



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ZAMORA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DE LA MIEL Y SU POTENCIAL
COMO CONSERVANTE NATURAL**

TITULACIÓN: GRADO INGENIERÍA AGROALIMENTARIA

ALUMNO: DAVID MARTÍN GARRETAS

TUTORA: ANA MARÍA GONZÁLEZ PARAMAS

DEPARTAMENTO: QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

ÁREA: NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

FECHA DE ADJUDICACIÓN: OCTUBRE 2013

FECHA DE PRESENTACIÓN: FEBRERO 2015

1. Objetivo

En los últimos tiempos y debido a las reticencias por parte de un grupo importante de consumidores sobre el uso de algunos antioxidantes sintéticos se han intensificado las investigaciones para descubrir y utilizar antioxidantes de fuentes naturales, como frutas, verduras, etc.. Entre los alimentos con potencial antioxidante uno de los que más interés han despertado, en los últimos diez años han sido las mieles, no solo por sus propiedades nutritivas o medicinales, sino también por su capacidad antioxidante y su posible utilización como conservante natural.

El objetivo inicial de este proyecto es evaluar la capacidad antioxidante de mieles de diferente orígenes botánicos y valorar la correlación existente entre dicha actividad y su contenido en compuestos fenólicos. Posteriormente, aquellas mieles que presenten una mayor capacidad serán utilizadas para valorar su posible uso como conservante natural para evitar el pardeamiento enzimático en puré de manzanas y también se realizará este método en una miel que presente una menor capacidad antioxidante para ver si hay correlación entre la capacidad antioxidante y la capacidad de la miel para inhibir el pardeamiento enzimático en los purés de frutas.

2. Introducción

Se define la miel como la sustancia natural dulce producida por las abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de la planta o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de las plantas, que las abejas recolectan, transportan, transforman, combinan con otras sustancias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que maduren. (Directiva 2001/110/CE).). En función del origen botánico de las mieles podemos hablar de miel de flores o mil flores, aquellas cuyo componente fundamental es el néctar, y miel de mielada que son las obtenidas principalmente de secreciones de partes vivas de las plantas.

El principal componente de la miel lo constituyen los hidratos de carbono sencillos (azúcares), mayoritariamente glucosa y fructosa. También contiene agua (tercer componente mayoritario), ácidos, enzimas, minerales y vitaminas.

Los compuestos fenólicos de la miel representan el grupo más importante entre los compuestos minoritarios de la miel. Su contenido varía en función del origen floral y geográfico de la miel. Los compuestos fenólicos que se encuentran en la miel son: fenoles libres (ácidos volátiles), ácidos fenólicos, polifenoles (por lo general en forma

de flavonoides) y pigmentos (1). En general el contenido de fenoles es mayor en mieles oscuras. Varios autores han demostrado que el contenido de fenoles totales está fuertemente correlacionada con capacidad antioxidante.

Un antioxidante es un compuesto químico que hallándose en pequeñas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (2). En el caso de la miel la capacidad antioxidante es la habilidad que tienen algunas mieles para contrarrestar la cantidad de reacciones oxidativas que pueden ocurrir en la naturaleza, éstas pueden producir efectos perjudiciales tanto en los alimentos como en el organismo, donde contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas. Los principales componentes de la actividad antioxidante de las mieles son los compuestos fenólicos. Sin embargo, la capacidad antioxidante varía en gran medida según el origen botánico de la miel, otros factores como la elaboración, manipulación y almacenamiento de las mieles afecta a la capacidad antioxidante en menor grado. La acción antioxidante de los flavonoides se basa en sus propiedades como donadores de electrones o hidrógenos. Los flavonoides son antioxidantes capaces de donar hidrógeno a través de sus grupos hidroxilos para inactivar a un radical libre, generando a su vez un radical fenoxilo, estable por deslocalización del electrón en su estructura. La capacidad de los flavonoides para actuar como antioxidantes por donación de electrones depende directamente del potencial de reducción de sus radicales e inversamente de la reactividad de las moléculas de flavonoides con oxígeno.

