

Uso del polen apícola como bioindicador ambiental en la determinación de plomo en el municipio Antonio Pinto Salinas, del estado Mérida-Venezuela.

Bee pollen used as environmental bioindicator in the determination of lead in Antonio Pinto Salinas municipality, in Merida - Venezuela.

Luís V Gutiérrez P^{1,2,*}, Francisco T Bonive¹, Luis A Paz P¹, José R Vielma¹, Pablo E Carrero², Yelitza J Delgado C², Jean Pablo Cerinza¹, Patricia Vit³.

¹ Universidad Experimental Sur del Lago. Laboratorio de Análisis Químico (LAQUNESUR)

² Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes,

³ Apiterapia y Bioactividad (APIBA), Departamento Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.*
gutierrezlv@unesur.edu.ve

Resumen

El análisis polínico de las mieles proporciona información sobre las preferencias de las abejas y permiten determinar su origen botánico y geográfico. Por esta razón, el polen apícola por ser el segundo producto más consumido proveniente de la colmena, puede contener oligoelementos cuyas cantidades varían de una planta a otra, permitiéndole actuar como un bioindicador de contaminación ambiental, debido a que se puede determinar si existen trazas de minerales tóxicos como el plomo y el mercurio. En el presente trabajo se evaluó la concentración de plomo (Pb) en polen apícola producto de distintas colmenas del Municipio Pinto Salinas del estado Mérida. El análisis de Pb se realizó por espectroscopía de absorción atómica, con atomización electrotérmica (ETAAS). Se encontró una concentración promedio de Pb entre (0,198 -0,288) mg Pb /kg de polen apícola fresco. El método para el análisis de plomo fue realizado mediante estudios de recuperación, obteniéndose un valor de (97-104) %, con una desviación estándar relativa (DER %) < 3 % (n = 7), lo cual indica que el método empleado fue exacto y preciso. Lo que indica que la metodología aplicada en polen apícola podría ser utilizada como un método de rutina para evaluar la contaminación de plomo en el medio ambiente.

Palabras claves: polen, plomo, ambiente, contaminación.

Abstract

Pollen analysis of honey provides information about the preferences of bees and can determine its botanical and geographical origin. Therefore, bee pollen as the second most consumed product from the hive, which may contain trace amounts vary from one plant to another, enabling it to act as a biomarker of environmental pollution, because it can determine whether there are traces of toxic minerals such as lead and mercury. In this study we evaluated the concentration of Pb in bee pollen produced in

different colonies of Pinto Salinas Municipality of the Mérida State. Pb analysis was performed by atomic absorption spectroscopy with electrothermal atomization (ETAAS). We found an average concentration of Pb from (0,198 -0,288) mg Pb / kg of fresh bee pollen. The method for lead analysis was evaluated by recovery studies, obtaining a value of (97-104) %, with a standard relative standard (RSD%) < 3% (n=7), indicating that the method was accurate, precise. This indicates that the methodology used in bee pollen could be used as a routine method to assess lead contamination in the environment.

Recibido: 05 de junio de 2013 Aprobado: 20 de enero de 2014

Introducción

La abeja *Apis mellífera* ha acompañado al hombre durante su evolución en la tierra y además es sin dudas el insecto más estudiado del planeta por lo que puede considerarse uno de los mejores bioindicadores de la degradación ambiental, esto se debe a la infinidad de bibliografía que describe claramente el desarrollo de una colmena en diferentes épocas, climas o circunstancias durante los últimos años a diferencia de otros insectos, peces o plantas que se suelen utilizar como indicadores biológicos. (1-2).

El polen apícola es el resultado de la aglutinación del polen de las flores, efectuado por las abejas pecoreadoras mediante néctar y sus propias sustancias salivares, llevando a cabo la recolección en base a la flora local, que las abejas utilizan como su fuente de alimentación (1) . El mismo es aprovechado por el hombre como alimento natural, rico en proteínas, aminoácidos esenciales por lo que es considerado un excelente suplemento dietético con acción bioestimulante, por lo que se ha incrementado su consumo. Sin embargo, si la flora de la zona, está expuesta al uso indiscriminado de plaguicidas y a la contaminación ambiental este producto de la colmena, no solo contendría oligoelementos cuyas cantidades varían de una especie a otra de la planta de donde proviene, sino también puede contener trazas de otros metales como el estroncio, aluminio, hierro, manganeso y zinc y metales tóxicos como el plomo, cadmio y mercurio (2, 3, 4).

