

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS, METALES Y SU EFECTO SOBRE EL POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y TÓXICO EN MIELES PROCEDENTE DE LA ESPECIE *Apis mellifera*

Sosa Martínez Rafael, Tenori Borroto Esvieta, Marrero Chang Osmany, Aguila Jimenez Edisleidy, Camacho Bordon Sinay, Mórales Montero Armando.

Grupo de Toxicología. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central. Santa Clara. Cuba.
E-mail: rsosa@uclv.edu.cu

Introducción

El creciente interés en los compuestos polifenólicos de origen vegetal se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica en especial su capacidad para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos (Benthath, Rusznyak y Sent., 1996). El mecanismo antioxidante esta vinculado con las potencialidades de unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos de transición, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres (Saskia, van y Bast, 1998). Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en diferentes patologías patologías.

Actualmente entre otros factores los producidos por el cambio climático condicionan una serie de efectos negativos sobre la especie humana mediados por la generación de radicales libres. Existe tanto la protección endógena (Ames *et al.*, 1993), como la incorporación de productos naturales capaces de actuar contra estas especies (Manach, Scalbert, Morand, Révész, y Jiménez, 2004).

Una estrategia para contribuir a disminuir el daño provocado por estas especies y que permite mejorar la calidad de vida, es sin duda la incorporación de miel rica en polifenoles capaces de producir actividad antioxidante (Aljadi y Kamaruddin, 2004; Al-Mamari, Al-Meeri, y Al-Habori, 2002).

Objetivos

1. Determinar el contenido de compuestos polifenolicos y flavonoides totales mediante técnica espectrofotométrica UV-visible en base ácido gálico y luteolina en mieles procedentes de la especie *Apis mellifera*
2. Evaluar el potencial antioxidante en mieles procedentes de la especie *Apis mellifera*.

Materiales y Métodos

Mieles

Las muestras de mieles fueron recolectadas en el 2008 y proceden de diferentes apiarios y latitudes de la región central de la provincia de Villa Clara. Cuba. Las muestras no han sido sometidas a tratamiento térmico ni pasteurización y fueron almacenadas a la oscuridad y temperatura ambiente para minimizar posibles alteraciones.

Extracción de compuestos fenólicos y flavonoides totales

Se pesan 0.1 g de muestra de miel se pasa a un tubo de ensayo con tapa y se extrae con 1 ml de metanol absoluto, la mezcla es centrifuga 13000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se transfiere a un matraz de 10 ml y se diluye con agua destilada y desionizada.

Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenolicos totales fue evaluado utilizando el método fotocolorimetrico descrito por (Singleton, y Rossi, 1965). Se transfiere 1ml de la solución anterior a un matraz de 25 ml l se diluye con agua destilada y desionizada, se añade 1 ml de reactivo Folin & Ciocalteu's, se agita 5 minutos. Se añade 10 ml de Na₂CO₃ 7 %, se agita de nuevo y se mantiene durante 90 minutos a 23 °C. Se determinó la absorbancia a 275 nm.

Determinación de compuestos flavonoides totales

Para conocer el contenido de compuestos flavonoides totales se utilizó el método fotocolorimetrico descrito por (Zhishen, Mengcheng y Jianming, 1999). Se transfiere 1ml de la solución anterior a matraz de 10 ml l se diluyó con agua destilada y desionizada, se añadió 0.3 ml de NaNO₂ 5 %, se agitó la mezcla 5 minutos. Se añadió 0.3 ml de ALCL₃ 10 %, se esperó 6 minutos. Se añadió 2 ml de NaOH 1 M, se completó la solución con agua destilada y desionizada, se determinó la absorbancia a 510 nm.

Se cuantificaron los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides totales mediante los modelos matemáticos obtenidos mediante los modelos matemáticos obtenidos en las curva de calibración.

