

## Efecto de la Fermentación Postcosecha en la Capacidad Antioxidante de Miel de *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811

Elizabeth Pérez-Pérez<sup>1</sup>, Antonio Rodríguez-Malaver<sup>2</sup> y Patricia Vit<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Fac. de Ciencias,

<sup>2</sup> Laboratorio de Bioquímica Adaptativa, Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina,

<sup>3</sup> Apiterapia y Bioactividad, Depto. de Ciencia de los Alimentos, Fac. de Farmacia y Bioanálisis;

Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela. E-mail: vit@ula.ve

**Palabras clave:** Capacidad antioxidante, miel, fermentación, radicales libres, *Tetragonisca angustula*.

**Keywords:** Antioxidant capacity, fermentation, honey, free radicals, *Tetragonisca angustula*.

### RESUMEN

Luego de su cosecha, las mieles tropicales de abejas sin aguijón producen espuma debido a su elevado tenor de humedad respecto a mieles de *Apis mellifera*. En este trabajo se midió la capacidad antioxidante de miel de *Tetragonisca angustula* recién cosechada (26.2 g agua/100 g miel) y conservada a dos temperaturas, refrigerada a 4°C y ambiente a 30°C, en intervalos de cinco días hasta alcanzar un mes. Se utilizaron controles de pasteurización y miel artificial, también conservados a 4°C y 30°C. Los indicadores antioxidantes fueron el porcentaje de inhibición de la formación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y del radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) así como la degradación de benzoato, conocida como actividad antioxidante (AOA). También se monitoreó la concentración de proteínas, azúcares totales y etanol durante un mes. El aumento gradual en el contenido de etanol sólo ocurrió en la miel conservada a 30°C (8.7 a 29.3 mg/kg miel), acompañada de una disminución de azúcares totales (81.5 a 31.7 g/100 g miel), indicando que la miel fermenta. La concentración de proteínas disminuyó ligeramente (207 a 197 mg/100 g de miel), mientras que los indicadores de capacidad antioxidante se incrementaron (anión superóxido, 69.1 a 94.8%; radical hidroxilo, 62.2 a 90.5%; AOA, 0.58 a 0.89 mM), a lo largo del proceso fermentativo. La fermentación aumentó la bioactividad antioxidante de la miel de *T. angustula*. Este hecho podría explicar la reputación de las propiedades medicinales de abejas sin aguijón, conferidas desde los Mayas, porque podría disminuir el deterioro oxidativo de radicales libres en lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, generador de especies reactivas de oxígeno (ROS) que ocasionan complicaciones biológicas degenerativas.

### ABSTRACT

After harvest, stingless bee tropical honey produce froth due to the higher water content than *Apis mellifera* honey. In this work, the antioxidant capacity of fresh *Tetragonisca angustula* honey with 26.2 g water/100 g honey was stored at two temperatures, refrigerated at 4°C and environmental at 30°C, was measured every five days up to a month. Artificial and pasteurized honey also kept at 4°C and 30°C were the controls. The antioxidant indicators were the inhibition percentage of superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) and hydroxyl radical ( $OH^{\bullet}$ ), and the benzoate degradation known as antioxidant activity (AOA). Concentrations of proteins, total sugars and ethanol were also monitored for one month. A gradual increase of ethanol only occurred in the honey kept at 30°C (8.7 to 29.3 mg/kg), besides a total sugar decrease (81.5 to 31.7 g/100 g honey), indicating honey fermentation. Protein concentration showed a low decrease (207 to 197 mg/100 g honey), while the antioxidant capacity indicators increased (superoxide anion, 69.1 to 94.8%; hydroxyl radical, 62.2 to 90.5%; AOA, 0.58 to 0.89 mM) along with the fermentative process. Fermentation increased the antioxidant bioactivity of *T. angustula* honey. This fact could explain the reputed medicinal properties of stingless bee honey, dating back to the Mayas, by reducing the oxidative damage to lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids generating reactive oxygen species (ROS) causing biological degenerative complications.

## INTRODUCCIÓN

La abeja *Tetragonisca angustula* Latreille 1811 es una abeja sin aguijón. Se conoce con este nombre a un grupo de abejas tropicales y subtropicales ubicadas sistemáticamente en la subfamilia Meliponini y en la misma familia de la conocida *Apis mellifera*, Apini (Silveira *et al.*, 2002). Coloquialmente, *T. angustula* recibe diversos nombres: angelita (Venezuela), doncellita (Guatemala), jataí (Brasil), señorita (Brasil), por mencionar algunos países donde se produce (Vit *et al.*, 2004).