En los humanos, el efecto nocivo del plomo se ha asociado con daños neurológicos, su acumulación se observa principalmente en los huesos y da origen a problemas renales, hipertensión arterial y problemas de la reproducción (4). La susceptibilidad de los individuos varía, por lo que el inicio de los síntomas también puede variar, la disminución de habilidades puede ocurrir con niveles entre 10 y 15 µg/dL; los síntomas de intoxicación ocurren entre los 35 y 50 µg/dL en niños (5) y 40-60 µg/dL en adultos (6); y, la toxicidad severa, entre los ≥ 70 µg/dL en niños y ≥ 100 µg/dL en adultos (7).

En base a esta información, si se toma en cuenta que la abeja es un auténtico detector ecológico (8) y el biomonitoreo es una herramienta única, que lo diferencia sensiblemente de los sistemas mecánicos de monitoreo ambiental. Es posible evaluar el tiempo y el flujo de contaminantes al que se ven expuestos los organismos (9) y a su vez la calidad de los productos que ellos elaboran. Es por ello que, evaluar los productos de la colmena y determinar los contaminantes a lo largo de un período, se ha convertido en una alternativa más económica en relación a los métodos tradicionales.

Por esta razón, se presenta como objetivo de este trabajo la evaluación de la concentración de plomo en polen apícola de distintas colmenas del Municipio Antonio Pinto Salinas del Estado Mérida, para su potencial uso como bioindicador ambiental.

Materiales y métodos

Muestreo

Con ayuda de los apicultores de la zona se instalaron seis (6) estaciones con cuatro (4) colmenas cada una, adicionalmente se colocaron trampas de polen en cada colmena, las mismas contienen una rejilla recolectora con orificios de 4,5 mm de diámetro donde debe pasar la abeja pero impide el paso de la carga de polen que caen en un cajón inferior de recolección. Se recolectaron 100 gramos de polen de cada colmena y se realizaron las observaciones y la toma de muestra en forma paralela. Empleando este sistema, se colectaron 96 muestras de polen en las seis (6) estaciones en el Municipio Antonio Pinto Salinas del Estado Mérida, durante 90 días: tres (3) de ellas son silvestres alejadas aproximadamente 6 kilómetros de la ciudad (A) y tres (3) cercanas a la carretera (B) aproximadamente 30 metros. Obteniendo 50 muestras provenientes de A y 46 muestras de B. Las muestras colectadas se guardaron en envases herméticos y se conservaron bajo refrigeración a - 20 °C hasta el momento de su análisis.

Reactivos

Todas las soluciones se prepararon con reactivos de grado analítico y agua destilada y desionizada de 18 MW, purificada por el equipo Barnstead Nano Pure Infinity. Se utilizó ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (Riedel De Häen, Alemania), nitrato de paladio como modificador químico (Riedel De Häen, Alemania). Se utilizó nitrato de plomo para los patrones de plomo (Merck, Alemania)

Curva de calibración acuosa del Pb

- ◇ Solución estándar de 1000 mg de Pb L⁻¹. Se disolvió 1,5985 g de nitrato de plomo en una cantidad mínima de HNO₃ (1:1). Se diluyó a 1 litro con HNO₃ 1 % v/v. (10).
- ◇ La solución de 10 mg de Pb L⁻¹. Se preparó diariamente mediante dilución del volumen apropiado de la solución de 1000 mg L⁻¹.
- ◇ Las soluciones de trabajo acuosas de 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 µg L⁻¹. Se prepararon diariamente mediante dilución del volumen apropiado para cada caso de la solución de 10 mg de Pb L⁻¹.

