

AVANCES EN LA CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE PRODUCTOS APÍCOLAS DE VARIEDADES DE ABEJAS NATIVAS COLOMBIANAS

Ph.D. (c) Martha Cecilia Quicazán[□], Ph.D. (c) Amanda Consuelo Díaz*, Ing. Carlos Mario Zuluaga[§]

Introducción

En Colombia, gracias a su megadiversidad biológica, existe un gran número de especies de abejas nativas cuyo potencial para la producción de miel, polen y propóleos apenas empieza a ser estudiado. Existen cerca de 500 especies de abejas sin aguijón en el mundo, 300 de ellas en Latinoamérica y cerca de 120 en Colombia (Nates, 2004). Los estudios hechos para adquirir conocimiento sobre estas abejas, se ha enfocado principalmente en taxonomía, descripción de colmenas y comportamiento.

Los productos de estas abejas tienen en Colombia un mercado creciente, como es el caso de la miel conocida como “miel de angelitas” de la especie *Trigona (Tetragonisca) angustula*, la cual se comercializa en tiendas naturistas a precios superiores debido a la asociación de esta miel con propiedades terapéuticas, pero sin ningún tipo de estudio de sus características fisicoquímicas, lo cual facilita la competencia desleal. (Martínez, 2006)

Reconociendo las tendencias de producción y comercialización de alimentos, el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, de manera conjunta con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, desarrolla el Proyecto de Investigación “*Selección de Indicadores Fisicoquímicos Mediante Aplicación de Nariz Electrónica para la Catalogación de Productos Apícolas*”, cuyo objetivo es definir las características físicas y químicas (volátiles y no volátiles), que permitan establecer el espectro de huella única de miel, polen y propóleos de cuatro regiones de la producción nacional (Sierra Nevada de Santa Marta, Santander, Cundinamarca y Boyacá), de especies de abejas nativas colombianas y *apis mellifera*, esta última de gran importancia

[□] Profesora Asociada. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. – Colombia. Teléfono: (571) 3165000 ext. 19211. E-mail: mcquicazand@unal.edu.co

* Profesora Auxiliar. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. – Colombia. Teléfono: (571) 3165000 ext. 19218. E-mail: amcdiazmo@unal.edu.co

[§] Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. – Colombia. Teléfono: (571) 3165000 ext. 19218. E-mail: cmzuluagad@unal.edu.co

por su distribución y su frecuencia a nivel nacional, y cuyas tecnologías de cría y manejo han sido desarrolladas y probadas en el país (Nates, 2001).

En el desarrollo experimental, se ha realizado inicialmente el perfil aromático de muestras de miel de abejas nativas y *apis mellifera* mediante el uso de una nariz electrónica, el principio de esta es excitar una serie de sensores con la fracción volátil de una muestra, generando una “huella digital” (respuesta del arreglo de sensores) característica de cada muestra, la cual por medio de herramientas estadísticas, permite la diferenciación y clasificación por compuestos volátiles. (Bogdanov *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2005)

Los sistemas de olfato electrónico, popularmente conocidos como “narices electrónicas”, tienen una historia muy reciente. Aunque sus orígenes se remontan a los primeros sistemas ideados en los sesenta (Wilkins, 1964), no aparecieron sino hasta los años 90, destacando los conocidos sistemas de AlphaMOS (1993), Neotronics y Aromascan (1994) (Vanneste & Geise, 2003; Zhang, 2003). En la tabla 1 se describen algunos de los sistemas de olfato electrónico comerciales disponibles en la actualidad.

Tabla 1. Sistemas de Olfato Electrónico más conocidos. (Durán, 2005)

Compañía	Sistema
Agilent Technologies	4440
Airsense Analytics, Alemania	PEN2, PEN3, i-PEN
Alpha MOS, Francia	Fox 2000, 3000, 4000, 5000alphaKronos, alphaPrometheus,alphaCentauri, alphaGemini
Bloodhound Sensors, UK	UK Bloodhound BH114,OEM-modules under development
Chemsensing Inc	Chemsensing
Cyrano Sciences, US	Cyranose 320
Electronic Sensor Technology, US	zNose
Element, Iceland	FreshSense
Hewlett Packard, US	HP4440A
Lennartz Electronic, Alemania	MOSES II
Marconi Applied Technologies	e-nose 5000
Nordic Sensor Technologies	NST 3210, NST 3220, NST 3220A
Osmetech, UK and US	OMA, MultiSampler-SP, CP sensors
Smart Nose, Suiza	SMart Nose-300
SMart Nose-300	PEN, i-PEN, PEN-EDU