La fermentación se considera inaceptable en los estándares de calidad de miel de *A. mellifera* (Ruoff & Bogdanov, 2004); sin embargo, es un proceso característico en las mieles de abejas sin aguijón, las cuales suelen tener mayores contenidos de humedad y de acidez. Este proceso ocurre en forma espontánea en las botijas donde las abejas almacenan el néctar, pero también se permite luego de la cosecha y antes de su comercialización para mejorar los atributos medicinales de la miel (Vit *et al.*, 2004).

Un amplio espectro de fuentes de radicales libres producidos durante exposiciones diarias a diversos factores exógenos (humo, alcohol, insecticidas, radiación, productos de limpieza, sol, etc.) y endógenos (consumo de frituras, ejercicio extremo, estrés, etc.), es causa de numerosas enfermedades degenerativas (Halliwell & Gutteridge, 1989). Por un lado, se ha sugerido que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están implicadas en daños hepáticos y renales de consumidores crónicos de etanol (Huerta Bustamante, 2003), ya que el etanol produce estrés oxidativo en las células (Saldaña-Balmori *et al.*, 2003); por otro, bajas concentraciones de etanol se utilizan en la preparación de soluciones hidroalcohólicas para disolver principios activos en los elixires farmacéuticos (Trillo, 1993).

Los antioxidantes son efectivos en bajas concentraciones y ayudan a inactivar los radicales libres; por eso se estudia la capacidad antioxidante de los alimentos y de los medicamentos. Los polifenoles participan en el sistema antioxidante de la miel (Dailey & Imming, 1999; Frankel *et al.*, 1998), reforzado por la vitamina C y la catalasa (Gheldof, 2002).

Conociendo que la miel de abejas sin aguijón es un alimento medicinal utilizado desde los Mayas, se decidió

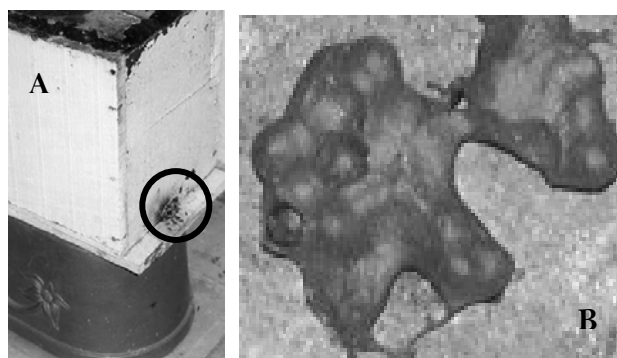
seleccionar la miel producida por la especie *T. angustula* para estudiar el efecto que produce su fermentación postcosecha en tres indicadores de capacidad antioxidante:

1. Inhibición de la formación de anión superóxido.
  2. Inhibición de la formación del radical hidroxilo.
  3. Degradación del benzoato.
- Para tal fin, se comparó la miel natural con controles de miel pasteurizada (con levaduras inactivadas), y de miel artificial (sin levaduras), tanto a temperatura ambiente (30°C) como a temperatura de refrigeración (4°C).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de miel

La miel de *T. angustula* se recolectó de una colmena racional (Fig. 1) en la ciudad de Mérida (N 8° 33.25' W 71°



**Fig. 1.** Piquera (A) y botijas de miel (B) en colmena de *T. angustula* 12.64' por prensado puesto que las botijas de esta especie son muy pequeñas. La miel artificial se utilizó como control y se preparó con 40 g de fructosa, 30 g de glucosa, 8 g de maltosa y 2 g de sacarosa (Taormina *et al.*, 2001).

### Fermentación controlada

Para evaluar el efecto de la fermentación en la capacidad antioxidante de la miel, se organizaron tres grupos de miel: 1. Sin tratamiento. 2. Pasteurizada. 3. Miel artificial. Las mieles se colocaron en un cuarto de temperatura controlada a 30°C durante 30 días. Cada cinco días se tomaron muestras de cada uno de los tratamientos y se les determinó la capacidad antioxidante, contenido de polifenoles, concentración de proteínas, contenido de azúcares reductores y concentración de etanol, según los procedimientos explicados abajo.

