

# ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA JALEA REAL OBTENIDA DE COLONIAS ALIMENTADAS CON DOS DIFERENTES SUPLEMENTOS PROTEICOS

## ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ROYAL JELLY OBTAINED FROM HIVES NURTURED WITH TWO DIFFERENT PROTEIN SOURCES

Karla Itzél Alcalá Escamilla<sup>1</sup>, David Abram Betancur Ancona<sup>1</sup>, Juan José Acevedo Fernández<sup>2</sup>, Pablo Noé Nuñez Aragón<sup>1</sup>, Yolanda Beatriz Moguel Ordóñez<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Colonia Chuburná de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán. C.P. 97203.

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Leñeros S/N, Los Volcanes en Cuernavaca, Morelos. C.P. 62350.

<sup>3</sup> Campo Experimental Mocochoá, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 25, antigua carretera Mérida-Motul, Mocochoá, Yucatán. C.P. 97454.

### RESUMEN

La jalea real es un alimento elaborado por las abejas obreras que posee compuestos biológicos con capacidad antioxidante; sin embargo, se desconoce si la alimentación de las obreras puede afectar esta actividad. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la fuente proteica en dietas de las abejas sobre la actividad antioxidante de la jalea. La jalea real se produjo utilizando tres tipos de alimentación: Tratamiento 1, dieta elaborada con *Mucuna pruriens* y miel; Tratamiento 2, dieta elaborada con polen y miel; Tratamiento 3, grupo control con alimentación libre. La actividad antioxidante de la jalea se midió a través del porcentaje de captación de radicales libres con las pruebas DPPH y ABTS. Además, la actividad antioxidante se evaluó en un modelo *in vivo* utilizando ratas, a través de la cuantificación de superóxido dismutasa (SOD) y concentración de malondialdehído (MDA). Los resultados mostraron diferencias significativas en las pruebas DPPH, ABTS y MDA ( $P \leq 0.05$ ), siendo las jaleas producidas con las dietas (tratamiento 1 y 2) las que presentaron una mejor respuesta, lo que es un indicador de que el tipo de fuente proteica utilizada en la alimentación de las abejas incrementó la actividad antioxidante de la jalea real.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante, jalea real, radicales libres, *Mucuna pruriens*, polen.

### ABSTRACT

Royal Jelly is a food elaborated by worker bees, which possesses biological components with antioxidant capacity; however, it is unknown if the bees' nourishment may affect this activity. This work had as objective to evaluate the effect that a protein source in the bees diet has upon the antioxidant activity of royal jelly. Therefore, royal jelly was produced using three kinds of nourishment: Treatment 1: Diet formed from *Mucuna pruriens* and honey; Treatment 2: Diet formed from pollen and honey; Treatment 3: Control group with a free feeding. The jelly antioxidant activity was measured through the percentage of free radicals uptake with the DPPH and ABTS tests; besides, it was also assessed within an

*in vivo* rats utilizing, through the quantification of superoxide dismutase (SOD) and the concentration of malondialdehyde (MDA). The obtained results showed significant differences in the DPPH, ABTS and MDA tests ( $P < 0.05$ ), being the jellies produced using diets those which showed a better response, which indicates that the kind of protean supplement used within the bees' nourishment affects in a positive way the antioxidant activity of the royal jelly.

**Key words:** Antioxidant activity, royal jelly, free radicals, *Mucuna pruriens*, pollen.

### INTRODUCCIÓN

La jalea real (JR) es el alimento de las larvas de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) y de la reina durante su período de vida. Es una sustancia lechosa, secretada por las glándulas hipofaríngeas de las obreras (Xue *et al.*, 2017) y dentro de su composición contiene una gran cantidad de nutrientes (Sabatini *et al.*, 2009) como: proteínas, (Boselli *et al.*, 2003; Barnutiu *et al.*, 2011); componentes lipídicos como el ácido graso 10-hydroxy-trans-2-decanoico (10H2DA), el 10-hidroxidecanoico (10 HDA) (Sugiyama *et al.*, 2012), carbohidratos como la glucosa y fructuosa; minerales como el K, Ca, Fe y vitaminas liposolubles e hidrosolubles (Barnutiu *et al.*, 2011). Esta compleja composición permite que presente diferentes tipos de actividad biológica que se han relacionado con la presencia de péptidos, lípidos, ácidos fenólicos y flavonoides (Viuda-Martos *et al.*, 2017).

Para la producción de JR, es necesario que las abejas consuman proteína que obtienen de manera natural del polen (Zaytoon *et al.*, 1988; Safari *et al.*, 2010) o de alguna otra fuente proteica como levadura de cerveza, harina de trigo o leguminosas (Sereia y Arnaut de Toledo, 2013). El polen es el conjunto de gametos masculinos de las plantas que las abejas recolectan de las flores y transportan a su colmena; cuya composición fisicoquímica depende principalmente de la especie floral visitada. Se ha identificado que posee un alto contenido de proteína (14.8-27.2 %), aminoácidos esenciales (10.4 %), carbohidratos (64.42 - 81.84 %), lípidos (1.31 - 6.78 %)

\*Autor para correspondencia: Yolanda Moguel Ordóñez  
Correo electrónico: [moguel.yolanda@inifap.gob.mx](mailto:moguel.yolanda@inifap.gob.mx)

Recibido: 21 de junio de 2018

Aceptado: 13 de septiembre de 2018

y vitaminas (0.19 %) (Kostic *et al.*, 2015; Komosinska-Vassev *et al.*, 2015) que proporcionan los nutrientes necesarios para la producción de jalea real. Por otra parte, *Mucuna pruriens* (mucuna) es una leguminosa que ha sido probada con éxito en la alimentación de las abejas (De Araujo, 2000), la cual posee un elevado contenido de proteína (27.8 %) con valores significativos en aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales (Betancur-Ancona *et al.*, 2008).