El método de análisis de compuestos mediante uso de nariz electrónica ha permitido, gracias a la presencia de volátiles y semivolátiles en las muestras de miel de abejas, diferenciar y caracterizar muestras con una determinada huella olfativa (Benedetti *et al.*, 2004). El aroma característico, dependiendo de las condiciones de su recolección, así como el ambiente de desarrollo de la abeja son de gran importancia para esta huella olfativa la cual hacen de la muestra de miel una muestra única (Pearce *et al.*, 2003).

Adicionalmente, se ha realizado un perfil de carbohidratos de las muestras recolectadas, en el cual fue posible cuantificar el contenido de fructosa y glucosa presente en la miel de abejas nativas, lo cual permite realizar una comparación con miel de abejas de la especie *Apis mellifera* proveniente de cuatro regiones del país.

Las zonas geográficas objeto del muestreo, se encuentran en diversos puntos del país haciendo que las características de vegetación y topografía sean diversas. El área de muestreo de la Sierra Nevada esta ubicada entre 1500 y 2000 m de altura, con temperaturas entre 18 y 24° C y precipitaciones entre 1000 y 2000 mm., la zona de Santander es cálida y seca, se encuentra dentro de un rango de altura entre 500 y 1500 m, con temperaturas entre 18 y 24° C y precipitaciones anuales entre 500 y 1000 mm. La zona de muestreo de Boyacá se encuentra en un rango de altura entre 2400 y 3200 m, con temperaturas que oscilan entre 6 y 18° C y precipitaciones anuales entre 500 y 2000 mm. y en Cundinamarca los apiarios están en un rango de altura 1500 y 2500 m de altura. La temperatura aproximada esta entre 15 y 18° C y las precipitaciones anuales entre 1000 y 2000 mm.



Figura 1. Zonas de producción apícola colombiana objeto del estudio.

Objetivo

Revisar el avance de la caracterización fisicoquímica de productos apícolas de variedades de abejas nativas colombianas mediante el análisis de compuestos volátiles mediante el uso de nariz electrónica y el perfil de carbohidratos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y comparar los resultados obtenidos con muestras de miel abejas de la especie *Apis mellifera*.

Materiales y Métodos

Las muestras de miel de las especies nativas fueron recolectadas de la zona de Santander, las cuales fueron tomadas en viales que se conservaron en refrigeración hasta la realización de los análisis respectivos, entre tanto, las muestras de miel de abejas de la especie *Apis mellifera* fueron cosechadas de las zonas de Santander, la Sierra Nevada de Santa Marta, Boyacá y Cundinamarca, las cuales fueron envasadas en frascos de vidrio de 250 ml.

Las especies nativas de las cuales se tomaron muestras fueron: *Tetragonisca angustula*, *Mellipona fasciata*, *Mellipona comprecipes*, *Nanotrigona testaseicorasis* y *Partamona ssp.* provenientes de colmenas que poseen los apicultores de la región.

El análisis de compuestos volátiles mediante aplicación de nariz electrónica fue realizado utilizando el equipo portátil AIRSENSE ® PEN 3, con 10 sensores MOS, que identifican un compuesto volátil de acuerdo a sus características de composición química (Tabla 2). Dentro de la estandarización se encontraron como condiciones óptimas para la estabilización del headspace tres gramos de muestra de miel de abejas a 40°C con un flujo de análisis en la nariz electrónica de 60 ml/min.

Los perfiles aromáticos fueron clasificados y diferenciados mediante el uso de herramientas estadísticas multivariadas como la técnica de análisis de discriminante lineal.