*Composición química de las mieles*

El contenido de humedad se midió por refractometría siguiendo las normas de miel de abejas nacionales (Comisión Venezolana de Normas Industriales, 1984) e internacionales (Comisión del *Codex Alimentarius*, 2001). Las proteínas se determinaron con el método de Lowry *et al.* (1951). La concentración de azúcares se midió con el método de Nelson-Somogyi (1952). El etanol se determinó con un método enzimático, usando la enzima alcohol deshidrogenasa (Pérez Bendito & Valcárcel Cases, 1984).

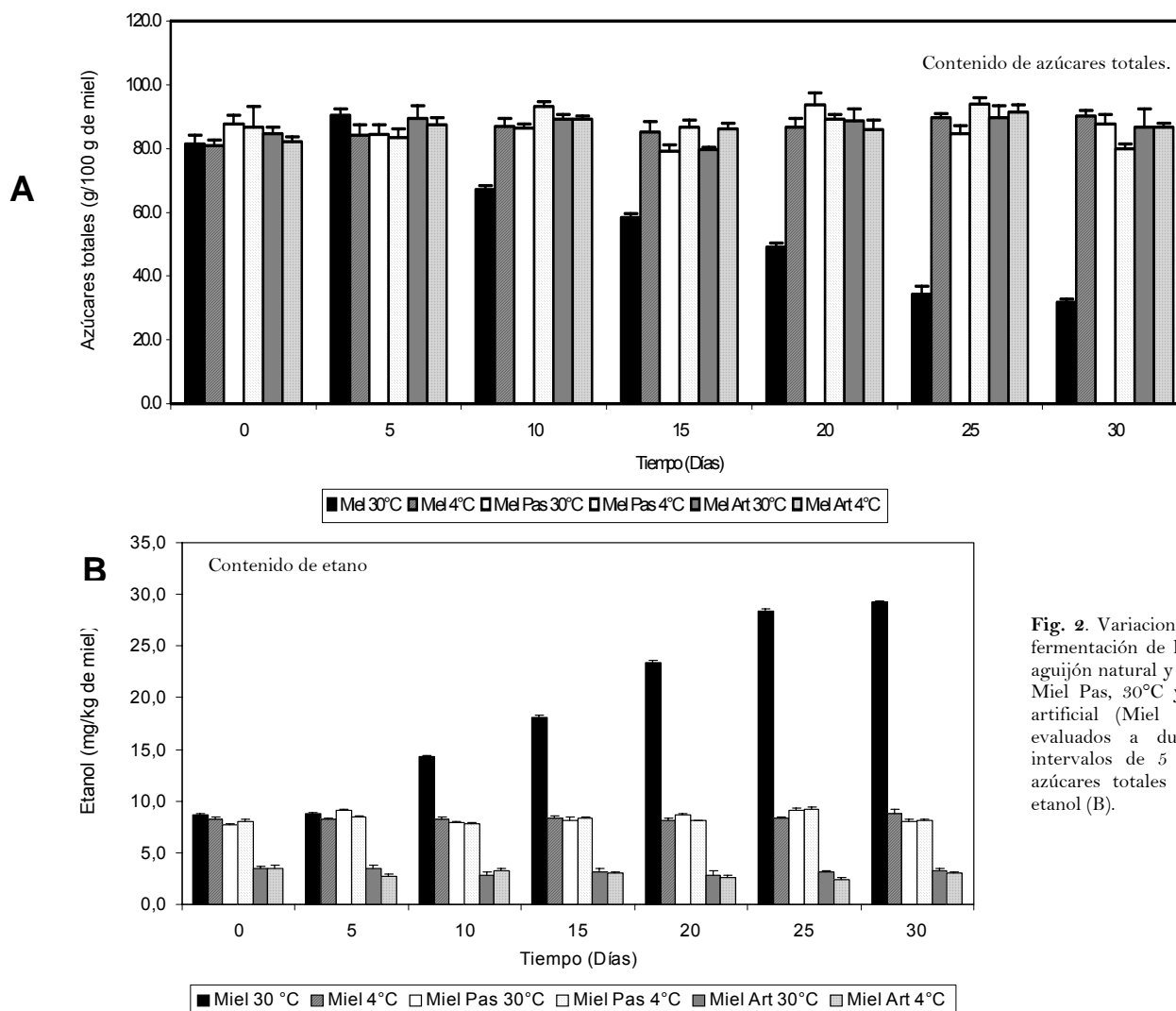
*Evaluación de capacidad antioxidante*

La capacidad antioxidante se evaluó utilizando tres métodos: la formación del radical hidroxilo se midió con el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell *et al.* (1987), anión superóxido se midió con el método de Rice-Evans *et al.* (1991) y la degradación del benzoato (AOA) con el método de Koracevic *et al.* (2001).

