^{ab}	76.91±2.36 ^k	-2.02±0.32 ^a	80.52±2.57 ^a
	Enero	Y-12	92.08±0.02 ⁿ	82.93±0.65 ^a	81.40±0.12 ^j	-3.01±0.05 ^b	82.88±0.65 ^a
Año 2	Febrero	Y-13	93.34±0.28 ^m	78.08±1.00 ^{bc}	82.22±0.56 ^{ij}	-4.55±0.36 ^c	77.94±1.01 ^b
	Marzo	Y-14	-	-	-	-	-
	Abril	Y-15	109.58±0.62 ^b	53.15±2.02 ^{ijkl}	93.62±0.46 ^{ab}	-17.80±0.13 ^l	50.07±2.09 ^{ij}
	Mayo	Y-16	106.47±0.13 ^e	55.87±0.14 ^{hi}	91.07±0.31 ^{cde}	-15.84±0.08 ^k	53.58±0.17 ^{gh}
	Junio	Y-17	106.08±0.52 ^e	54.56±1.86 ^{ijk}	90.06±1.24 ^{def}	-15.10±0.23 ^j	52.43±1.92 ^{ghi}
	Julio	Y-18	114.07±0.72 ^a	37.65±1.26 ^m	94.96±0.36 ^à	-15.34±0.12 ^{jk}	34.38±1.34 ^k
	Agosto	Y-19	103.06±0.75 ^f	59.61±1.73 ^{fg}	89.90±0.78 ^{def}	-13.46±0.37 ⁱ	58.07±1.86 ^f
	Septiembre	Y-20	101.99±0.30 ^g	55.62±0.83 ^{hij}	87.88±0.29 ^{fg}	-11.55±0.13 ^h	54.40±0.87 ^{gh}
	Octubre	Y-21	97.22±0.13 ^j	69.69±0.83 ^d	85.80±0.08 ^{gh}	-8.76±0.10 ^f	69.13±0.84 ^c
	Noviembre	Y-22	96.30±0.32 ^k	70.25±1.51 ^d	82.83±2.57 ^{ij}	-7.71±0.55 ^e	69.83±1.46 ^c
	Diciembre	Y-23	101.03±0.32 ^h	61.98±1.70 ^{ef}	86.20±3.83 ^{gh}	-11.86±0.65 ^h	60.83±1.60 ^e
	Enero	Y-24	106.95±1.34 ^{de}	54.67±2.29 ^{ijk}	91.37±2.26 ^{bcde}	-15.90±0.52 ^k	52.29±2.56 ^{hi}

Medias con distintas literales en la misma columna indica diferencias significativas ($p < 0.05$). Rayas en columnas o filas indican que no se contó con las muestras para el análisis.

ANEXO 4. Difusión en Disco para *Escherichia coli* ATCC 25922

AÑO	MES	CLAVE	50	150	250	450	C-	C+
	Febrero	Y-01	-	-		-	-	-
	Marzo	Y-02	-	1.70±0.00		1.45±0.00	-	-
	Abril	Y-03						
	Mayo	Y-04	1.35±0.00	1.48±0.04		1.55±0.00	-	-
	Junio	Y-05	1.55±0.00	1.62±0.13	1.57±0.18		-	-
Año 1	Julio	Y-06	-	1.43±0.06		1.63±0.12	-	-
	Agosto	Y-07	-	1.50±0.14		1.48±0.18	-	-
	Septiembre	Y-08	-	1.60±0.14		1.58±0.08	-	-
	Octubre	Y-09	-	1.50±0.10		1.53±0.06	-	-
	Noviembre	Y-10	-	1.50±0.14		1.68±0.18	-	-
	Diciembre	Y-11	-	-		1.50±0.14	-	-
	Enero	Y-12	-	-		1.40±0.00	-	-
	Febrero	Y-13	-	1.48±0.11		1.57±0.12	-	-
	Marzo	Y-14						
	Abril	Y-15	-	1.40±0.00	1.50±0.00		-	-
	Mayo	Y-16	1.48±0.10	1.60±0.10	1.63±0.12		-	-
	Junio	Y-17	-	1.55±0.07		1.62±0.08	-	-
Año 2	Julio	Y-18	-	1.58±0.18	1.50±0.00		-	-
	Agosto	Y-19	1.48±0.10	1.67±0.06	1.68±0.13		-	-
	Septiembre	Y-20	1.50±0.00	1.53±0.12	1.60±0.00		-	-
	Octubre	Y-21	-	-		-	-	-
	Noviembre	Y-22	-	-		-	-	-
	Diciembre	Y-23	-	1.65±0.00		1.45±0.05	-	-
	Enero	Y-24	1.35±0.00	1.38±0.06	1.60±0.00		-	-