Tabla 2. Compuestos químicos detectados por cada uno de los diferentes sensores de la AIRSENSE® PEN 3. (Pearce *et al*, 2003))

Numero Arreglo Sensor	Nombre del Sensor	Compuestos químicos detectados
1	W1C	Compuestos aromáticos
2	W5S	Amplio rango de compuestos
3	W3C	Compuestos aromáticos. Amoniac
4	W6S	Principalmente hidrógeno
5	W5C	Alcanos, compuestos aromaticos, compuestos menos polares
6	W1S	Amplio rango-metano
7	W1W	Reacciona con compuestos azufrados. Terpenos
8	W2S	Detecta alcoholes. Amplio rango
9	W2W	Compuestos aromáticos. Compuestos orgánicos
10	W3S	Metano

Mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) se determinó el contenido de glucosa y fructosa presente en las muestras de miel. Cada ensayo se realizó por triplicado para garantizar la confiabilidad de los resultados. Se dispuso de un equipo Cromatográfico marca JASCO®, con una Bomba JASCO PU-980, un Horno JASCO CO-2065, un Detector de índice de refracción JASCO RI-2031 PLUS y Software Borwin 1.21.60 versión 1996.

Para la determinación de los carbohidratos fructosa y glucosa, se utilizó una columna de intercambio iónico Metacarb Ca Plus (A5205). Dimensiones: 30 cm x 0,78 cm, con una fase móvil de agua desgasificada – deionizada, grado HPLC, con un flujo de eluyente de 0.5 ml/min, operando a una temperatura de 78°C, consistente con los métodos 979.23 y 983.22 recomendados por la Association of Analytical Communities. (A.O.A.C., 1998). El tiempo de retención de glucosa es de 11,37 minutos y el de fructosa de 14,20 minutos.

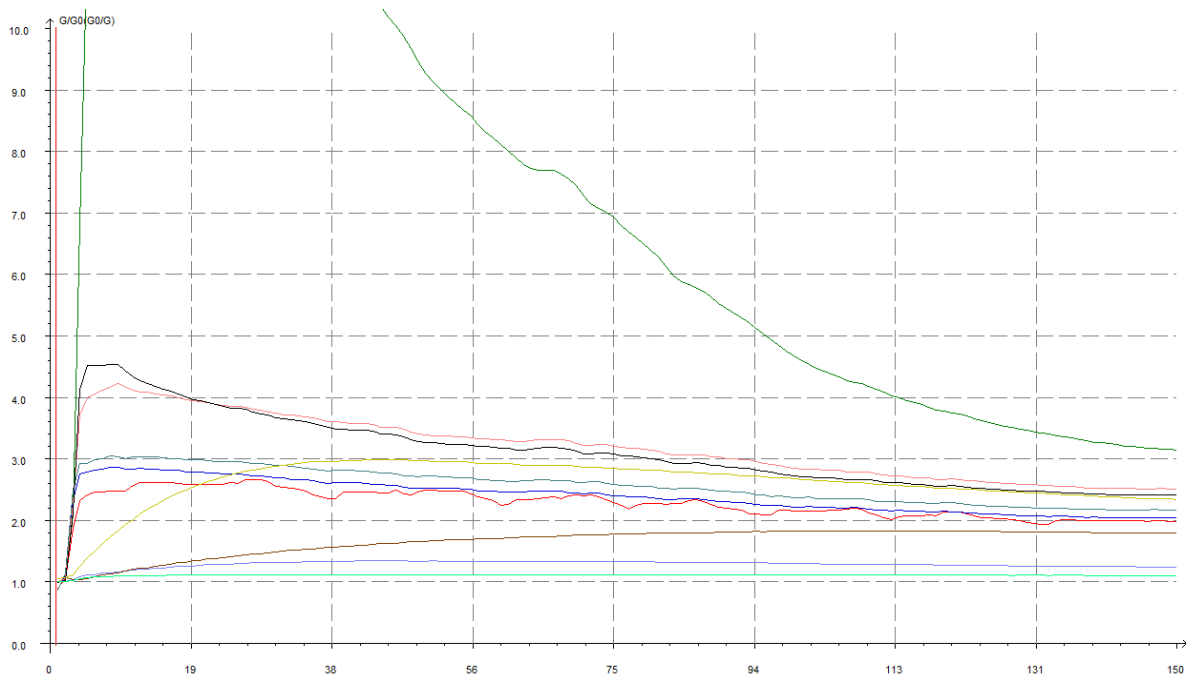
Resultados

Análisis de compuestos volátiles por nariz electrónica

Al realizar un análisis de los tipos de mieles de abejas nativas y la especie *Apis mellifera* se buscaba lograr diferenciar claramente estos dos tipos de mieles, un sin número de compuestos volátiles fueron detectados, pero solo sus características, concentración y relación lograron permitir una clara y evidente clasificación empleando métodos de análisis multivariable.