**RESULTADOS**

El contenido de humedad de la miel resultó ser 26.2 g agua/100 g miel, el cual es un valor elevado para la miel de abejas. En la Fig. 2 A y B, se presentan las variaciones en el contenido de azúcares totales y de etanol de la miel. Puede apreciarse que el

contenido de azúcares es similar en todas las mieles al inicio del experimento y disminuye paulatinamente en la miel de *T. angustula* sin pasteurizar conservada a 30°C, pero se mantiene en los demás tratamientos. El contenido de etanol de la miel de *T. angustula* es



**Fig. 2.** Variaciones de indicadores de fermentación de la miel de abejas sin aguijón natural y pasteurizada (Miel y Miel Pas, 30°C y 4°C) y de la miel artificial (Miel Art 30°C y 4°C), evaluados a durante un mes en intervalos de 5 días: Contenido de azúcares totales (A) y contenido de etanol (B).

mayor que en la miel artificial y aumenta únicamente en la miel natural de *T. angustula* conservada a 30°C. Puede observarse que la fermentación, evaluada como disminución de azúcares y aumento de etanol, sólo ocurre en la miel no pasteurizada conservada a una temperatura ambiente de 30°C.

En la Fig. 3 se presenta el efecto de la fermentación de la miel de *T. angustula* en tres indicadores de capacidad antioxidante: 1.- Inhibición de la formación del anión superóxido. 2.- Inhibición de la formación del radical hidroxilo. 3.- Degradación del benzoato. Puede observarse que la capacidad antioxidante sólo varía en las mieles fermentadas y no cambia en los tratamientos donde no ocurrió la fermentación (miel a 4°C, mieles pasteurizadas y mieles artificiales). A los 25 días se alcanza un máximo de capacidad antioxidante medida como porcentaje de inhibición de formación de anión superóxido y del radical hidroxilo, el cual se mantiene a los 30 días. La degradación del benzoato, para evaluar actividad antioxidante, también alcanza su máximo a los 25 días, pero presenta una tendencia a disminuir a los 30 días.

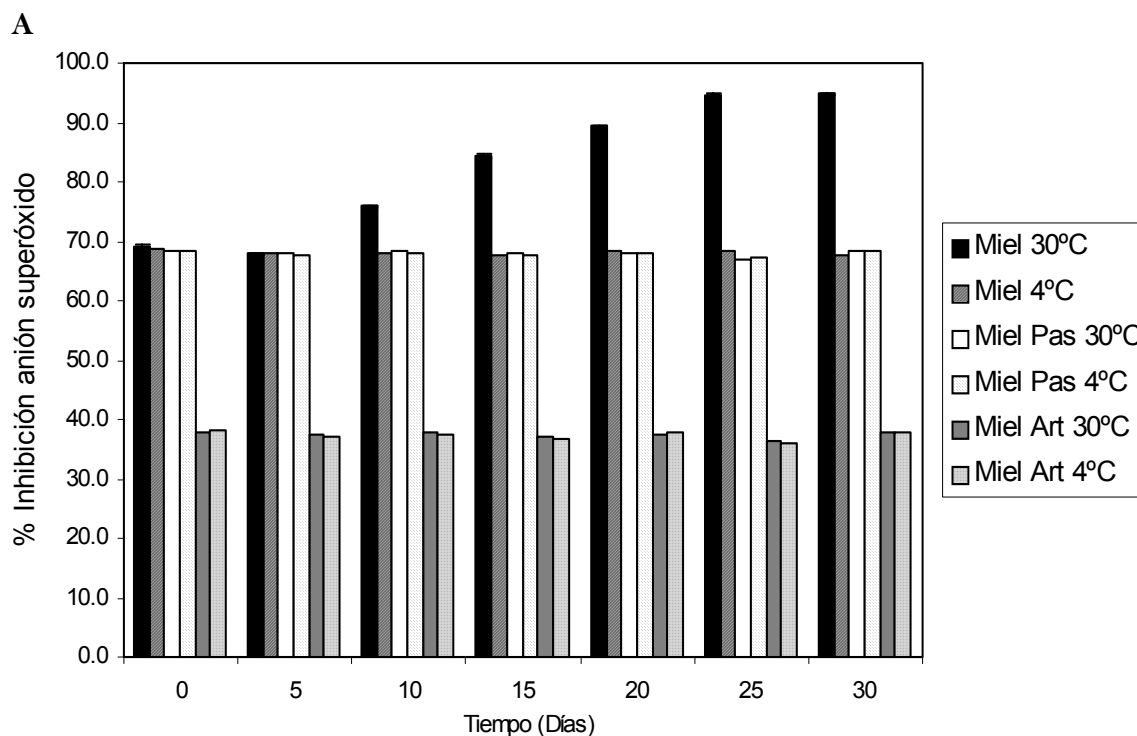
Los resultados de proteínas no presentaron variaciones con el tiempo, por lo que se descartan procesos de proteólisis.