El pardeamiento enzimático es una alteración química, aunque de naturaleza enzimática en sus primeras etapas que tiene como sustratos a los compuestos fenólicos que se transforman en estructuras poliméricas con coloraciones pardas como consecuencia de la actividad principalmente de los sistemas enzimáticos polifenoloxidasas. Para que se produzca el pardeamiento enzimático hacen falta que concurren tres factores esenciales (3): Presencia de sustratos fenólicos, sistema enzimático activo y presencia de oxígeno. Los diferentes métodos desarrollados para controlar, minimizar o inhibir el proceso de pardeamiento enzimático suele ser preventivos. Se clasifican en métodos químicos (EDTA, ClNa, etc.), métodos físicos (T°, atmósfera modificada, etc.) y métodos enzimáticos (Catalasas).

3. Materiales y métodos

Este trabajo se ha llevado a cabo utilizando seis muestras de mieles de origen botánico certificado (romero, azahar, eucalipto, tomillo, castaño, roble) fueron facilitadas por el

Dr. José Sánchez de la universidad de Salamanca, mientras que la miel comercial, así como las manzanas, fueron obtenidas en un supermercado de la zona.

3.1 FRAP

El procedimiento seguido ha sido el descrito por (4) y se basa en la reducción a ferroso a pH bajo el complejo Férrico-tripiridiltrizaina (Fe^{3+} -TPTZ) de coloración amarilla por acción del antioxidante (miel). Esta reacción produce un color azul intenso medido a una longitud de onda de $\lambda=593$ nm. Se realiza una recta de calibrado TROLOX (antioxidante estándar), a través del cual se evaluó la capacidad antioxidante de las muestra de miel, el resultado final se expresa en μmoles de Trolox equivalentes/ g de muestra.

3.2 ABTS^{•+}

El procedimiento seguido ha sido descrito por (5). Se basa en la capacidad de los antioxidantes para atrapar radicales libres presentes en el medio, en este caso el radical catión $\text{ABTS}^{•+}$. En primer lugar es necesario formar el radical coloreado in situ. Dicho radical se genera a partir del precursor ABTS, por acción de un sistema enzimático formado por peroxidasa y agua oxigenada. Después se añade el antioxidante y se mide el descenso de absorbancia, monitorizado a una $\lambda=414$ nm, producido por la captación de dicho radical por parte del antioxidante. Al igual que en el caso anterior, fue necesario realizar diariamente una recta de calibrado TROLOX que permitió evaluar la capacidad antioxidante de la muestra, el resultado final se expreso en μmoles de Trolox equivalentes/ g muestra.

3.3 Fenoles Totales

El cálculo de los fenoles totales se realizo por el método de folin-ciocalteu que es una modificación de (6). El conjunto de compuestos fenólicos presentes en la miel se oxidan por el reactivo folin-ciocalteu, el cual, a su vez se reduce por la acción de los fenoles. Dicha reacción da una coloración azul que puede medirse a una λ de 760 nm. Lo primero que se realizó fue una recta de calibrado utilizando como patrón ácido gálico ($R^2=0.995$), se realizó un procedimiento similar con las muestras expresándose el resultado final en mg equivalentes de ácido gálico/ g de muestra.

3.4 Inhibición del pardeamiento enzimático

El procedimiento seguido fue similar al descrito por (7) con ligeras modificaciones. Se prepararon 3 muestras de puré de manzana a las que se añadían un 2 % de las mieles, una cuarta muestra se preparo añadiendo un 1 % de ácido ascórbico y paralelamente se

preparo un control (+) se pone solamente el puré de manzana y un control (-) donde se lleva a ebullición el puré de manzana para inhibir totalmente la PPO. A continuación las muestras se dejan incubar durante 1 hora. Se le añade 20 ml de metanol acuoso (1:1), se centrifugan a 8000 r.p.m., se filtran las muestras y se determina la absorbancia a una $\lambda=420$. El resultado se expresa en porcentaje de inhibición del pardeamiento enzimático (considerando el 100% de inhibición la absorbancia obtenida en el control negativo).