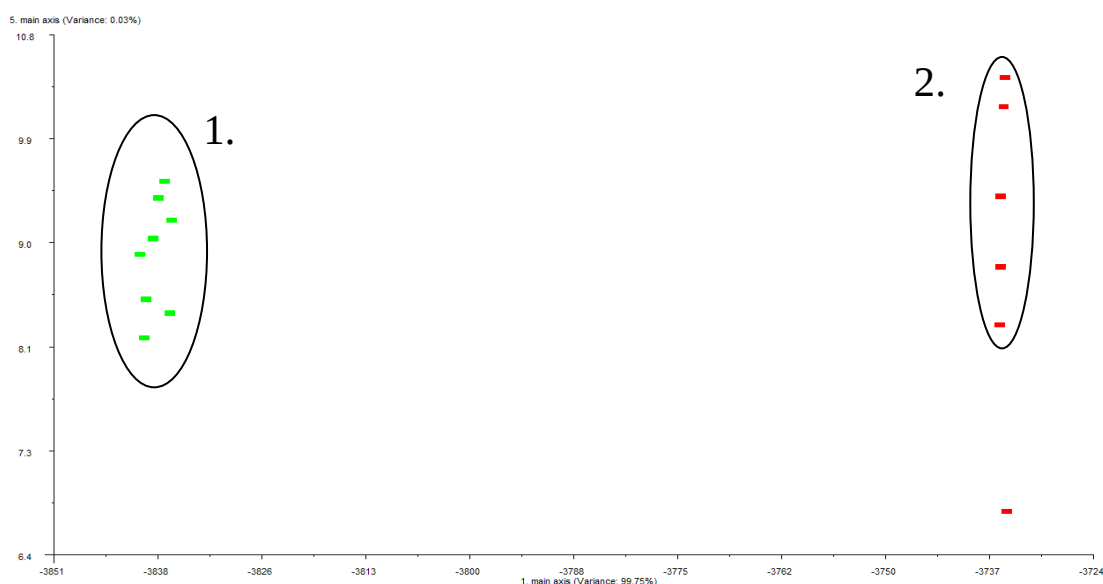
Los resultados de cada uno de los diez diferentes sensores se obtuvieron a un tiempo de 149 segundos. Con base en la figura 2, se puede apreciar que los compuestos predominantes en las muestras de mieles nativas son compuestos aromáticos (Sensor W5C), los cuales son los responsables del aroma frutal característico de este tipo de productos, mientras los sensores que menor respuesta mostraron fueron W3S (Metano), W3C (Amoniaco) y W1W (compuestos azufrados).

Figura 2. Respuesta de los 10 sensores AIRSENSE PEN 3. (Sensores: W1C, W5S, W3C, W6C, W5C, W1S, W1W, W2S, W2W Y W3S)



Dichos resultados fueron examinados mediante análisis de componentes principales, esta herramienta estadística multivariable arrojó los resultados mostrados en la figura 3, en donde los puntos rojos indican las muestras de mieles nativas y los puntos verdes las muestras de miel de abejas de la especie *Apis mellifera*. El análisis discriminante lineal, con una varianza en el eje principal 1 (X) de 99,75% y en el eje principal 2 (Y) de 0,03%, permite observar que las huellas olfativas de las diferentes muestras de miel crean patrones de reconocimiento claramente distinguibles, separando así las muestras de mieles nativas de las de la especie *Apis mellifera*, evidenciándose las diferencias en el contenido y proporción de compuestos volátiles presentes en ellas.

Figura 3. Resultados análisis del análisis discriminante lineal en diferentes muestras de miel de abejas de la región de Santander.