### DISCUSIÓN

El elevado contenido de humedad de la miel de *T. angustula*, 26.2 g agua/100 g miel, comparado con el máximo permitido de 20.0 g agua/100 g. miel de *A. mellifera* (Codex Alimentarius Commission, 2001), ocasiona la fermentación espontánea de la miel porque las levaduras se encuentran en un sustrato favorable.

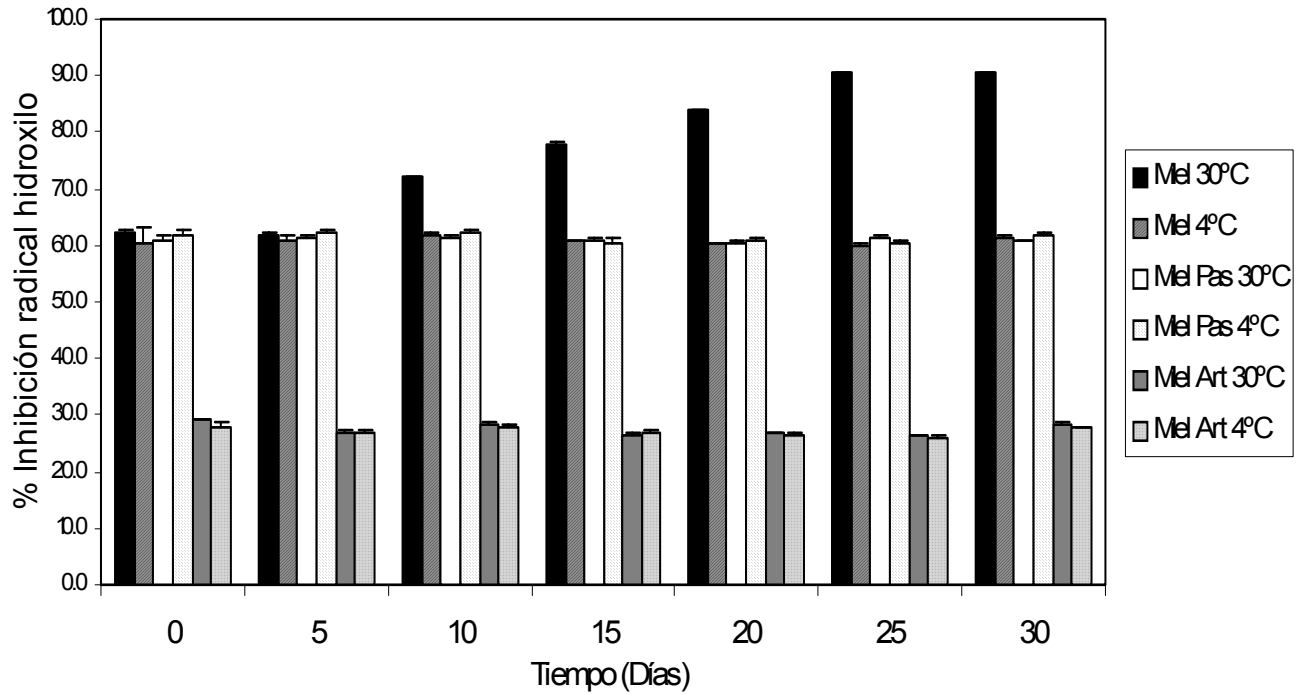
La fermentación de miel de *T. angustula* no ocurrió en mieles pasteurizadas y tampoco en la miel natural pasteurizada a 4°C; por ello se recomienda refrigerar la miel de abejas sin aguijón para conservar los estándares de calidad que descalifican mieles fermentadas. No obstante, la miel de *T. angustula* aumenta su capacidad antioxidante con la fermentación ocurrida en la miel natural conservada a 30°C; lo cual justifica conservar la miel a temperatura ambiente para mejorar su capacidad antioxidante, si se confiere un uso medicinal. Este

Efecto de la fermentación de la miel en la inhibición de la formación del anión superóxido



B

Efecto de la fermentación de la miel en la inhibición de la formación del radical hidroxilo.