3.5 Tratamiento estadístico

El análisis estadístico se ha llevado a cabo utilizando el programa SPSS versión 22. Para comprobar si había diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los diferentes parámetros analizados se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor teniendo en cuenta las diferencias entre las medias de los grupos de mieles a un nivel de significación del 5% ($p<0.05$).

4 Resultados y discusión

4.1 Capacidad antioxidante de la miel

En la tabla I quedan reflejados los datos obtenidos en la evaluación de la capacidad antioxidante (media \pm desviación estándar de las tres repeticiones) de las siete muestras de miel analizadas, tanto por el método FRAP, como por el método ABTS⁺⁺, expresados en μ moles de Trolox equivalentes/ g de muestra

Tabla I Datos de la capacidad antioxidante de las mieles (μ moles de trolox/ g de muestra)

Mieles	FRAP	ABTS ⁺⁺
Comercial	0.76 \pm 0.08	0.55 \pm 0.07
Romero	0.07 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01
Azahar	0.14 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01
Eucalipto	0.21 \pm 0.03	0.26 \pm 0.01
Tomillo	0.89 \pm 0.03	0.92 \pm 0.03
Castaño	1.51 \pm 0.05	0.98 \pm 0.03
Roble	3.01 \pm 0.24	2.73 \pm 0.49

Como se puede observar, los valores del FRAP oscilaban entre los 0.07 μ moles de Trolox/g de la miel de romero (mono-floral), hasta los 3.01 μ moles de trolox/ g de la miel de roble (miel de mielada), siendo estos ligeramente superiores a los obtenidos por el método ABTS⁺⁺ aunque ambos métodos siguen la misma tendencia, ya que, la capacidad antioxidante de las mieles va

aumentando en función del color y del origen botánico, parámetros que a su vez están relacionados con el contenido fenólico de las mieles. También se observa que los análisis realizados en la miel comercial (miel de milflores), presenta valores intermedios en ambos métodos respecto al resto de las muestras de mieles comerciales.

Cabe destacar que solo las mieles de castaño y de roble tienen una actividad superior al trolox 1 mM que es el patrón que se suele considerar a efectos de comparación. Los resultados obtenidos en este estudio van acordes con otros estudios realizados en mieles españolas (8), checas (9), portuguesas (10) y eslovenas (11). Tan sólo (12), evaluaron la capacidad antioxidante de siete muestras de mieles italianas dando resultados superiores en la miel de madroño (mono-floral) que las mieles de mielada.

En la figura I, podemos ver de forma grafica la relación entre los dos métodos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de las mieles.

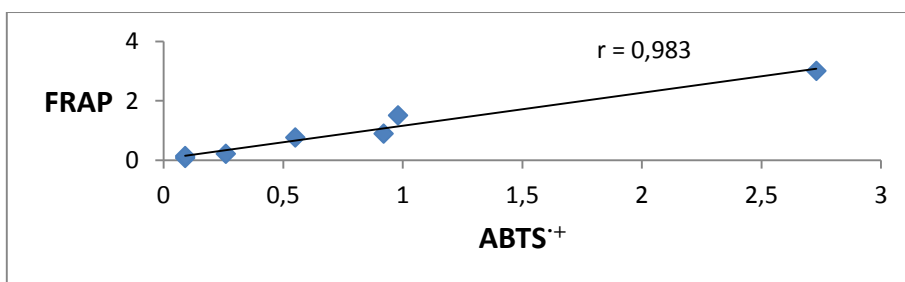


Ilustración I: Relación entre el método FRAP y el método ABTS⁺⁺

El índice de relación de pearson entre el método FRAP y el método ABTS⁺⁺ para este estudio fue ($r=0.983$), similar al obtenido en los estudios de (9) para mieles checas ($r_{\text{FRAP/ABTS}}=0.937$). Este índice, sin embargo, es superior al descrito por (13) para mieles portuguesas $r_{\text{FRAP/DPPH}}=0.747$.