Rayas en columna o fila indican que no presentó actividad, sombreado en columna o fila indica que no se realizó el experimento a dicha concentración. Las concentraciones expresadas en los encabezados de cada columna están en µg. Los datos se expresan como cm para el diámetro de la inhibición, considerando junto el tamaño de disco de 13 mm; el control positivo fue Ampicilina a una concentración de 20µg.

ANEXO 5. Difusión en Disco para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

AÑO	MES	CLAVE	50	150	250	450	C-	C+
Año 1	Febrero	Y-01	-	1.57±0.13		2.10±0.95	-	2.35±0.26
	Marzo	Y-02	-	-		1.73±0.40	-	2.50±0.10
	Abril	Y-03						
	Mayo	Y-04	-	1.50±0.10		1.65±0.05	-	2.07±0.15
	Junio	Y-05	1.65±0.07	1.75±0.05	1.97±0.38		-	2.37±0.21
	Julio	Y-06	-	1.63±0.35		1.63±0.06	-	2.18±0.20
	Agosto	Y-07	-	1.50±0.10		1.77±0.06	-	2.13±0.29
	Septiembre	Y-08	-	1.58±0.03		1.83±0.12	-	2.60±0.35
	Octubre	Y-09	-	1.75±0.18		2.32±0.32	-	3.20±0.51
	Noviembre	Y-10	-	1.60±0.00		2.02±0.19	-	3.08±0.38
	Diciembre	Y-11	-	1.65±0.00		1.67±0.13	-	2.80±0.00
	Enero	Y-12	-	1.45±0.09		1.92±0.13	-	2.87±0.12
Año 2	Febrero	Y-13	-	1.45±0.09		1.78±0.08	-	2.82±0.08
	Marzo	Y-14						
	Abril	Y-15	1.40±0.00	1.52±0.08	1.63±0.06		-	2.88±0.03
	Mayo	Y-16	1.45±0.05	1.58±0.08	1.65±0.13		-	2.83±0.06
	Junio	Y-17	1.40±0.00	1.63±0.06		1.77±0.06	-	3.02±0.33
	Julio	Y-18	-	1.60±0.00	1.50±0.00		-	2.75±0.09
	Agosto	Y-19	-	1.62±0.13	1.70±0.00		-	2.87±0.06
	Septiembre	Y-20	1.50±0.00	1.62±0.29	1.58±0.08		-	2.83±0.06
	Octubre	Y-21	-	1.50±0.00		2.05±0.92	-	2.93±0.06
	Noviembre	Y-22	-	1.54±0.06		2.00±0.39	-	2.70±0.00
	Diciembre	Y-23	-	1.55±0.05		1.77±0.08	-	3.00±0.00
	Enero	Y-24	1.60±0.00	1.58±0.11	1.43±0.10		-	2.88±0.03

Rayas en columna o fila indican que no presentó actividad, sombreado en columna o fila indica que no se realizó el experimento a dicha concentración. Las concentraciones expresadas en los encabezados de cada columna están en µg. Los datos se expresan como cm para el diámetro de la inhibición, considerando junto el tamaño de disco de 13 mm; el control positivo fue Ampicilina a una concentración de 20µg.

ANEXO 6. Difusión en pozo para *P. larvae* JM 87 y *M. pluton* 49.3.