Determinación del potencial antioxidante

Se determinó el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos totales mediante ensayo reportado por (Emmons, Peterson y Paul, 1999), con algunas modificaciones. Se pesaron 5 mg de β-caroteno, se transfirieron a un matraz de 50 ml, se diluyó con cloroformo, se mezclaron 3 ml de esta solución con 40 mg de ácido linoleico y 400 mg de tween 40 en un matraz de 100 ml. El cloroformo se eliminó mediante flujo de nitrógeno gaseoso. Inmediatamente se adicionó agua destilada y desionizada hasta completar el volumen, se agitó durante 5 minutos. Se mezclaron 3 ml de la emulsión (β-caroteno/ ácido linoleico) con 50 µl de solución de miel (10 µg/ml), se incubó la mezcla 60 minutos. Leer absorbancia a 470 nm y blanco como referencia.

Calculos:

$$Potencial\ antioxidant = 100 \left(\frac{VD_C - VD_M}{VD_C} \right)$$

Donde VD_C es la velocidad de degradación del control, VD_M es la velocidad de degradación de la muestra.

Caracterización de elementos traza

Para la obtención de los elementos traza, se partió de la técnica de análisis por espectrometría de absorción atómica, adaptando el método basado en la destrucción de la materia orgánica, digestión húmeda ácida (“wetashing”). Los elementos a analizar y sus respectivas longitudes de onda fueron: Ca (237,312 nm), Mg (228,802 nm), Zn (206,200 nm), Cu (224,700 nm) y Fe (259,940 nm). Para realizar las curvas de calibración para los elementos se utilizó el sistema estándar multielementos. marca Merck.

Evaluación de la irritabilidad oftálmica empleando el ensayo de hemólisis en células rojas de sangre humanos (red blood cell (RBC))

Este método de trabajo permite diferenciar daños sobre la membrana citoplasmática (hemólisis), sobre la proteína y conocer la seguridad de estos productos.

Resultados

Compuestos fenólicos totales

Se detectó la presencia de este grupo de compuestos y los niveles de los mismos fueron relativamente alto, con rangos de valores medios comprendidos entre (6,1 - 44 mg (CEAG) /100 g de miel), donde resalta una relación directa entre el color y niveles de compuestos polifenólicos presentes (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con lo referido por Blasa (2005), la cual encontró valores similares en otra latitud y en condiciones climáticas diferentes.

Evidentemente la presencia de entidades moleculares de diferente naturaleza (ácidos fenólicos, taninos, flavonoides) en las mieles depende de la calidad y diversidad de especies botánicas visitada por las abejas. El incremento del nivel de estos metabolitos en un medio pudieran iniciar un incremento del poder antioxidante Weston, (2000). Sobre este aspecto también pueden tributar otros factores post-cosecha que incluyen, el propio proceso de mejoramiento industrial, el cual puede disminuir, remover y degradar metabolitos relacionados con el potencial biológico y que se encontraban incluidos en las mieles provenientes de los apiarios (Wang *et al.*, 2004).

Compuestos flavonoides totales

Como es de esperar, se detectó la presencia de este subgrupo dentro de los compuestos fenólicos, con rangos de valores medios comprendidos entre (1,17 – 2,39 mg (CEL)/100 g de miel) (Tabla 2), donde al igual que los compuestos fenolicos resalta una relación directa entre el color y niveles de compuestos flavonoides presentes. Por otro lado, es imposible en este estudio diferencial la capacidad de los flavonoides de los compuestos fenólicos para actuar como antioxidantes en el ensayo realizado, por cuanto la miel esta conformada por un pool metabólico que incluye ambos grupos.

Los niveles de compuestos flavonoides detectados en las muestras, se corresponde cuantitativamente pero en menor grado como es lógico que los compuestos fenólicos y

ello pudiera estar en correspondencia también con los resultados del potencial antioxidante encontrado.

Tabla 2; Área de recolección, concentración de compuestos fenólicos^a y flavonoides^b totales en muestras de mieles procedentes de la especie *Apis mellifera*

Muestras	Zona de recolección	Polifenoles totales mg (AGE)/ 100g miel	Flavonoides totales Mg (LE)/100g miel
1	Norte	32,8±0,04	2,26±0,004
2		30,4±0,03	2,39±0,008
3	Sur	33,9±0,01	1,27±0,004
4		44,0±0,05	2,27±0,006
5	Este	34,3±0,05	2,39±0,002
6		25,1±0,01	1,19±0,005
7	Oeste	26,7±0,03	1,39±0,004
8		6,1±0,03	1,17±0,006

^a El contenido de compuestos fenólicos totales fue determinado por el reactivo de Folin-Ciocaltau. Los valores son expresados a través de la media ± desviación estándar.