Cuando se hace el estudio estadístico ANOVA de un factor se establecen 4 grupos diferenciados en el método FRAP y 3 en el ABTS. En el caso del FRAP un primer grupo lo constituyen las mieles de romero, azahar y eucalipto, un segundo grupo que engloba a las mieles comercial y de tomillo y las mieles de castaño y roble (grupos 3 y 4) que son distintas a todas las demás y distintas entre sí. Cuando lo que se compara son los resultados obtenidos en el método ABTS, los tres grupos están constituidos por las mieles de romero, azahar, eucalipto y comercial (grupo 1), comercial tomillo y castaño (grupo 2) y el roble (grupo 3).

4.2 Fenoles totales en la miel

Otro de los parámetros que se evaluó en las mieles fue el contenido total de compuestos fenólicos, con el objetivo de ver si había una correlación entre este parámetro con la capacidad antioxidante. En la tabla II se muestran los datos de los compuestos fenólicos totales (media \pm desviación estándar de tres repeticiones) de las siete muestras de miel expresados en mg de ácido gálico/ g de la muestra.

Tabla II: Valores de compuestos fenólicos (mg AG/ g)

mieles	mg de AG/g de miel
Comercial	0.58±0.01
Romero	0.33±0.01
Azahar	0.33±0.01
Eucalipto	0.88±0.02
Tomillo	1.74±0.01
Castaño	2.49±0.02
Roble	2.77±0.01

Como se puede observar el contenido en compuestos fenólicos oscilaba entre los 0.33 mg AG/g de la miel de romero a 2.77 mg AG/ g de la miel de roble. El contenido fenólico de las mieles fue aumentando en función del color, mieles oscuras> mieles claras; el orden fue romero<azahar<eucalipto<tomillo<castaño<roble. Estos resultados son acordes a los descritos para mieles españolas (8), portuguesas (13), checas (9) y eslovenas (11).

En todos los estudios señalados los polifenoles totales aumentaban en función del color de las mieles y del origen botánico, y mieles con un alto contenido en fenoles presentaban una mayor capacidad antioxidante. Tan sólo en el estudio de (12) comentado anteriormente se describen datos contradictorios al resto de los estudios, puesto que, según estos autores la miel de madroño (monofloral) presenta una cantidad mayor de compuestos fenólicos que las mieles de mielada.

En el Figura II se muestra la relación entre la capacidad antioxidante y los polifenoles totales de las diferentes mieles.

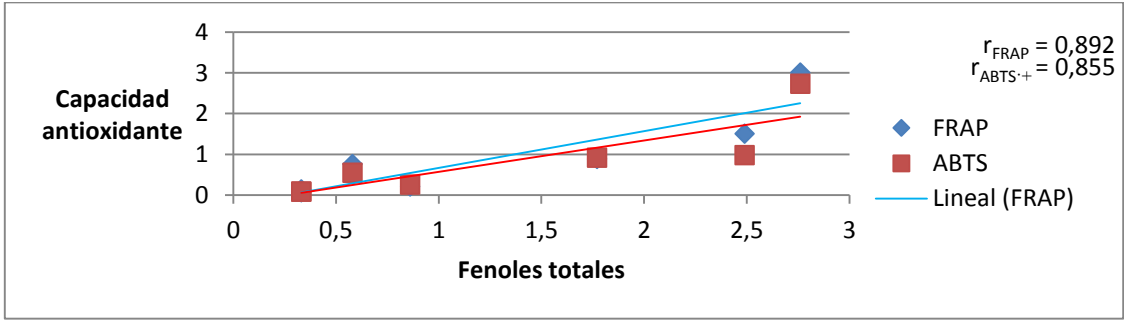


Figura 1: Relación de la capacidad antioxidante y los fenoles totales

El coeficiente de correlación de pearson para la capacidad antioxidante y los fenoles totales fue para el método FRAP ($r=0.892$) y para el método ABTS⁺ ($r=0.855$). Estos valores fueron superiores a los obtenidos por otros autores, (13) para mieles portuguesas ($r_{DPPH/PT}= 0.831$) y ($r_{FRAP/PT}=0.818$); (9) checas ($r_{FRAP/PT}= 0.852$).