Tratamiento de la Muestra

Mineralización del polen apícola

Para la mineralización de la muestra de polen apícola fresco se siguió el procedimiento de Saavedra y colaboradores (11) y la norma venezolana COVENIN N° 1335 (10) con modificación en la preparación de la muestra, donde se pesaron 0,5 gramos de polen apícola fresco en una Balanza electrónica Mettler® PJ-400, se colocaron en un vaso de

precipitado (250 mL) y se le añadieron 5 mL de ácido nítrico (HNO_3). La mezcla se deja a temperatura ambiente por 24 horas, luego se calienta a 70 °C en una plancha de calentamiento marca Corning® PC-35-RC durante 10 minutos, posteriormente se dejó enfriar la solución y se le agregaron 5 mL más de HNO_3 y 5 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), para luego volver a calentar a 70 °C por 60 minutos. La solución se dejó enfriar, y se le añadieron 5 mL de HNO_3 y 5 mL H_2O_2 , calentando nuevamente a la misma temperatura por 60 minutos hasta obtener una solución clara. Una vez que la solución ha alcanzado la temperatura ambiente, esta se diluye a 25 mL en un matraz aforado para realizar las determinaciones por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS).

Determinación de plomo en polen apícola

Para llevar a cabo la determinación de plomo en las muestras de polen se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica Perkin Elmer®, modelo 600ZL, del Laboratorio de Espectroscopia Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, equipado con un atomizador de grafito con calentamiento transversal y un corrector de fondo de efecto Zeeman. El espectrofotómetro fue controlado y programado con una computadora personal (Digital 316sx) utilizando el software WinLAB (v7.2.1) de Perkin-Elmer. Se utilizaron tubos de grafito THGA equipados con plataformas integradas de grafito pirolítico (Perkin-Elmer, parte N° B300-0641). Las muestra fueron inyectadas al sistema a través de un automuestreador Perkin Elmer®, modelo AS/71. Como fuente de radiación se empleó una lámpara de cátodo hueco de Plomo marca Perkin-Elmer con una longitud de onda de 283,3 nm. Por otra parte, se utilizó como modificador químico una solución de paladio. El programa de temperatura utilizado para estos estudios se presenta en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. Condiciones óptimas de Temperatura del espectrómetro de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica **Perkin – Elmer** modelo AAnalyst 600.

Etapa	Temperatura °C	Rampa (s)	Estadía (s)	Flujo de Ar (mL/min)
Secado	110	1	20	250
Secado	130	5	30	250
Pirólisis	700 *	10	20	250
Atomización	1600 *	0	5	250
Limpieza	2400	1	2	250

Procesos de medida por ETAAS

Todas las medidas fueron hechas inyectando 20 μL de patrón y 20 μL de modificador de manera secuencial sobre el tubo de grafito recubierto pirolíticamente. Los parámetros instrumentales se optimizaron siguiendo el método univariado, es decir, un parámetro a la vez y se evaluaron las características analíticas utilizando las condiciones mostradas en la [Tabla 2](#)

Tabla 2: Condiciones instrumentales reportadas y otras variables para la determinación del plomo en ETAAS

Parámetros	Valor
Elemento	Plomo (Pb)
Longitud de onda (nm)	283,3
Slit (nm)	0,7
Corriente de lámpara (mA)	10
Tiempo de Integración (s)	5
Volumen de muestra (µL)	20
Volumen de modificador (µL)	20

Las ecuaciones empleadas para evaluar las características analíticas son las siguientes:

- Masa característica: $m_o = 0,044 \times V(\text{mL}) / m$ donde, m es la pendiente de la gráfica de calibración, V es el volumen de muestra empleado.
- Limite de detección: $\text{LOD} = 3 \times S_{\text{BI}} / m$ donde S_{BI} es la desviación estándar de tres medidas del blanco.
- Limite cuantificación: $\text{LOQ} = 10 \times S_{\text{BI}} / m$

Resultados y discusiones

Las curvas de calibración externa y la adición de estándar realizadas para la evaluación de plomo en las muestras de polen apícola se llevaron a cabo bajo las condiciones óptimas experimentales mostradas en la [Tabla N°1 y 2](#). Estos valores indican que el sistema responde de manera lineal a las concentraciones comprendidas en el intervalo de concentración estudiado ([Tabla 3](#)).

Tabla 3. Características analíticas para validar la determinación del Pb.