^b El contenido de compuestos flavonoides por método calorimétrico empleando $AlCl_3$. Los valores son expresados a través de la media ± desviación estándar.

Leyenda: (AGE) Ácido gálico equivalente; (LE) luteolina equivalente

Actividad antioxidante

Al analizar los resultados de las muestras de mieles (**Figura. 2**). Todas presentaron actividad antioxidante, destacándose la muestra 4, 2 y 1, las que mostraron un potencial antioxidante superior al 60 % con respecto al control, mientras que el potencial de las restantes disminuye ligeramente. Estos resultados coincide con (Al-Mamari y Al-Habori, 2002); (Aljadi y Kamaruddin, 2004); (Blasa *et al.*, 2006), los que obtuvieron similares resultados al evaluar mieles de diferentes orígenes botánicos y que concuerdan con el criterio de que este efecto podría ser consecuencia tanto de la concentración como la naturaleza de compuestos fenólicos presentes en las mieles.

Por otra parte, diferentes investigadores han confirmado que el ensayo usando β -caroteno es ampliamente eficaz para evaluar la capacidad antioxidante de productos naturales, ya

que esta estructura es extremadamente susceptible a la oxidación mediada por especies radicales libres. En principio, la decoloración del β - caroteno, es una reacción que ocurre en respuesta a la acción oxidante del ácido linoleico ya que sus dos dobles enlaces son sensibles a la degradación (Unten *et al.*, 1997; Singh *et al* 2002). Estos criterios y asumiendo el hecho de que los efectos negativos de varios factores estresantes sobre la especie humana son mediados por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Blasa *et al.*, 2006), nuestros resultados, al igual que los reportados por (Ames *et al.*, 1993; Manach y Jiménez, 2004), advierten la posibilidad del uso de la miel de abeja como un suplemento de protección exógeno contra la acción destructiva de estas especies química.

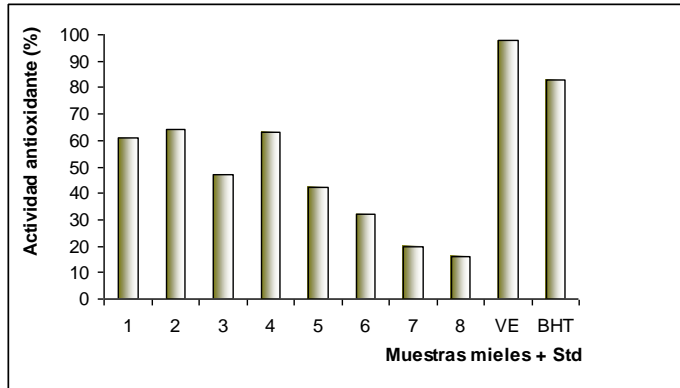


Figura 2: Actividad antioxidante de diferentes muestras de miel procedentes de la especie *Apis mellifera*, colectadas en diferentes puntos geográficos de la región central de Cuba; Alfa- tocoferol (VE) y Butil Hidroxi Tolueno (BHT) son estándares; La concentración de cada muestra para la evaluación fue de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$ para VE y BHT

Presencia de metales.

La capacidad nutritiva de la miel y su acción antioxidante, puede estar comprometida con la composición química. Como alimento debe estar libre de contaminantes inaceptables o contener niveles aceptados sobre todo de metales. Al analizar nuestros resultados, se detectaron niveles de Ca, Mg, Zn, Cu y Fe (Figura 1) en los rangos de 1,811 - 3,229 para el caso del Ca; 1,402 - 3,336, Mg; 0,046 - 0,199, Zn; 0,045 - 0,386 y 1,39 - 3,87 Fe respectivamente. Estos resultados comparados con datos reportados en la literatura son altos en general inclusive para los elementos Zn y Cu que se encuentran en menor cuantía. El contenido de elementos metálicos fue medido posterior a la cosecha y almacenamiento lo cual implicó una serie de operaciones que pudieron comprometer la existencia real de estos contaminantes en muestras vírgenes. Debe tenerse en cuenta, según lo expresado por Saskia (1998), que además de comprobado la capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos, encontró cierta relación entre estos y la presencia de minerales mediados por la capacidad de quelar elementos metálicos de transición como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} entre otros. Aspecto importantísimo en nuestros resultados por cuanto los niveles de hierro (Fe) son