Sin embargo, los datos obtenidos en nuestro estudio sobre la relación del contenido en fenoles y la capacidad antioxidante fue inferior al obtenido, (12) italianas ($r_{FRAP/PT}= 0.9636$) y ($r_{ABTS/PT}= 0.8920$); (11) eslovacas ($r_{FRAP/PT}= 0.966$) y ($r_{DHHP/PT}= 0.932$).

Cuando se hace el estudio estadístico ANOVA, para los fenoles totales todas las mieles son diferentes unas de otras excepto las mieles de romero y azahar que se pueden agrupar en un mismo conjunto, en el análisis se obtienen 6 grupos diferenciados. El primer grupo lo forman la miel de tomillo y azahar y los otros 5 grupos para cada una de las mieles analizadas.

4.3 Inhibición del pardeamiento enzimático

El estudio de la inhibición del pardeamiento enzimático en purés de manzana se realizó con tres muestras de miel (eucalipto, castaño y roble). Paralelamente se preparó una cuarta muestra, a la que se adicionó como conservante ácido ascórbico, uno de los compuestos químicos que más se usan en la industria alimentaria para la inhibición del pardeamiento enzimático, para poder comparar la eficacia de la miel en la inhibición del pardeamiento frente al ácido ascórbico.

En la tabla III se muestran los valores obtenidos para cada una de las muestras de miel y la muestra de ácido ascórbico expresados en % de inhibición (media \pm desviación estándar de las dos repeticiones) del pardeamiento de la muestra.

Tabla III: % de inhibición del pardeamiento en puré de manzanas

Tipo de mieles	% inhibición del pardeamiento
AA	163.3 \pm 23.6
Eucalipto	-87.5 \pm 9.1
Castaño	-6.4 \pm 25.1
Roble	23.8 \pm 12.6

Como podemos observar en la tabla III solo la miel de roble ha conseguido inhibir el pardeamiento enzimático en puré de manzana en un 23.8 %.

En uno de los dos ensayos realizados en la miel de Castaño se obtuvo un resultado positivo respecto a la inhibición del pardeamiento enzimático, 11.38. Por lo tanto, habría que considerar que este tipo de miel también podría ser utilizado para prevenir el pardeamiento enzimático en purés de manzana.

Los resultados obtenidos para las mieles de mielada en nuestro estudio fueron similares a los descritos por (14), pero fueron inferiores para las mieles florales. Los resultados obtenidos en nuestro estudio fueron inferiores a los descritos por (7) y (15) tanto para las mieles de mielada como para las mieles florales.

A pesar de que con la utilización de mieles de mielada se consigue inhibir el pardeamiento enzimático de purés de manzana, su eficacia como conservante natural en este campo está muy alejada de otros conservantes como por ejemplo, el ácido ascórbico que como vemos en la tabla III tienen un porcentaje de inhibición del

pardeamiento bastante alto (163.3 %). En la tabla IV se muestran los coeficientes relación de pearson entre los diferentes parámetros analizados en las mieles con el porcentaje de inhibición del pardeamiento enzimático en puré de manzanas.

Tabla IV: Coeficiente de relación de pearson

	% inhib	PT	ABTS ⁺⁺	FRAP
FRAP	0,960	0,892	0,983	
ABTS ⁺⁺	0,902	0,855		
PT	0,991			

El coeficiente de correlación entre los polifenoles totales y el % de inhibición enzimática ($r= 0.991$) fue superior al señalado por (7)

donde describieron una correlación de ($r= 0.347$).