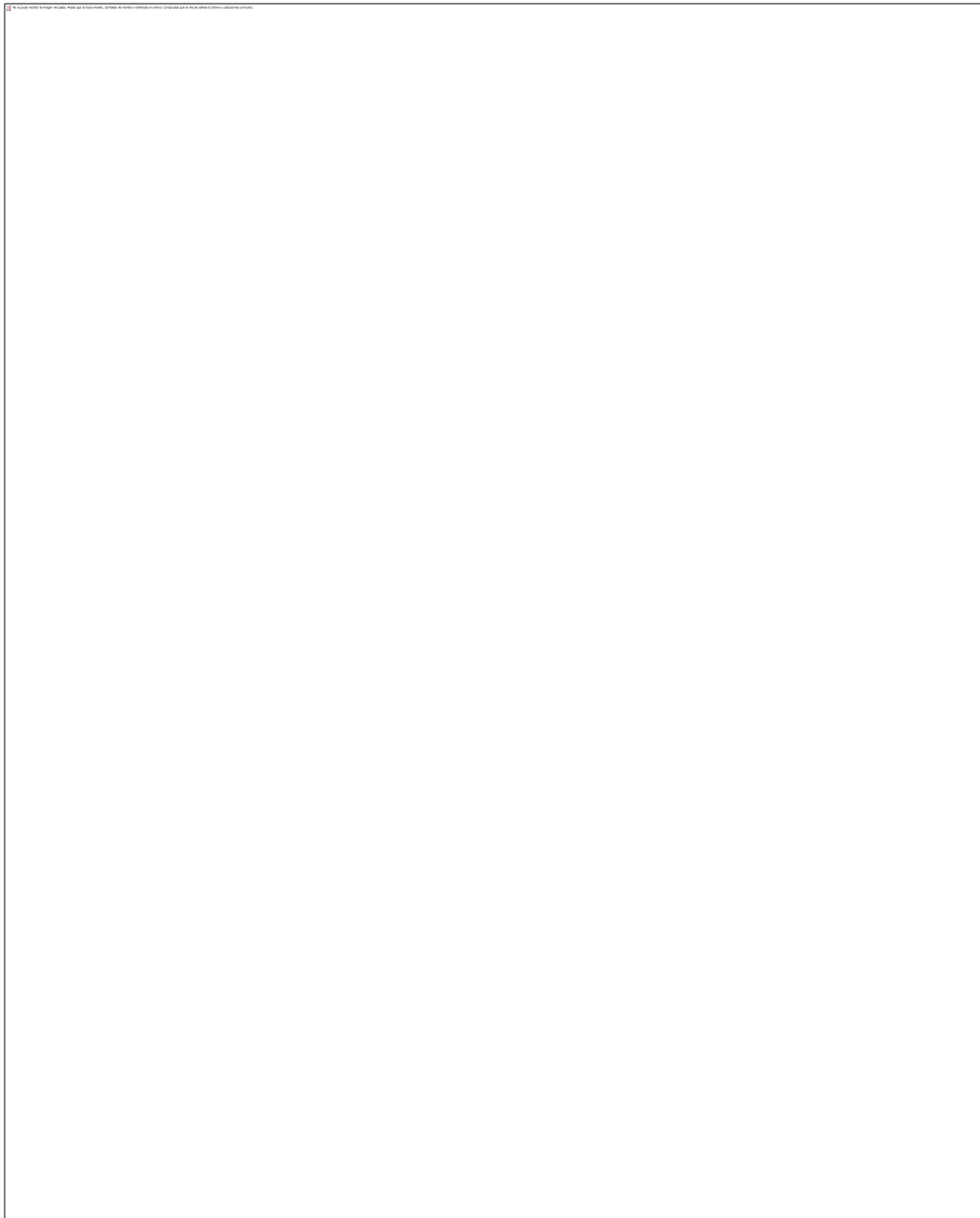
Características	Valor obtenido
Ecuación de la recta	Abs. = $0,0025 + 0,0085[\text{Pb}]$
Coefficiente de determinación	0,9994
Límite de detección (LOD)	0,0027 µg/L
Intervalo de trabajo (LOQ - LOL)	10-120 µg/L
Desviación estándar relativa (RSD)	3%

Los estudios de precisión se realizaron intraensayo e interensayo por la medición de 10 réplicas de la señal analítica de diferentes patrones y de muestras enriquecidas con el analito a distintos niveles de concentración (10, 40, 60, 80 $\mu\text{g L}^{-1}$). Los resultados obtenidos mostraron una DER < 3,0% lo que demuestra una buena repetibilidad del procedimiento descrito.