extremadamente altos (Figura 3) y además de comprometer la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, pudiera inducir efectos tóxicos.

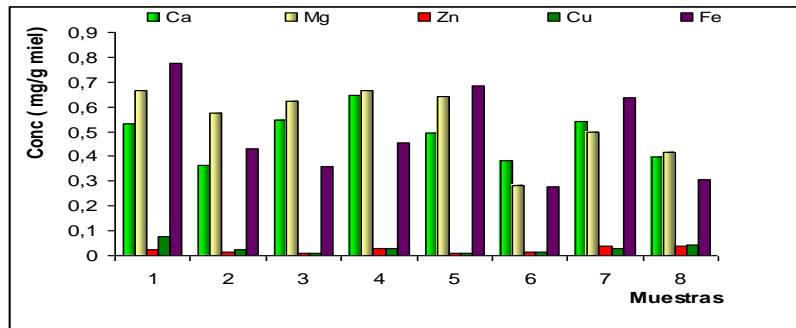


Figura 3: Presencia de elementos metálicos en muestras de miel procedentes de la especie *Apis mellifera*, colectadas en diferentes puntos geográficos de la región central de Cuba.

Evaluación de la irritabilidad oftálmica en células rojas de sangre humanos (red blood cell (RBC))

Las muestras ensayadas, no fueron capaz de provocar % de hemólisis, por lo tanto, resultó imposible poder calcular la concentración hemolítica 50 (CH₅₀). Estos resultados como es de esperar insinúan que aunque existan diferentes niveles de compuestos polifenólicos y presencia de metales, no mostraron ningún efecto de irritabilidad y permite clasificar al producto como no toxico.

Conclusiones

En todas las muestras de mieles se detectaron niveles de compuestos fenólicos totales, responsables del poder antioxidante en los ensayos realizados y dicho potencial esta en proporción directa con los niveles de compuestos fenólicos presentes en las muestras. Por otro lado, La presencia de metales en las diferentes muestras no comprometió la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Por otro lado, se demostró que la presencia de diferentes niveles de compuestos fenolicos y metales no induce efectos tóxicos.

Referencias Bibliografica

1. Aljadi, A. M., & Kamaruddin, M. Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 513–518.
2. Aljadi, A. M., & Kamaruddin, M. Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 513–518.
3. Al-Mamari, M., Al-Meeri, A., & Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22, 1041–1047.

4. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidant, antioxidant, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915–7922.
5. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidant, antioxidant, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915–7922.
6. Benthath A, Rusznyak S y Szent-György A: Vitamin nature of flavona. *Nature*; 798. En: *Flavonoids in Health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, 1996, 5:137-161.
7. Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piera, M., Cristina, M., Piatti, E. (2006). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, 97, 217-222.
8. Emmons, C. L., Peterson, D. M., & Paul, G. L. (1999). Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant 338 S. Kumazawa et al. / *Food Chemistry* 84 (2004) 329–339
9. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Re´me´sý, C., & Jime´nez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
10. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Re´me´sý, C., & Jime´nez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
11. Saskia ABE, van Accker y Bast AALT: Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. En: *Flavonoids in health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, 1998, 9:221-251.
12. Saskia ABE, van Accker y Bast AALT: Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. En: *Flavonoids in health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, 1998, 9:221-251.
13. Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 81–86.
14. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
15. Unten, L., Koketsu, M., & Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on b-carotene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2009–2019.
16. Wang, X.-H., Gheldof, N., & Engeseth, N. J. (2004). Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science*, 69(2), 96–101.
17. Weston, R. J. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, 71, 235–239.
18. Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555–559.