5. Conclusión

Una vez analizados los resultados de este estudio se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. Respecto a la capacidad antioxidante y polifenoles totales de las mieles
 - No se encuentran diferencias significativas entre los dos métodos empleados para medir la capacidad antioxidante. Aunque los valores varían en función del método que se utilice, la capacidad antioxidante de las mieles por ambos métodos siguen la misma tendencia.
 - Tanto el método FRAP como el método ABTS⁺⁺ se pueden considerar métodos válidos para determinar la capacidad antioxidante de la miel y se obtiene un adecuado coeficiente de correlación entre ambos métodos.
 - Tanto la actividad antioxidante de las mieles como su contenido en polifenoles totales varía en función de su origen botánico. Los grupos significativamente diferentes están correlacionados con el color de las mieles.
 - La miel de roble, la única que puede considerarse estrictamente mielada, es significativamente diferente a todas las demás en todos los parámetros analizados.
 - La correlación positiva que presenta la capacidad antioxidante y el contenido en fenoles totales ($r=0.892$) evidencia la capacidad que tiene esta familia de compuestos para ejercer una acción antioxidante.

2. Respecto a la Inhibición del pardeamiento enzimático

- De las tres mieles utilizadas sólo las mieles de mielada conseguían inhibir el pardeamiento enzimático en purés de manzana. A pesar de ello, su eficiencia está muy alejada de otros conservantes naturales como el ácido ascórbico, utilizado en este trabajo.
- El porcentaje de inhibición del pardeamiento enzimático en puré de manzanas está relacionado con el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de las mieles, cuanto más elevados sean los valores de estos parámetros más elevado el porcentaje de inhibición enzimática.

6. Bibliografía

- (1) Jasicka-Misiak, I.; Poliwoda, A.; Derén, M. y Kafarski, P. (2012). Food Chemistry. 131, 1149-1156.
- (2) Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1999). 3 Ed. Oxford University Press, New York.
- (3) Bello Gutiérrez, J. (2000). Ed. Díaz de Santos. Catedrático Universidad de Navarra.
- (4) Benzie Iris, F.F. y Strain J.J. (1996). Analytical Biochemistry. 239, 70-76.
- (5) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. y Rice-evans, C. (1999). Free Radical Biology and Medicine. 26, 1231-1237.
- (6) Singleton, V.L. y Rossi, J. Jr. (1966). American Journal of Enology and Viticulture. 16, 144-158.
- (7) Vela, L.; de Lorenzo, C. y Pérez, R.A. (2007). Journal of the Science of food and agriculture. 87, 1069-1075.
- (8) Rodríguez Flores, M.S.; Escuredo, O. y Seijo, M.C. (2015). Food Chemistry. 166, 101-106.
- (9) Lachman, J.; Orsak, M.; Hejtmankova, A. y Kovarova, E. (2010). Food Science and Technology. 43, 52-58.
- (10) Ferreira, I.; Aires, E.; Barreira, J. y Estevinho, L. (2009). Food Chemistry. 114, 1438-1443.
- (11) Bertonecelj, J.; Dobersek, U.; Jamnik, M. y Golob, T. (2007). Food Chemistry. 105, 822-828.
- (12) Rosa, A.; Giovanni Tuberoso, C.I.; Atzeri, A. y Melis, M.P. (2011). Food Chemistry. 129, 1045-1053.
- (13) Alves, A.; Ramos, A.; Margaride Gonsalves, M.; Bernardo, M. y Mendes, B. (2013). Journal of Food Composition and Analysis. 30, 130-138.
- (14) Chen, L.; Mehta, A.; Berembaum, M.; Zangerl, A.R. y Engeseth, N.J. (2000). Journal Agriculture and Food Chemistry. 48, 4997-5000
- (15) Nyawali, B.; Chungo, D.; Chisha-Kasumu, E.; Vinya, R.; Chileshe, F. y Ng'andwe, P. (2014). Food Science and Technology. 1-7.