La exactitud del método se evaluó realizando estudios de recuperación en donde se añadieron a las muestras de polen diferentes concentraciones de plomo (10, 40, 60, 80 $\mu\text{g L}^{-1}$) encontrando valores entre 97 – 104 %, con una desviación estándar relativa (RSD%) < 3,5%, lo cual indica que el método empleado fue exacto, por lo tanto no hay pérdida del analito durante la etapa de tratamiento de muestra empleado.

Una vez establecida las mejores condiciones se llevó a cabo el análisis de plomo en las muestras de polen apícola. Los niveles de concentración de Pb obtenidos se encontraron entre (0,198 -0,288) mg Pb /kg de polen apícola fresco. Donde se pudo observar ([Tabla 4](#)) una elevada concentración de plomo para los apiarios cercano a las carreteras (B) entre (0,175 -0,285) mg Pb /kg esto es debido a la intensidad del tráfico automotor y el aumento del número de talleres de latonería y mecánica automotriz en la zona. La estación 5B tiene el valor más alto de plomo, debido a que esta estación está más cerca de la zona residencial. Las plantas que crecen bajo los efectos de estos contaminantes traen consigo una acumulación de plomo que se ven reflejados directamente en el polen colectado por las abejas, y esto a su vez en la miel que ellas producen. En ese sentido, se puede destacar que existe una gran influencia de la zona en donde las abejas colectan el polen. Sin embargo, los niveles encontrados tanto en A como en B indican que estos metales se encuentran por debajo de los valores tolerables. Dichos resultados concuerda con el trabajo de Saavedra y colaboradores [11].

Tabla N°4 Promedio de la variación de la concentraciones de Plomo en $\mu\text{g/Kg}$ en mieles



Si bien no existen límites máximos de metales pesados en polen apícola, la dosis máxima de plomo permitida en azúcar refinada según Norma COVENIN venezolana (Nº 1234-1995) es de un máximo de 2,0 mg Pb /kg. [12]. Además, la ingesta diaria de polen apícola debería ser de al menos 3,73 kg para exceder el límite del *Codex Alimentarius* o de 798,5 g de polen apícola para alcanzar la ingesta diaria tolerable de 0,214 mg Pb/persona de 60 kg establecida por la FAO/WHO [6-13-14], con la que se puede estimar la ingesta semanal tolerable provisional (PTWI, del inglés *provisional tolerable weekly intake*); lo cual resulta realmente poco probable. Las cantidades de polen apícola consumidas en tratamientos naturistas no sobrepasan 50 gramos diarios [15-17]; de esta manera, el contenido de plomo detectado en el polen apícola del

Municipio Pinto Salinas, está por debajo del nivel máximo permitido y no representa un riesgo para la salud del consumidor [18-20]. Se recomienda realizar monitoréos a través de un programa de vigilancia y control de metales pesados para este rubro alimenticio, y así establecer un control de calidad para el producto. En consecuencia, el estudio realizado tiene un gran valor, ya que provee una idea real acerca del desempeño biológico y el potencial del polen como un buen bioindicador ambiental.

Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que el uso del polen como bioindicador es conveniente, debido a que se detecta una diferencia significativa entre la concentración de metales en el polen silvestre con el polen colectado cerca a las carreteras. Por lo tanto, la posible variación del contenido de plomo en la muestra de polen apícola, es debido al efecto que tiene sobre éste la presencia del tránsito vehicular, del período estacionario, así como las aguas subterráneas de la zona, por ello se recomienda incorporar referencias de tiempo y geográficas que permitan la validación futura de los resultados con la finalidad de establecer una base de datos que permita controlar la calidad del producto.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo sería de gran interés analizar otros metales pesados como el cadmio, el arsénico, níquel y vanadio y seguir realizando este tipo de estudios evaluando el contenido de metales en distintas flores como fuente de polen.

Agradecimiento

A la Dirección de investigación y postgrado de investigación de la Universidad Experimental Sur del Lago "Jesús María Semprum" al proyecto Apícola 2005. Al Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.