Efecto de la fermentación en el valor de AOA.

C

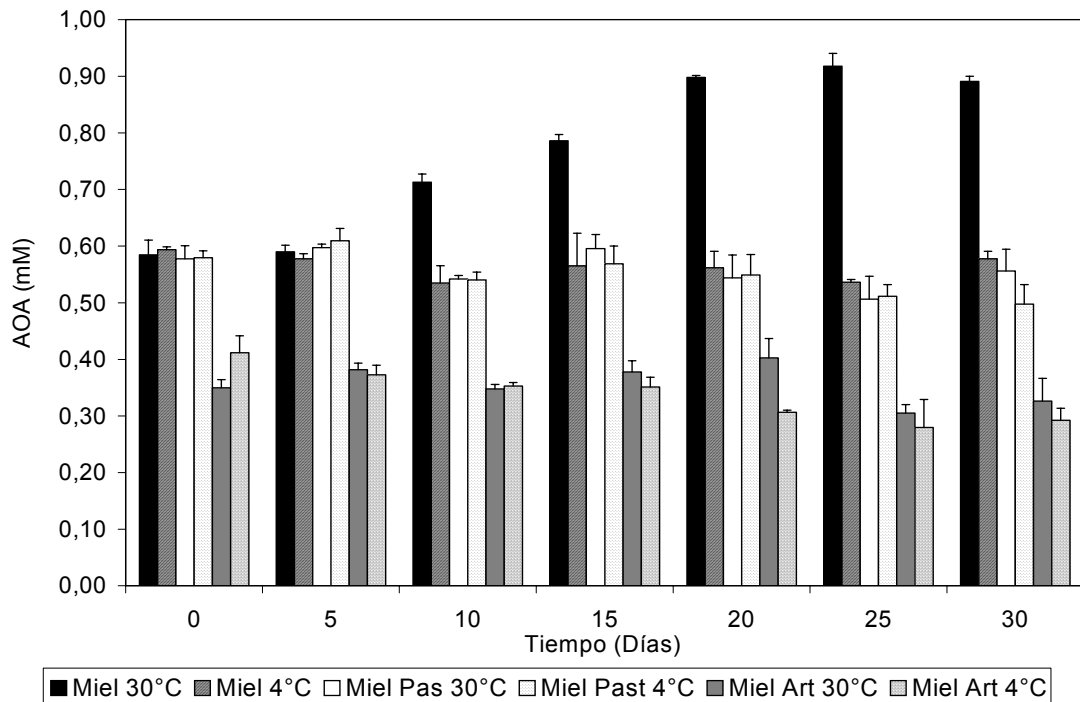


Fig. 3. Efecto de la miel de *Tetragonisca angustula* en la capacidad antioxidante medida de la fermentación de la miel como la formación del radical superóxido (A), la inhibición del radical hidroxilo (B) y la degradación del benzoato (C).

estudio se limitó a 30 días, pero es necesario conocer el comportamiento de anaquel durante un tiempo no menor de 6 meses. Los tratamientos postcosecha combinados (Vit, 2002) podrían permitir la fermentación de la miel fresca hasta aumentar su capacidad antioxidante, junto con el envasado adecuado y la refrigeración para extender su vida útil.

Al observar la Fig. 3, puede apreciarse que la pasteurización no alteró la capacidad antioxidante de la miel natural y que los azúcares de la miel artificial poseen actividad en los sistemas oxidativos estudiados. Podría afirmarse que los azúcares confieren aproximadamente un 50% de la actividad antioxidante de la miel.

En un estudio con miel fresca de *A. mellifera* producida en Galicia (España) se reportan variaciones entre 13.5 y 50.1 mg etanol/kg miel y una excepción de 141.8 mg etanol/kg miel (Huidobro *et al.*, 1978), pero en este estudio no se evaluó capacidad antioxidante. El aumento de capacidad antioxidante causado por el incremento del contenido de etanol en la miel de abejas no había sido reportado previamente. En el presente estudio, el contenido de 8.7 mg/kg miel fresca de *T. agustula* resultó menor que en el estudio de las mieles gallegas.

Desde un punto de vista medicinal, las pequeñas cantidades de etanol presentes en las mieles podrían ser beneficiosas al semejar a una bebida alcohólica suave (Trevithick *et al.*, 1999), en contraposición con su uso como indicador de deterioro de la calidad de la miel consumida como edulcorante natural (Codex alimentarius Commission, 2001; Ruoff & Bogdanov, 2004). En tal sentido, la fermentación postcosecha de la miel de *T. angustula*, considerada hasta ahora como un defecto, puede convertirse en un atributo medicinal ya que el etanol producido mejoró su capacidad antioxidante. Es necesario resaltar que en este trabajo se realizó una fermentación controlada, la cual podría ser reproducible o no en las condiciones de campo, donde las temperaturas ambientales pueden superar los 30°C, lo cual justifica continuar con este estudio.

#### AGRADECIMIENTO

La identificación entomológica fue gentilmente realizada por el Prof. JMF Camargo, Depto. Biología,

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

#### REFERENCIAS

- Codex Alimentarius Commission (2001). CODEX STAN 12-1981. *Revised Codex Standard for Honey*. CAC, Rome.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (1984). *Miel de Abejas. Métodos de Ensayo*, COVENIN 2136-84. Fondonorma, Caracas.
- Dailey LA & Imming P (1999) 12-Lipoxygenase: classification, possible therapeutic benefits from inhibition, and inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 6: 389-398.
- Frankel S, Robinson GE & Berenbaum MR (1998) Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *J. Apicult. Res.* 37: 27-31.
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1987) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Calendon Press, Oxford, UK.
- Halliwell B, Gutteridge JMC & Aruoma O (1987) The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165: 215-219.
- Huerta Bustamante PA, Henríquez Huerta PA, Castillo Peñaloza RL, Carrasco Loza RA Orellana M & Rodrigo Salinas MA (2003) Estudio comparativo del estudio crónico de vino tinto sobre la expresión y la actividad del citocromo P<sub>450</sub> en hígado y riñón de rata. *Med UNAB* 6: 4-9.
- Huidobro JF, Rea ME, Branquinho de Andrade PC, Sánchez MP, Sancho MT, Muniategui S & Simal-Lozano J (1994) Enzymatic determination of primary normal alcohols as apparent ethanol content in honey. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1975-1978.
- Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S & Cosic V (2001) Method for measurement of antioxidant activity in human fluids. *J. Clin. Pathol.* 54: 356-361.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Pérez Bendito MD & Valcárcel Cases M (1984) *Métodos Cinéticos de Análisis*, Publicaciones del Monte de Piedad, Caja de Ahorros de Córdoba y Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
- Rice-Evans C, Diplock A & Symons M (1991) Techniques in Free Radicals Research. In Burdon RH & Van Knippenberg PH (eds.) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular*

- Biology*, Vol. 22. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Holland.
- Ruof K & Bogdanov S (2004) Authenticity of honey and other bee products. *Apiacta* 38: 317-327.
- Saldaña-Balmori Y, Ramírez-González & Delgadillo-Gutiérrez H (2003) Acción de algunos antiinflamatorios no esteroideos sobre la lipoperoxidación hepática inducida por etanol. *Rev. Cubana Inv. Bioméd.* 22: 16-24.
- Silveira FA, Melo GAR & Almeida EAB (2002) *Abelhas Brasileiras, Sistemática e Identificação*, Fundação Araucária, Belo Horizonte.
- Somogyi N (1952) Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- Taormina PJ, Niemira BA & Beuchat LR (2001) Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.* 69: 217-225.
- Trevithick CC, Vinson JA, Caulfield J, Rahman F, Derksen T, Bocksch L, Hong S, Stefan A, Teufel K, Wu N, Hirst M & Trevithick JR (1999) Is ethanol an important antioxidant in alcoholic beverages associated with risk reduction of cataract and atherosclerosis? *Redox Report* 4: 89-93.
- Trillo F (1993) *Tratado de Farmacia Galénica*, Ediciones Luzan, Madrid.
- Vit P (2002) *Apuntes de Tecnología de Alimentos*. Ed. Fac. Farmacia ULA, Mérida, Venezuela.
- Vit P, Medina M & Enriquez ME (2005) Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World* 85: 2-5.