AÑO	MES	CLAVE	<i>Paenibacillus larvae</i> JM 87	<i>Melissococcus pluton</i> 49.3
Año 1	Febrero	Y-01	2.28 ± 0.11 ^{cdef}	1.93 ± 0.04 ^{ab}
	Marzo	Y-02	2.70 ± 0.42 ^{abcde}	1.83 ± 0.04 ^b
	Abril	Y-03		
	Mayo	Y-04	1.83 ± 0.18 ^{efgh}	1.70 ± 0.14 ^b
	Junio	Y-05	2.57 ± 0.43 ^{bcde}	2.45 ± 0.34 ^a
	Julio	Y-06	2.28 ± 0.23 ^{cdef}	1.85 ± 0.21 ^b
	Agosto	Y-07	2.60 ± 0.22 ^{bcde}	1.75 ± 0.21 ^b
	Septiembre	Y-08	2.40 ± 0.00 ^{bcdef}	1.83 ± 0.18 ^b
	Octubre	Y-09	1.85 ± 0.00 ^{efgh}	2.05 ± 0.35 ^{ab}
	Noviembre	Y-10	3.00 ± 0.14 ^{abc}	1.73 ± 0.04 ^b
	Diciembre	Y-11	2.50 ± 0.42 ^{bcde}	1.88 ± 0.11 ^{ab}
	Enero	Y-12	3.00 ± 0.28 ^{abc}	1.98 ± 0.04 ^{ab}
Año 2	Febrero	Y-13	2.63 ± 0.04 ^{abcde}	2.03 ± 0.46 ^{ab}
	Marzo	Y-14		
	Abril	Y-15	2.53 ± 0.32 ^{bcde}	1.70 ± 0.14 ^b
	Mayo	Y-16		
	Junio	Y-17	1.18 ± 0.32 ^{gh}	1.78 ± 0.04 ^b
	Julio	Y-18	1.00 ± 0.14 ^h	0.73 ± 1.03 ^c
	Agosto	Y-19	2.00 ± 0.57 ^{defg}	1.80 ± 0.00 ^b
	Septiembre	Y-20	1.60 ± 0.00 ^{fgh}	1.90 ± 0.00 ^{ab}
	Octubre	Y-21	2.83 ± 0.81 ^{abcd}	1.93 ± 0.11 ^{ab}
	Noviembre	Y-22	3.18 ± 0.60 ^{ab}	1.68 ± 0.11 ^b
	Diciembre	Y-23	3.48 ± 1.31 ^a	1.75 ± 0.07 ^b
	Enero	Y-24	3.10 ± 0.42 ^{abc}	1.65 ± 0.07 ^b

Medias con distintas literales en la misma columna indica diferencias significativas ($p < 0.05$). Sombreado en una fila indica que no se realizó el experimento. Los datos se expresan como cm para el diámetro de la inhibición, considerando junto el tamaño de pozo de 8 mm; el control negativo fue Etanol al 70%.

Capítulo 10 BIBLIOGRAFÍA

Alfaro Bates, R. G., González Acereto, J. Á., Viera Castro, F. A., Burgos Pérez, A. I., Martínez Hernández, E., y Ramírez Arriaga, E. (2010). *Caracterización palinológica de las mieles de la península de Yucatán*. Mérida, Yucatán, México: UADY:CONABIO.

Alfaro Bates, R. G., Ortiz Díaz, J. J., y González Acereto, J. A. (2010). Plantas melíferas: melisopalinología. En R. Durán García, y M. Méndez González, *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán* (págs. 346 - 349). Mérida: CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA.

Arana López, G. (2002). *Relación entre el análisis fisicoquímico y el análisis palinológico de las mieles de la península de Yucatán*. Mérida, Yucatán, México: Tesis individual.

Araneda Durán, X., Quezada Mardones, I., Martínez Gutiérrez, M., y Morales Ulloa, D. (2014). Total polyphenols in bee bread (*Apis mellifera* L.) from hives the Araucanía Region. *Idesia (Arica)* , 32(1), 107-111.

Arellano Rodríguez, J. A., Flores Guido, J. S., Tun Garrido, J., y Cruz Bojórquez, M. M. (1992). *Etnoflora Yucatanense. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo, y distribución de las especies vegetales de la península de Yucatán*.

Ávalos García, A., y Pérez-Urria Carril, E. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)* , 2(3), 119-145.

Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Alvarez, A., y Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentinos. *Ácta facrmacéutica bonaerense* , (3), 369-72.

Brat, G. S., Alter, B. P., y Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 53: 1370-1373.

Calvo Bruzos, S. C., Gómez Candela, C., Royo Bordonada, M. Á., y López Nomdedeu, C. (2012). *Nutrición, salud y alimentos funcionales*. Editorial UNED.

Capres, S. T., Begnini, R., de Alencar, S. M., y Masson, M. L. (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia* , 31(6), 1818-1825.