Referencias bibliográficas

1. Atrouse O.M., Oran S.A., Al-Abbadi S.Y. **Chemical analysis and identification of pollen grains from different Jordanian honey samples**. Int. J. Food Sci. Tech. 2004; 39(4):413-417.
2. Belitz, H.D. y Grosch, W. 1988. **Química de los Alimentos**. Editorial Acribia; Zaragoza, España. P 1-813.
3. Montenegro Gloria, Fredes Carolina. **Relación entre el origen floral y el perfil de elementos minerales en mieles chilenas**. Gayana Botánica. 2008; 65(1): 123-126.
4. ATSDR, 2007. Toxicological profile for lead. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/lead/pb> lead 2. (Consultado en línea Diciembre de 2013).
5. Olivero J., Duarte D., Echenique M., Guette J., Johnson B., Parsons J. **Blood lead levels in children aged 5-9 years living in Cartagena, Colombia**. Science of The Total Environment, 2007; 372(2-3): 707-716.

6. FAO/WHO. 1993. **Evaluation of certain food additives and contaminants**. 41st Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organisation Technical Report Series no. 837; Geneva.
7. Ladrón de Guevara, J. y Moya Pueyo, V. 1995. **Toxicología Médica**. Interamericana-McGraw Hill; Madrid, España. P 1-737.
8. Garcia J.C.R., Garcia J.B., Latorre C.H., Martin S.P., Crecente R.M.P. **Comparison of palladium-magnesium nitrate and ammonium dihydrogenphosphate modifiers for lead determination in honey by electrothermal atomic absorption spectrometry**. Food Chem. 2005; 91(3):435-442.
8. Garcia J.C.R., Garcia J.B., Latorre C.H., Martin S.P., Crecente R.M.P. **Comparison of palladium-magnesium nitrate and ammonium dihydrogenphosphate modifiers for lead determination in honey by electrothermal atomic absorption spectrometry**. Food Chem. 2005; 91(3):435-442.
9. Louveaux J., Maurizio A., Vorwohol G. **Methods of Melissopalynology**. Bee World, 1978; 59(4):139-157.
10. **Comisión Venezolana de Normas Industriales**. Determinación de plomo. **COVENIN N° 234:1995**. Caracas: Fondonorma; 1978.
11. Saavedra Agni R, Di Bernardo María L, Rondon Carlos, *et al.* **Determinación de plomo en polen apícola de Brassica napus L. del Páramo de Misintá, estado Mérida, Venezuela**. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 2007;38(1): 6-10.
12. **Comisión Venezolana de Normas Industriales**. Azúcar Refinado. **COVENIN N° 1335-78** Caracas: Fondonorma; 1978.
13. Marchiol L., Fellet G., Perosa D., Zerbi G. **Removal of trace metals by Sorghum bicolor and Helianthus annuus in a site polluted by industrial wastes: A field experience**. Plant Physiology and Biochemistry, 2007; 45: 379-387.
14. Yuruk A, Bozkurt M. **Heavy metal accumulation in different organs of plants grown under high sewage sludge doses**. Fresenius Env. Bull. 2006; 15(2):107-112.
15. Vit P. **La calidad de los productos apícolas comienza en el campo**. Fuerza Farmacéutica 2005; 9(1):30-35.
16. Vit P., Santiago B. **Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de los Andes Venezolanos**. Archivos Latinoamericanos de nutrición, 2008; 58(4): 411-415.
17. Vit Patricia, Mejías Arelis, rial Leandra, ruiz Javier, Peña Soneida, González Ana Carolina, Rodríguez-Malaver Antonio, Arráez Meylin, Gutiérrez Carla, Zambrano Alicia, Barth Ortrud Monika. **Conociendo la miel de Melipona favosa en la península de Paragana, Falcón, Venezuela**. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 2012; 43(1).

18. Molina Laura, Rondón Carlos, Di Bernardo María, Yépez Juan, Guerrero Leyda. **Anemias sideroblásticas y puentado basófilo: Indicador biológico por exposición ocupacional al plomo y sus derivados.** *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 2012; 43(1).

19. Hoja de información sobre el plomo. University of MARYLAND, Environmental Safety, Division of administrative Affairs. Disponible en la World Wide Web: http://www.des.umd.edu/os/lead/spanish_factsheet.html [consultado Mayo 2013].

20. Yáñez C, Di Bernardo M, García M, Ríos N, Rincón J, Rodríguez N, et al. Valoración de parámetros hematológicos y bioquímicos como marcadores biológicos de exposición ocupacional al plomo en Mérida, Venezuela. *Retel* / n°14 [ene 2008 - abr 2008].