Debido a sus composición, la JR es uno de los productos de las abejas con una gran variedad de componentes bioactivos (Ramadan y Al-Ghamdi, 2012), documentándose su actividad estimulante (Morita *et al.*, 2012), inmunomoduladora, hipocolesterolemia (Kashima *et al.*, 2014), antibacteriana (Fontana *et al.*, 2004), antitumoral (Nakaya *et al.*, 2007), hipoglucemiante y antioxidante (Pourmoradian *et al.*, 2014).

La actividad antioxidante es un mecanismo de defensa que poseen los organismos para defenderse contra el estrés oxidativo (EO). El EO es la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio existente entre los factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de defensas o por un incremento excesivo de la producción de radicales libres (RL), lo que ocasiona alteraciones en la relación estructura-función en cualquier órgano o sistema ocasionando daño celular (Venero, 2002). Por lo que, el sistema de defensa contra los RL son los antioxidantes, sustancias que al estar presente en baja concentración retarda o inhibe significativamente la oxidación de un sustrato oxidable (Kohen y Nyska, 2002).

En diversos trabajos de investigación se ha demostrado que la JR posee una alta actividad antioxidante (Nagai *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Balkanska *et al.*, 2013; Nabas, 2014); sin embargo, actualmente no se tiene evidencia de si el tipo de fuente proteica consumida por las abejas puede afectar la presencia y la actividad de los componentes biológicos que le otorgan la capacidad antioxidante. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antioxidante de jalea real obtenida de colonias de abejas alimentadas con diferentes suplementos proteicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de materias primas

**Harina de *Mucuna pruriens*.** Las semillas de *M. pruriens*, provenientes del estado de Yucatán, se limpiaron, fragmentaron y remojaron en agua potable (relación 1:2 grano:agua) a temperatura ambiente durante 24 h para reducir los factores antinutricios (Tresina y Mohan, 2013). Posteriormente las semillas se escurrieron y secaron en una estufa de aire forzado (Felisa, México) durante 24 h a una temperatura de 55°C. Las semillas se fragmentaron con un molino de martillos (Pulvex<sup>MR</sup> Mini 100, México) y la harina obtenida se introdujo en un molino de cuchillas (Ciclotec<sup>TM</sup> 1093, España) para obtener una harina fina (De Araujo, 2000). La harina se almacenó en frascos limpios y cerrados en un lugar fresco y seco hasta su uso.

**Polen.** El polen se cosechó en un apiario ubicado en la zona centro del estado de Yucatán (21° 11' LN; 89° 45' LO) utilizando trampas de piso. El material polínico se secó a 45°C, se limpió de manera manual y se molió con la ayuda de una licuadora comercial (Nutribullet<sup>®</sup> USA) para obtener un polvo fino el cual se conservó en bolsas de plástico con cierre hermético en refrigeración, hasta su uso (Moguel *et al.*, 2010).

**Miel de abeja.** La miel de abeja utilizada provino del mismo apiario donde se cosechó el polen, y se filtró con un colador de acero inoxidable grado alimenticio para eliminar impurezas, el cual poseía una malla de apertura de 3 x 3 mm por cuadro. La miel se almacenó en recipientes de acero inoxidable grado alimenticio, en un lugar fresco y seco hasta su uso (Sagarpa, 2010).

**Diets experimentales.** Se establecieron tres tratamientos con los que se produjeron diferentes tipos de JR (Tabla 1). Para el tratamiento 1 y 2 se formularon dos dietas isoprotéicas, balanceadas con 14% de proteína utilizando mucuna o polen como fuente proteica y miel como fuente energética. El tratamiento 3 fue la dieta control, no se les administró ninguna dieta, por lo cual, las abejas se alimentaron de forma natural con lo que obtuvieron en el campo.

**Tabla 1.** Tratamientos usados para la producción de jalea real con diferentes fuentes proteicas.

**Table 1.** Treatments used for production of royal jelly with different protean sources.

Tratamiento	Dieta	Clave JR
Tratamiento 1	<i>M. pruriens</i> + miel	JRM
Tratamiento 2	Polen + miel	JRP
Tratamiento 3	Alimentación libre en campo	JRC

**Producción de Jalea Real.** La producción de JR se realizó con el método de transferencia de larvas (Hu *et al.*, 2017). Para lo cual se trabajó con colmenas tipo Langstroth y cada una estaba formada con una sola cámara de cría que contenían en su interior nueve bastidores para cría y alimento, y un bastidor porta copa celdas. Por cada tratamiento se utilizaron tres colmenas y la extracción de la jalea se realizó 72 h post traslarve, la cual se almacenó en frascos limpios color ámbar a una temperatura de -4°C.

### Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

En las pruebas de actividad antioxidante *in vitro*, se preparó soluciones de JR de acuerdo a la metodología reportada por Pavel *et al.* (2014). Previamente la jalea real (1 g) se disolvió en 10 mL de agua destilada y se sometió a un proceso de extracción asistida por ultrasonido (Branson 1510; 1.9 L; 40 kHz, USA) durante 15 min. Posteriormente, la solución se centrifugó a 1350 x g durante 10 min (Heraeus Fresco<sup>TM</sup> 17, Thermo Scientific; USA). La muestra se decantó y el sobrenadante se utilizó para las pruebas de captación de radicales libres DPPH y ABTS.

**Captación de radicales libres DPPH.** La actividad antiradical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) se evaluó con la metodología propuesta por Nagai *et al.*, (2006), modificada por Liu *et*

*al.*, (2008). Se tomaron 0.3 mL de la solución de JR y se mezcló vigorosamente con 0.3 mL de solución de radical de DPPH (1.0 mM) y 2.4 mL de etanol (99%), se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, en la oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia con un espectrofotómetro UV Vis Evolution™ 300 (Thermo Fisher Scientific, USA), a una longitud de onda de 517 nm, utilizando ácido ascórbico 1 mM como control positivo. El porcentaje de captación de radicales libres se calculó con la siguiente fórmula:

$$(1) \quad \% \text{ Captación de radicales} = \frac{1-(AM)}{(AC)} \times 100$$

AC = Absorbancia del control a 517 nm

AM = Absorbancia de la muestra a 517 nm

**Captación de radicales libres ABTS.** La actividad antiradical ABTS (2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) se realizó de acuerdo con la metodología usada por Pukalskas *et al.* (2002). Para generar el radical ABTS, se hizo reaccionar una solución ABTS 2 mM con persulfato de potasio (70 mM) y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 16 h, bajo oscuridad. Posteriormente, la solución radical ABTS se diluyó con buffer salino de fosfatos (0.01 M) y se midió su absorbancia con un espectrofotómetro UV Vis Evolution™ 300 (Thermo Fisher Scientific, USA), a una longitud de onda de 734 nm hasta que alcanzó un valor de  $0.8 \pm 0.030$ . Una curva estándar de Trolox que fue de 0.5 a 3.5 mM se utilizó para calcular el porcentaje de inhibición de las muestras. La medición de las jaleas se efectuó mezclando 10  $\mu$ L de la JR y 990  $\mu$ L de radical ABTS (solución 1:10) y se determinó la absorbancia a 734 nm después de 6 min. El porcentaje de inhibición de los estándares (%IE), porcentaje de inhibición de la muestra (%IM) y la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$(2) \quad \%IE = \frac{(AB-AT)}{AB} \times 100$$

$$(3) \quad \%IM = \frac{(AB-AM)}{AB} \times 100$$

$$(4) \quad TEAC = \frac{(\%IM) \cdot b}{m}$$

AB = Absorbancia del ABTS diluido a tiempo cero

AT = Absorbancia del Trolox después de 6 min

AM = Absorbancia de la muestra después de 6 min

m = Pendiente de la curva estándar de Trolox

b = Intercepto de la curva estándar de Trolox

#### Determinación de la actividad antioxidante *in vivo*

Para las pruebas de la actividad antioxidante *in vivo* se utilizaron ratas Wistar manejadas de acuerdo a los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999. El trabajo se realizó en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y previamente fue aprobado por la

Comisión para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CCUAL) de la misma institución.

#### Modelo biológico

Un total de 35 ratas Wistar de 2 meses de edad con un peso promedio de 220 g, se mantuvieron en una habitación aislada con ambiente controlado (temperatura de 22°C y ciclos de 12 h de luz/oscuridad -6 bombillas de 20 watts-). Se utilizó un modelo biológico de síndrome metabólico (SM) con un proceso de inducción de 8 semanas en 30 ratas; el modelo consistió en ofrecer a las ratas agua con sacarosa al 20% *ad libitum* y su dieta base de 500 g de pellets Laboratory Rodent diet 5001 a la semana (Guzmán-Gerónimo *et al.*, 2017). El peso de las ratas se registró al concluir el tiempo de inducción y éstas, se dividieron de manera aleatoria en siete grupos de cinco animales. Las ratas que formaron parte del grupo control fueron las que no se sometieron al proceso de inducción de SM y solo fueron alimentadas con su dieta base de pellets y agua potable a libre demanda.

Para determinar si un incremento en el consumo de jalea ofrece alguna mejora en la respuesta antioxidante, se usaron dos diferentes dosis de JR (15 y 45 mg/kg/día). Los tratamientos utilizados se describen en la Tabla 2. Los tratamientos se ofrecieron durante un periodo de cuatro semanas, durante el cual los animales siguieron recibiendo la misma dieta del periodo de inducción. Las dosis de JR se calculó de acuerdo al peso de las ratas, las cuales se pesaron semanalmente. Para administrar la JR, ésta se diluyó en 1 mL de agua destilada y con la ayuda de una cánula de acero inoxidable de un diámetro de 2 mm se administró directamente al estómago de cada rata. Al grupo control se le dio 1 mL de agua destilada.

**Tabla 2.** Tratamientos, dosis y claves de identificación utilizados en el modelo *in vivo* para la evaluación de la actividad antioxidante.