Carpes, S. T., Cabral, I. S., Rosalen, P. L., Alencar, S. M., y Masson, M. L. (2009). Caracterização do potencial antimicrobiano dos extratos de pólen apícola da região sul do Brasil. *Alimentos e Nutrição Araraquara* , 20(2), 271-277.

Carrillo Rodríguez, A., y Medina Medina, L. A. (2016). Principales enfermedades, parasitosis y plagas diagnosticadas en las colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*) de Yucatán: Situación actual. En *Memorias 23 Congreso Internacional de Actualización Apícola* (págs. 78-83).

Castro del Campo, N., Chaidez Quiroz, C., Rubio Carrasco, W., y Valdez Torres, J. B. (2004). Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. *Revista Cubana de Salud Pública* , 30(1), 0-0.

Chasquibol, N., Lengua, L., Delmás, I., Rivera, D., Bazán, D., Aguirre, R., y otros. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* , 6(2), 9-20.

Cordova Cordova, C. I. (2009). *Determinación Geográfica y Botánica de miel de abeja (Apis mellifera L.) del estado de Tabasco, México*. Tesis Maestría. Colegio de postgraduados.

Cortopassi Laurino, M., y Ramalho, M. (1988). Pollen harvest by Africanized *Apis mellifera* and *Trigona spinipes* in Sao Paulo. Botanical and ecological views. *Apidologie* , 19(1), 1-24.

de Rivas, C. S. (1976). Sobre la nomenclatura palinológica: La esporodermis. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles* , 33, 159-177.

Durán García, R. (1997). *Distribución de las especies endémicas de la Península de Yucatán*. México, D.F.: Centro de Investigación Científica de Yucatán AC. Unidad de Recursos Naturales.

Fernández Carnevali, G. C., Muñoz, J. T., de Stefano, R. D., Morillo, I. R., Itzá, L. C., Aguilar, S. H., y otros. (2012). La flora de la Península de Yucatán Mexicana. 250 años de conocimiento florístico. *CONABIO. Biodiversitas* , 101, 6-10.

Flores Guido, J. S. (2010). Flora melífera. En R. Durán García, y M. Méndez González, *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán*. Mérida: CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA.

Girón Vanderhuck, M. (1995). Análisi palinológico de miel y la carga de poeln colectada por *Apis mellifera* en el sureste de Antioquía, Colombia. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle* , 3(2), 35-54.

González Paramás, A. M., y Di Paola Naranjo, R. D. (2007). Caracterización del polen apícola, usos y aplicaciones. *notiABEJA* , 2-4.

Güemes Ricalde, F. J., Echazarreta González, C., y Villanueva G., R. (2004). *Condiciones de la apicultura en Yucatán y del mercado de sus productos (No. 2)*. Mérida, Yucatán, México: UADY.

Hurtado, M. P., de la Parte, M. A., y Brito, A. (2002). Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Rev. Soc. Venez. Microbiol* , 22(2), 112-118.

INEGI. (2012). *La apicultura en la Península de Yucatán: Censo Agropecuario 2007*. México: INEGI.

Lee, H. J., Seo, J. W., Lee, B. H., Chung, K. H., y Chi, D. Y. (2004). Syntheses and radical scavenging activities of resveratrol derivatives. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters* , 14(2), 463 - 466.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., y Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 51:7292-7295.

López Herrera, M. A., Vivas Rodríguez, J. A., Villanueva Gutiérrez, R., y Moguel Ordoñez, Y. B. (2009). Calidad nutritiva y origen floral del polen recolectado en la zona centro del estado de Yucatán, México. *Memoria del 55 Reunión anual de PCCMCA* .

Louveaux, J., Maurizio, A., y Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee world* , 59(4), 139-157.

Media Medina, L. A., y May Itzá, W. d. (2005). *Enfermedades de las abejas*. Mérida, Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.

Mesa Valencia, A. F. (2015). *Caracterización fisicoquímica y funcional de polen de abejas (Apis mellifera) como estrategia para generar valor agregado y parámetros de calidad al producto apícola*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Moguel Ordóñez, Y. M., Vivas Rodríguez, J. A., Martínez Ávalos, A. M., López Herrera, M. A., Mex Mex, L. A., y Alcalá Escamilla, K. I. (2010). *Tecnologías para obtener productos de la colmena*. Mérida, Yucatán, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste.