1. Muestras de miel de abejas nativas, 2. Muestras de miel especie *Apis mellifera*

Análisis de carbohidratos por HPLC

Los resultados de los análisis de miel de la especie *Apis mellifera* y de abejas nativas se muestra en las tablas 3 y 4 respectivamente.

Al comparar los resultados obtenidos del contenido de carbohidratos como porcentaje glucosa y porcentaje de fructosa en muestras de miel de abejas de la especie *Apis mellifera* se puede apreciar que los valores promedios en el contenido de fructosa se

encuentran en el orden de un 38% y glucosa cerca del 30% en todos los casos independiente de la región evaluada, pero al comparar estos valores con el contenido de carbohidratos encontrado en muestras de abejas nativas se aprecia que el contenido de glucosa como de fructosa es menor en las mieles recolectadas de abejas nativas. Igualmente, se puede apreciar que el contenido de fructosa y glucosa es variable de acuerdo a la especie, en las cuales las del género *Melipona*, aparentemente presentan un contenido superior a las especies *Tetragonisca* y *Nanotrigona*, lo cual debe ser corroborado mediante la realización de muestreos complementarios

Tabla 3. Resultados del análisis por HPLC de las muestras de abejas *Apis mellifera* de cuatro regiones de Colombia

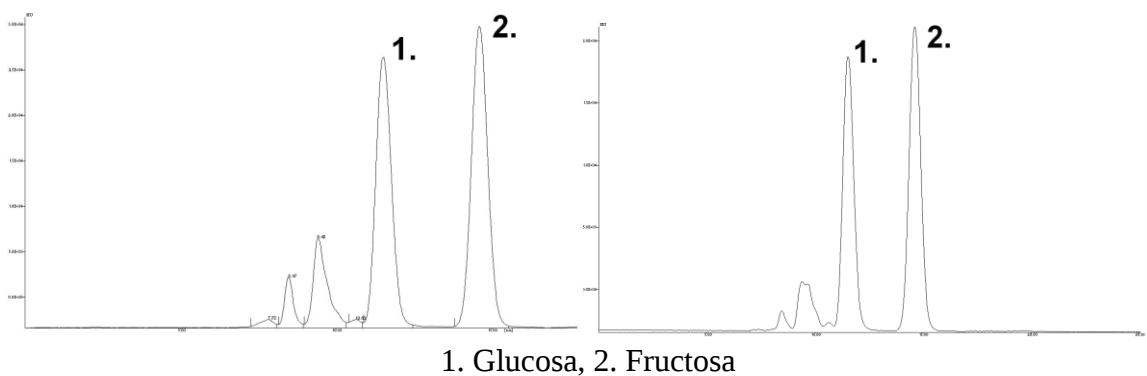
Número muestra	Región Origen	Fructosa (%)	Desviación estándar	Glucosa (%)	Desviación estándar
M005	Santander	37,78	0,84	28,21	0,78
M006	Santander	39,44	0,72	30,55	0,63
M007	Santander	37,16	0,15	22,26	0,33
M008	Santander	40,62	0,03	29,27	0,05
M002	Santa Marta	38,89	0,59	29,05	0,50
M003	Santa Marta	39,05	0,13	29,74	0,19
M004	Santa Marta	38,76	1,00	29,78	1,11
M015	Santa Marta	38,59	0,65	29,03	0,51
M016	Santa Marta	38,41	0,12	31,10	0,26
M017	Cundinamarca	38,41	0,31	29,55	0,88
M018	Cundinamarca	36,82	0,93	30,31	1,36
M019	Cundinamarca	34,65	0,21	32,60	0,34
M022	Cundinamarca	35,56	0,91	26,07	0,95
M023	Boyacá	36,26	1,16	26,67	0,26
M024	Boyacá	35,36	0,87	30,48	0,86
M025	Boyacá	38,53	0,28	28,66	0,21
M026	Boyacá	38,76	0,26	25,95	0,64
M051	Boyacá	39,48	0,62	29,97	0,64

Tabla 4. Resultados del análisis por HPLC de las muestras de abejas nativas de la región de Santander

Número muestra	Especie	Fructosa (%)	Desviación estándar	Glucosa (%)	Desviación estándar
M062	<i>Tetragonisca angustula</i>	34,34	0,694	24,64	0,638
M063	<i>Tetragonisca angustula</i>	32,69	0,767	23,90	0,726
M064	<i>Tetragonisca angustula</i>	20,37	1,185	20,37	1,185
M070	<i>Tetragonisca angustula</i>	25,82	1,891	19,36	1,001
M071	<i>Mellipona fasciata</i>	31,3	1,307	25,25	0,218
M073	<i>Mellipona fasciata</i>	33,29	0,606	26,18	1,311
M072	<i>Mellipona comprecipes</i>	40,52	-	35,22	-
M069	<i>Mellipona comprecipes</i>	32,66	0,639	28,59	0,847
M065	<i>Nanotrigona testaseicorasis</i>	23,71	1,159	10,78	1,045
M068	<i>Partamona ssp.</i>	25,28	0,861	6,88	0,343

En la figura 4 se observa la presencia en el perfil cromatográfico de otros carbohidratos que pueden ser disacáridos o trisacáridos presentes en estas mieles nativas; lo cual muestra la importancia de poder realizar una caracterización de los mismos, teniendo en cuenta que podrían ser datos de alto impacto, considerando que estudios de este tipo en mieles nativas no se encuentran hasta el momento.

Figura 4. Cromatogramas de una muestra de *Apis mellifera* (izquierda) y miel de abejas nativas (derecha) provenientes de la región de Santander.



Conclusiones

Las mieles de abejas nativas de las diferentes especies estudiadas de la región de Santander presentaron porcentajes de fructosa y glucosa inferiores a las muestras de mieles de abejas de la especie *apis mellifera* muestreadas de cuatro regiones de Colombia. El estudio de compuestos volátiles con la utilización de una nariz electrónica permitió diferenciar, mediante análisis multivariado, las muestras de miel de especies nativas con la especie *Apis mellifera*.

Estos resultados son de gran importancia ya que la clasificación de diferentes tipos de miel de abejas es posible gracias a las características distintivas que presenta cada muestra, lo que otorga una identificación única que posteriormente permitirá diferenciar geográficamente mieles de acuerdo a su origen.

Referencias Bibliográficas.

Association of Analytical Communities - AOAC. (1998) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16th Edition. Maryland, USA

Benedetti, S.; Mannino, S.; Sabatini, A. G.; Marcazzan, G. L. (2004) Electronic nose and neural network use for the classification of honey *Apidologie* 35:397-402

Bogdanov, S.; Ruoff, K.; Persano, L. (2004) Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review *Apidologie* 35:4-17

Durán, C. M. (2005) Diseño y utilización de los subsistemas de un sistema de olfato electrónico para aplicaciones agroalimentarias e industriales. Tesis Doctoral. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, España.

Hernández, O.M.; Fraga, J.M.; Jiménez A.I.; Jiménez J.; Arias J.J. (2005) Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry *Food Chemistry* 93: 449-458

Martínez, T. (2006) Diagnóstico de la actividad apícola y de la crianza de abejas en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - Dirección de Cadenas Productivas Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA. Bogotá, Colombia.

Nates-Parra, G. (2001) Guía para la cría y manejo de la abeja angelita o virginita (*Tetragonisca angustula*). III IGER. Convenio Andrés Bello. Colombia

Nates-Parra, G. (2004) Cría y manejo de abejas sin aguijón. Bogotá, Colombia.

Pearce, T.C.; Schiffman, S.S.; Nagle, H.T.; Garner J.W. (2003) Handbook of Machine Olfaction. Wiley. Weinheim, Alemania.

Vanneste, E.; Geise, H. J. (2003) Commercial electronic nose instruments. En: Pearce, T. C., Schiffman, S. S., Nagel, H. T. and Gardner, J. W. (eds.) Handbook of Machine olfaction. Wiley-VCH: Weinheim, Alemania.

Wilkins, W.F.; Hatman, A.D. (1964) An electronic analog for the olfactory processes. Ann. NY Acad. Sci., USA.

Zhang, H. Using electronic noses to assess food quality. (2003) En: Tothill, I. E. (ed.) Rapid On-line instrumentation for food quality assurance. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, Inglaterra.