**Table 2.** Treatments, dosage and identification key used in the *in vivo* model for evaluation of the antioxidant activity.

Tratamiento	Dosis mg/kg	No. Individuos	Clave
JRM 1	15	5	JRM15
JRM 2	45	5	JRM45
JRP 1	15	5	JRP15
JRP 2	45	5	JRP45
JRC 1	15	5	JRC15
JRC 2	45	5	JRC45
Control	-	5	Control

Transcurridas cuatro semanas las ratas fueron sacrificadas con pentobarbital sódico vía intraperitoneal y por punción intra cardíaca se obtuvieron 10 mL de sangre; 5 mL se colocaron en un tubo vacutainer con EDTA para obtener plasma y otros 5 mL se colocaron en un tubo vacutainer sin anticoagulante para obtener suero. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1,600 x g durante 10 min y el suero y plasma obtenidos se colocaron en microtubos de 1.5 mL identificados con el número del animal y el tratamiento que recibieron. Las muestras se guardaron en un ultracongelador de -70°C hasta su análisis.

**Determinación de la actividad de superóxido dismutasa**

**(SOD).** Se utilizó el kit OxiSelect™ Superoxide Dismutase Activity Assay, Número de catálogo STA-34°, de Cell Biolabs, INC. El fundamento de la técnica consistió en usar el sistema xantina oxidasa para generar aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y con la presencia de SOD la concentración del anión O<sub>2</sub><sup>-</sup> disminuye. La actividad del SOD se determinó con la inhibición o reducción de la señal colorimétrica. Una curva estándar de SOD se realizó para calcular el porcentaje de inhibición. Para esta prueba se utilizó el suero sanguíneo de las ratas. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Sinergy 2 (Biotek, USA), a una absorbancia de 490 nm con ayuda del programa Gen 5 (Product Manual, Oxiselect™ Superoxide Dismutase Activity Assay, 2017). Para calcular la actividad de SOD (% de inhibición) se utilizó la siguiente fórmula:

$$(5) \text{ Actividad SOD} = \frac{(\text{OD blanco} - \text{OD muestra}) \times 100}{(\text{OD blanco})}$$

OD blanco: Absorbancia del blanco a 490 nm

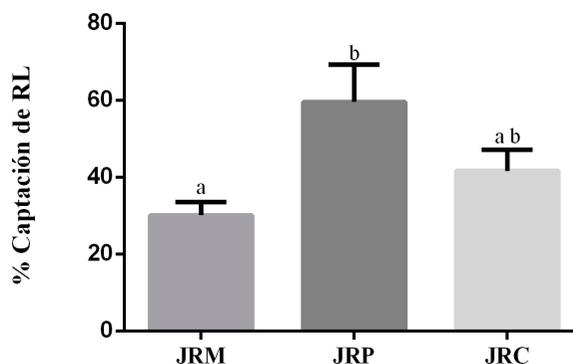
OD muestra: Absorbancia de la muestra a 490 nm

**Determinación de peroxidación lipídica.** Se determinó con el kit OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation) número de catálogo STA-330 y STA-330-5 de Cell Biolabs, INC. La prueba se realizó con plasma sanguíneo y consistió en la medición del malondialdehído (MDA) que es un compuesto formado por las células al momento del daño ocasionado por la peroxidación lipídica. Se realizó una curva estándar de MDA para poder calcular la concentración de MDA en  $\mu\text{M}$  promedio en cada una de las muestras. Con el fin de prevenir la interferencia de la hemoglobina y de sus derivados se realizó un proceso de extracción con n-Butanol, el cual consistió en centrifugar las muestras previo a su lectura a  $1,300 \times g$  durante 15 min. Se transfirieron 300  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un microtubo de 1.5 mL, se homogenizó con 300  $\mu\text{L}$  de n-Butanol, y se centrifugó a  $10,000 \times g$  durante 5 min. La absorbancia se midió a 532 nm en un espectrofotómetro Sinergy 2 (Biotek, USA), con ayuda del programa Gen 5 (Product Manual, Oxiselect™ TBARS Assay Kit, (MDA Quantitation), 2017).

**Análisis estadístico.** Los datos fueron analizaros con un análisis de varianza bajo un modelo aleatorio simple y una comparación de medias por el método de Tukey con un nivel de probabilidad de  $P \leq 0.05$ , para determinar si existen diferencias entre los tratamientos. Los análisis se realizaron con ayuda del programa GraphPad Prism 7.03°.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Captación de radicales libres DPPH.** En la figura 1 se muestran las diferencias del porcentaje de captación de radicales libres entre los tipos de jalea real. Los resultados indican que la actividad antioxidante fue diferente estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el tratamiento empleado en la alimentación de las abejas. La JR con mayor porcentaje de captación de RL fue la producida por las abejas que consu-



**Figura 1.** Porcentaje de captación de radicales libres por cada uno de los tipos de jalea. <sup>a,b</sup> Literales diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).

**Figure 1.** Free radicals uptake percentage for each of the kinds of jelly. <sup>a,b</sup> Different literals indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

mieron la proteína de polen (JRP) con un valor promedio de  $59.56 \pm 19.32$ , seguido de la JRC con un porcentaje de  $41.42 \pm 11.03$  y por último la JRM con un valor promedio de  $30.10 \pm 6.91$ . Al ser producidas las jaleas en las mismas condiciones ambientales, de manejo y en el mismo periodo de tiempo, las diferencias presentadas entre las jaleas probablemente se deban a que el tipo de proteína consumida por las abejas está influyendo directamente la presencia de componentes bioactivos de tipo antioxidante en la composición de las jaleas obtenidas. La presencia de fracciones peptídicas con alta actividad antioxidante ha sido reportada en la JR sobresaliendo los dipéptidos Tir-Tir, Lis-Tir y Arg-Tir; es probable que el origen de la proteína, con la que se alimenta a las colonias de abejas influya en incrementar la concentración de estos dipéptidos (Guo *et al.*, 2009).

Porcentajes de inhibición similares fueron encontrados por diversos autores como Pavel *et al.* (2014) quienes reportan valores de  $37.23 \% \pm 7.59$  y de  $35.94 \% \pm 4.11$  en jalea real fresca; y Liu *et al.* (2008), quienes obtuvieron porcentajes de inhibición que oscilan entre 43 – 62.8. Sin embargo, Kaneko (2015) obtuvo valores de 87.9 % en JR liofilizada calentada y 75 % con JR liofilizada sin calentar. Otros trabajos realizados con hidrolizados enzimáticos de JR, muestran porcentajes de captación de un 96.4 % (hidrolizado con papaína), 97.8 % (hidrolizado con tripsina) y de 99.6 % (hidrolizado con pepsina). El alto porcentaje de inhibición encontrado en JR liofilizada e hidrolizada se debe a que estos procedimientos realizados a la JR producen una mayor concentración de componentes bioactivos como pueden ser fracciones peptídicas con actividad antioxidantes (Nagai e Inoue, 2004; Nagai *et al.*, 2006).

**Captación de radicales libres ABTS.** En la Tabla 3 se encuentran los valores de %IM y TEAC de cada una de las muestras de JR. Los resultados muestran diferencias entre los tipos de JR ( $P \leq 0.05$ ) siendo la JRM la que presentó mejores resultados en la prueba de ABTS, seguida de la JRP. La diferencia entre los tipos de jalea y su respuesta se puede deber a la cantidad y a la naturaleza de los compuestos antioxidantes que conforman cada una de las jaleas.

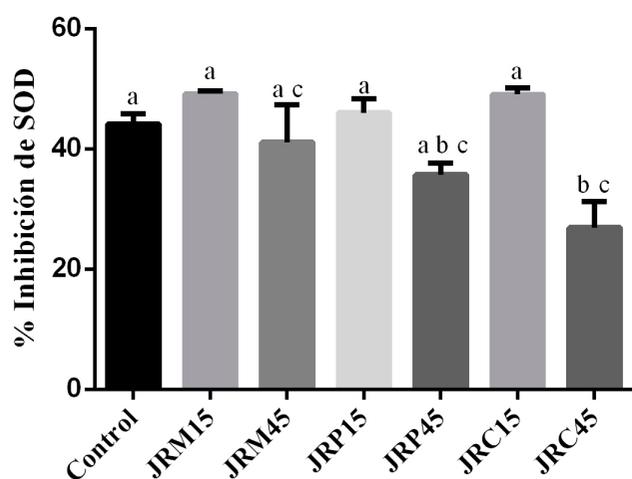
**Tabla 3.** Valor de %IM a los 6 minutos y de TEAC calculado para cada una de las muestras de jalea real.**Table 3.** %IM value at 6 minutes and TEAC value calculated for each of the royal jelly samples.

Muestra	%IM	TEAC
JRM	31.24 ± 0.65 <sup>a</sup>	0.920 ± 0.02 <sup>a</sup>
JRP	26.51 ± 1.42 <sup>b</sup>	0.742 ± 0.05 <sup>b</sup>
JRC	22.17 ± 1.71 <sup>c</sup>	0.578 ± 0.06 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Literales diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).<sup>a-c</sup> Different literals indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

Las pruebas antioxidantes DPPH y ABTS se basan en la capacidad de una sustancia para atrapar radicales libres y difieren entre ellas en el tipo de antioxidante que son capaces de cuantificar. La prueba de ABTS tiene la capacidad de medir antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, lo que permite que identifique compuestos antioxidantes diferentes a la prueba DPPH. Alcalá *et al.* (2017) reportaron diferentes contenidos de lípidos en JR obtenidas con los mismos suplementos proteicos utilizados en este estudio, encontrando que la JRM presentó el mayor contenido de lípidos, lo cual, puede aportar mayor contenido de componentes bioactivos que dieron como resultado una mayor capacidad antioxidante de la JRM comparada con la JRP y JRC.

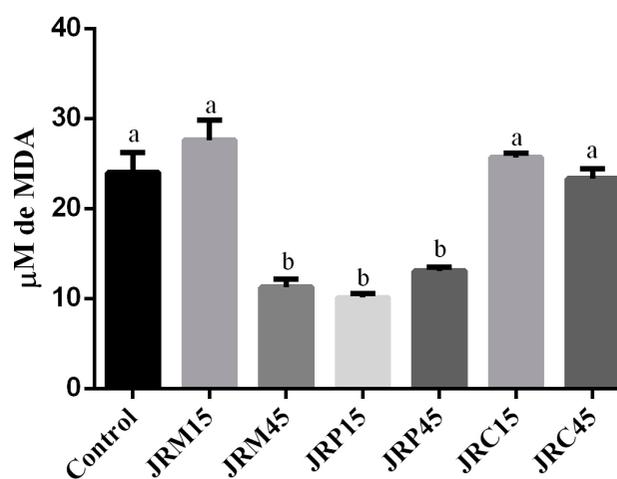
**Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD).** Los resultados muestran diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0.05$ ); sin embargo, con excepción de JRC45, todos los tratamientos fueron similares al grupo Control (Figura 2). Al presentar la misma actividad de SOD en la mayoría de los tratamientos, se observa que el consumo de JR sin importar la dosis no beneficia la actividad de la SOD en los organismos en las condiciones evaluadas ( $P \geq 0.05$ ). Resultados similares fueron obtenidos por Silici *et al.* (2011), quienes trabajaron con ratas Wistar y encontraron que la administración oral de JR a una dosis de 50 y 100 mg/

**Figura 2.** Actividad inhibitoria de SOD (porcentaje) de cada uno de los tratamientos. <sup>a-c</sup> Literales diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).**Figure 2.** Inhibitory SOD activity (percentage) for each of the treatments. <sup>a-c</sup> Different literals indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

kg durante 10 días no afectó la concentración de SOD en sangre; sin embargo, la dosis de 100 mg/kg de JR ofrecida durante 10 días previos a la administración de una dosis única de cisplatino (7 mg/kg), ayudó a mantener la misma concentración de SOD en sangre que el grupo control que solo había recibido agua destilada. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo y a los obtenidos por Silici *et al.* (2011), el consumo de la JR no influyó de manera directa en el incremento o decremento de la enzima SOD en los individuos evaluados, probablemente debido a que es una enzima que se encuentra de manera normal en los organismos y necesita de cofactores como el Cu, Zn o Fe (Castillo y Riverón 2014) y las concentraciones de estos minerales que pueda aportar la JR no son significativas como para influir en su concentración.

**Determinación de peroxidación lipídica.** Los resultados muestran diferencias estadísticas significativas en la concentración de MDA entre cada tratamiento ( $P \leq 0.05$ ). Los tratamientos JRM45, JRP15, JRP45 presentaron una menor concentración en comparación con los grupos Control, JRM15, JRC15 y JRC45 (Figura 3) ( $P \leq 0.05$ ). Los grupos que recibieron JRP sin importar la dosis y JRM a una dosis alta, fueron los que presentaron menor concentración de MDA, lo que es un indicador de una menor peroxidación lipídica y por lo tanto un menor daño celular y mejor respuesta antioxidante (Rani *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos fueron similares a lo reportado por Nejati *et al.* (2016), quienes administraron a ratones NMRI oximetazona (5 mg/kg) con JR (100 mg/kg) durante 30 días; encontraron que la concentración de MDA en el tejido hepático era menor en comparación con los ratones que solo recibieron oximetazona (5 mg/kg); por lo que concluyen que el consumo de JR proporcionó un efecto protector parcial en el hígado disminuyendo el daño también a nivel histológico. Silici *et al.* (2011), en su trabajo con ratas Wistar y cisplatino

**Figura 3.** Concentración de MDA (en  $\mu\text{M}$ ) de cada uno de los tratamientos. a-b Literales diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).**Figure 3.** MDA concentration (in  $\mu\text{M}$ ) for each of the treatments. a-b Different literals indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

reportaron un incremento significativo en la concentración de MDA en el riñón; sin embargo, en los grupos a los que les ofrecieron JR a dosis de 50 y 100 mg/kg por 10 días previo al tratamiento con cisplatino, la concentración de MDA fue similar a las del grupo control que solo recibía agua destilada y a los grupos que solo recibieron JR.

El incremento de MDA se encuentra asociado a la presencia de daño en las membranas celulares; el MDA es el metabolito final de la peroxidación lipídica que ocurre a causa de la presencia de los radicales libres. La menor concentración de MDA observada en los grupos que consumieron JRP se puede deber a la composición natural de la jalea. Además, los organismos poseen una amplia variedad de antioxidantes y mecanismos de defensa contra los radicales libres, dentro de estos antioxidantes se puede mencionar además de fracciones peptídicas y ácidos grasos algunas vitaminas, como la A, C, y E. Probablemente la JRP posee una concentración mayor de vitaminas con actividad antioxidante y en conjunto con los otros compuestos protege de mejor manera a las células disminuyendo considerablemente la peroxidación lipídica.

## CONCLUSIONES

Diversos estudios han demostrado que la jalea real posee compuestos con actividad antioxidante; sin embargo, se desconocía si un cambio en la alimentación de las abejas obreras afecta la presencia de esta actividad. Las pruebas antioxidantes realizadas en este trabajo sirven para medir las diferentes formas que tiene los organismos para contrarrestar los efectos del EO. Las pruebas de DPPH y ABTS midieron la capacidad de la JR para la captación de RL. De acuerdo a los resultados obtenidos, la JR proveniente de las dietas en donde se utilizó mucuna y polen como fuente proteica, ofrecen una mayor captación de RL, en comparación con la JRC. Estos resultados indican que la fuente proteica consumida por las abejas en su dieta, influye favorablemente al incrementar la actividad antioxidante presente en la JR. En las pruebas *in vivo* se observó que el consumo de JR por un periodo de cuatro semanas no otorgó ningún beneficio especial respecto a la concentración de SOD en el suero sanguíneo de las ratas; no obstante, aunque su consumo no incrementó la enzima, tampoco la disminuyó, por lo que se puede concluir que el consumo de JR no afecta la actividad de la SOD. Sin embargo, el consumo de la JRP si otorgó beneficios con respecto a concentraciones menores de MDA en el plasma sanguíneo. Los resultados permiten concluir que el uso de una fuente proteica de calidad en la alimentación de las abejas beneficia directamente la calidad de la jalea al mejorar la respuesta antioxidante.

## REFERENCIAS

Alcala, E.K.I., Moguel, O.Y.B. y Betancur, A.D.A. 2017. "Análisis fisicoquímico de la jalea real producida por abejas alimentadas con diferentes fuentes de proteína." En Basurto G.R. (ed.) 53 *Reunion Nacional de Investigación Pecuaria*. 15, 16 y 17 de noviembre de 2017, Acapulco, Guerrero, México: 203-204.

- Barnutiu, L.I., Marghitas L.A., Dezmiorean D.S., Mihai C.M. y Bobis, O. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of royal jelly – Review. *Animal Science and biotechnologies*. 44 (2): 67 – 72.
- Balkanska, R., Zhelyazkova, I., Ignatova, M. y Kashamov, B. 2013. Effect of supplementary honey and artificial sugar feeding of bees on the composition of royal jelly. *Agricultural science and technology*. 5(3): 335-338.
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., Delgado-Herrera, A., Pérez-Flores, V., Castellanos, R.A. y Chel-Guerrero, L. 2008. Some physicochemical and antinutritional properties of raw flours and protein isolates from *Mucuna pruriens* (velvet bean) and *Canavalia ensiformis* (Jack bean). *International journal of Food Science and technology*. 43: 816-823.
- Boselli, E., Caboni, M.F., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. y Lercker, G. 2003. Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage. *Apidologie*. 34: 129-137.
- Castillo, C.Y. y Riverón, F.G. 2014. Superóxido dismutasa citosólica y enfermedades genéticas. *Rev. Cubana Genet Comunit*, 8(1): 5-11.
- De Araujo, F.J.C. 2000. Producción de jalea real con abejas *Apis mellifera* alimentadas artificialmente, en época de escasez en Yucatán, México. Tesis presentada en opción al título de Maestro en Ciencias en Apicultura Tropical. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Fontana, R., Mendes, M.A., Monson de Souza, B., Konno, K., Marcondes, C.L.M. Malaspina, O. y Palma, M.S. 2004. Jelleines; a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*. 25(6): 919-928.
- Guo, H., Kouzuma, Y. y Yonekura, M. 2009. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry*. 113: 238-245.
- Guzmán-Gerónimo R.I., Alarcón-Zavaleta T.A., Oliart-Ros R.M., Meza-Alvarado J.E., Herrera-Meza S. y Chávez-Servia J.L. 2017. Blue Maize Extract Improves Blood Pressure, Lipid Profiles and Adipose Tissue in High-Sucrose Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *J Med Food* 20 (2): 110-115.
- Hu, F.-L., Bilikova, K., Casabianca, H., Daniele, G., Espindola, F.S., Feng, M., Guan, C., Han, B., Krakova, T.K., Li, J.K., Li, L., Li, X.A., Simúth, J., Wu, L.M., Wu, Y.Q., Xue, X.F., Xue, Y.B., Yamaguchi, K., Zeng, Z.J., Zheng, H.Q. y Zhou, J.H. 2017. Standard methods for *Apis mellifera* royal jelly research. *Journal of Apicultural Research*. 8839: 1–68.
- Kashima, Y., Kanematsu, S., Asai, S, Kusada, M., Watanabe, S., Kawashima, T., Nakamura, T., Shimada, M., Goto, T. y Nagaoka S. 2014. "Identification of a novel Hypocholesterolemic protein major royal jelly protein 1, Derived from royal jelly". En Plos One [En línea] Vol (9) 8. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Identification-of-a-Novel-Hypocholesterolemic-Major-Kashima-Kanematsu/ad50715cb9659b51b0d265c86bc7da08dd35d15> [Accesado el 20 de junio 2018]
- Kaneko, T. 2015. Anti-oxidative activity of royal jelly glycation products. *Glycative Stress Research*. 2(3): 108–113.
- Kohen, R. y Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress and antioxidants. *Toxicol Pathol*. 30(6): 620–630.
- Komosinska-Vashev, K., Olczyk, P., Kázmierzak, J., Mencner, L. y Olczyk, K. 2015. "Bee Pollen: Chemical Composition and therapeutic application" en Revista. Evidence-Based

- Complementary and Alternative Medicine. [En línea] Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/297425/abs/> [Accesado el 24 de junio 2018]
- Kostic, A.Z., Barac, M.B., Stanojevic, S.P., Milojkovic-Opseca, D.M., Tesic, Z.L., Sikoparija, B., Radisic, P., Prentovic, M. y Pesic, M.B. 2015 Physicochemical composition and technofunctional properties of bee pollen collected in Serbia. *Food Science and Technology*. 62: 301–309.
- Liu, J.R., Yang, Y.C., Shi, L.S. y Peng, C.C. 2008. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *J. Agric Food Chem*. 56(23): 11447–11452.
- Moguel, O.Y.B., Vivas, R.J.A., Martínez, A.A. M.M., López, H.M.A., Mex, M.L.A. y Alcalá, E.K.I. 2010. Tecnologías para obtener productos de la colmena. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Libro técnico No. 3. Centro de Investigación Regional Sureste. Mérida, Yucatán, México. 120.
- Morita, H., Ikeda, T., Kajita, K., Fujioka, K., Mori, I., Okada, H., Uno, Y. y Ishizuka, T. 2012. Effect of royal jelly ingestion for six months on healthy volunteers. *Nutrition Journal*. 11, 77.
- Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N. y Nagashima, T. 2006. Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. *Journal of medicinal food*. 9(3): 363–7.
- Nagai, T. y Inoue, R. 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry*. 84: 181–186.
- Nabas, Z., Haddadin, M.S.Y., Haddadin, J. y Nazer, I.K. 2014. Chemical composition of royal jelly and effects of synbiotic with two different locally isolated probiotic strains on antioxidant activities. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 64(3): 171–180.
- Nakaya, M., Onda, H., Sasaki, K., Yukiyoshi, A., Tachibana, H. y Yamada, K. 2007. Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 71(1): 253–255.
- Nejati, V. y Zahmatkesh E. 2016. Protective effects of royal jelly on oxymetholone-Induced liver injury in mice. *Iranian Biomedical Journal*. 20(4): 229–234.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO.1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. [Consultado 10 de junio 2018] 1999. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-062-zoo-1999>.
- Pavel, C.I., Marghitas, L.A., Dezmirean, D.S., Tomos, L.I., Bonta, V., Sapcaliu, A. y Buttstedt, A. 2014. Comparison between local and commercial royal jelly—use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2-decenoic acid as quality parameter. *Journal of Apicultural Research*. 53(1): 116–123.
- Pourmoradian, S., Mahdavi, R., Mobasser, M., Faramarzi, E. y Mobasser, M. 2014. Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: A randomized clinical trial. *Chin J. Integr. Med*. 20(5): 347–352.
- Product Manual, Oxiselect™ Superoxide Dismutase Activity Assay, 2017. Catalog number STA 340.
- Product Manual, Oxiselect™ TBARS Assay Kit, (MDA Quantitation) 2017. Catalog number STA 330; STA 330–335.
- Pukalskas, A., Van Beek, T., Venskutonis, R., Linssen, J., Van Veldhuizen, A. y Groot, A. 2002. Identification of radical Scavengers in Sweet Grass (*Hierochloe odorata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(10): 2914–2919.
- Ramadan, M.F. y Al-Ghamdi, A. 2012 Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1): 39–52.
- Rani, V., Asthana, S., Vadhera, M., Sing, Y.U.C. y Atale N. 2015. Tools and Techniques to measure oxidative stress. En: *Free Radicals in Human Health and Disease*. Springer (ed.), pp 43–57. New Delhi.
- Sabatini, A.G., Marcuzzan, G.L., Caboni, M.F., Bogdanov, S. y Almeida-Muradian, L.B. 2009. Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1(1): 7–9.
- Saffari, A., Kevan, P.G. y Atkinson, J.L. 2010. Palatability and consumption of Patty-formulated pollen and pollen substitutes and their effects on honeybee colony performance. *Journal of apicultural Science*. 54(2): 63–71.
- Sagarpa. 2010. “Manual de buenas prácticas de manejo y envasado de la miel” [En línea]- México, Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/95423/Manejo\\_y\\_Envasado\\_de\\_la\\_Miel.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/95423/Manejo_y_Envasado_de_la_Miel.pdf) [Accesado el día 18 de agosto de 2018]
- Sereia, M.J. y Arnaut de Toledo, V.D.A. 2013. Quality of royal jelly produced by Africanized honeybees fed a supplemented diet. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33(June): 304–309.
- Silici, S., Ekmekcioglu, O., Kanbur, M. y Deniz, K. 2011. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *World J Urol*. 29: 127–132.
- Sugiyama, T., Takahashi, K. y Mori, H. 2012. Royal jelly acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, as a modulator of the innate immune responses. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders- drug targets*. 12(4): 368–376.
- Tresina, P.S. y Mohan, V.R. 2013. Evaluación del potencial nutricional y antinutricional de leguminosas subutilizadas del género mucuna. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 16: 155–169.
- Venereo, G.J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med Milit*. 31(2): 126–133.
- Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J. 2017. RRoyal Jelly: Health Benefits and Uses in Medicine. En: *Bee products - chemical and biological properties*. Springer (ed.), pp 199–218. Switzerland.
- Xue, X., Wu, L. y Wang K. 2017. Chemical Composition of Royal Jelly. En: *Bee products - chemical and biological properties*. Springer (ed.), pp 181–190. Switzerland.
- Zaytoon, A.A., Matsuka, M. y Sasaki, M. 1988. Feeding efficiency of pollen substitutes in a honeybee colony: Effect of feeding site on royal jelly and queen production. *Appl. Ent, Zool*. 23 (4): 481–487.