Molina Urbina, H. E., Zea Caloca, S. G., Leyra Hernández, J., y Flores Pérez, A. (2008). Evaluación de las propiedades bioactivas de extractos de polen de abejas en las zonas apícolas centro, frailesca, norte y altos del estado de Chiapas. *Memorias 15 Congreso Internacional de Actualización Apícola* , 17-22.

Narváez Torres, P. R. (2013). *Detección de polen convencional y genéticamente modificado de soya, Glycine max L., en la miel de abeja, Apis mellifera, de los estado de Campeche y Yucatán*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Nataro, J. P., y Kaper, J. P. (1998). Diarrheagenic escherichia coli. *Clinical microbiology reviews* , 11(1), 142-201.

NMX-FF-094-SCFI-2008. (7 de Agosto de 2008). Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-polen-(Pollinis). Especificaciones. Diario Oficial de la Federación.

Nogués, R. M. (1988). *La observación de los seres vivos: experiencias de biología en el ámbito de los niveles docentes medios. Volumen 5 de Pupitre de Freixe Series.* Universidad Autónoma de Barcelona.

Pacheco Herrera, D., Moguel Ordóñez, Y., Rivera Leyva, R., y Centeno Erguera, R. (2008). Identificación del origen floral de polen fresco recolectado en tres zonas del estado de Yucatán, México. *Memorias 15 Congreso Internacinal de Actualización Apícola* , 44-49.

Pacheco Herrera, D. J. (2009). *Identificación del origen botánico de polen producido en el estado de Yucatán.* Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal.

para la Conservación Vegetal, E. M. (2012). *Objetivos y Metas. 2008.* Obtenido de <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/EMCV.pdf>. Accesado, 10.

Pierce, B. A. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual* (3a ed.). Ed. Médica Panamericana.

Pierre, J. P., y Yves, L. C. (2007). *Apicultura. Conocimiento de la abeja. Manejo de la Colmena.* Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Popova, M., Silico, S., Kaftanoglu, O., y Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* (12), 221-228.

Programa nacional para el control de la abeja africana. (27 de Agosto de 2014). SAGARPA. (C. g. ganadería, Ed.) Recuperado el 29 de Julio de 2015, de Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación:

<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Manuales%20apcolas/Attachments/3/manbasic.pdf>

Programa nacional para el control de la abeja africana. (27 de Agosto de 2014). SAGARPA. Recuperado el 31 de Agosto de 2017, de Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Manuales%20apcolas/Attachments/5/manpato.pdf>

Quezada Euán, J. J. (2005). *Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México (Hymenoptera: Meliponini)*. Mérida. Yucatán, México: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México. 1ra. Edición digital*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Sánchez García, E. (2012). *Efectos de compuestos fitoquímicos sobre microorganismos de importancia en alimentos*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Sanhueza Rojas, O. H. (2016). *Caracterización química multiactorial de miel en relación a la infección de Nosema ceranae en abejas, actividad antimicrobiana y origen geográfico del producto*. Santiago, Chile: Tesis individual.

Schwalbe, R., Steele Moore, L., y C. Good, A. (2007). *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. Ilustrada.

Scott F., G. (2005). *Biología del desarrollo*. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.

SEDUMA. (2015). *Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2015, de <http://www.seduma.yucatan.gob.mx/flora/fichas-flora.php>

Villanueva G., R., Palacios Chávez, R., y Ludlow Wiechers, B. (1991). *Flora palinológica de la reserva de la biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México*. Centro de Investigaciones de Quintana Roo.

Villegas Durán, G., Cajero Avelar, S., Bolaños Medina, A., Miranda Sánchez, J. A., Pérez Lara, M. A., Ku y Yam, F., y otros. (1998). *Flora nectarífera y polinífera en la Península de Yucatán*. SAGAR.

Vit, P., y Santiago, B. (2008). Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de los andes venezolanos. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 58, 411 - 415.

Williams, M. H. (2002). *Nutrición: para la salud, la condición física y el deporte*. Editorial Paidotribo.

Woodward, S. L., y Quinn, J. A. (2011). *Encyclopedia of Invasive Species: From Africanized Honey Bees to Zebra Mussels (Volume One)*. Ilustrada.

Zapata Cauich, R. A. (2004). *Colmenas de maíz y miel y sus estrategias en el mundo global. Estrategias de desarrollo de los campesinos mayas del oriente de Yucatán*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo.