

CONTENIDO DE FLAVONOIDES Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE MIELES CHILENAS E ÍNDICE ANTIOXIDANTE**Orlando Muñoz*** y **Silvia Copaja**

Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago - Chile

Hernan Speisky

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, El Líbano 5524, Macul - Chile

Raúl C. Peña y Gloria Montenegro

Departamento de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile, Vicuña Mackenna 4860, Santiago-22 - Chile

Recebido em 26/4/06; aceito em 18/10/06; publicado na web em 28/5/07

CONTENT OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS IN CHILEAN HONEYS. ORAC INDEX. A comparison of the phenolic content of several Chilean honeys showed great variations in flavonoid concentration among the samples analysed. Higher amounts of phenolics are found in honey from dry climates. The antioxidant effect of extracts, using ORAC analysis, did not correlate with the flavonoid content or with the total phenolic concentration.

Keywords: honey; antioxidants; Chile.

INTRODUCCIÓN

La miel es una compleja mezcla de carbohidratos y de compuestos minoritarios, producidos en la naturaleza. La miel se produce en casi todos los países del mundo y se considera un importante alimento energético; sin embargo, no se puede considerar como un alimento completo para los estándares nutricionales humanos, sino que constituye más bien un suplemento dietético potencial¹. Los azúcares y el agua representan los componentes químicos principales de la miel (> 95%); entre los primeros, fructosa (38%) y glucosa (31%) son los constituyentes principales. Los azúcares representan la porción más grande de la composición de la miel (95-99% de sólidos de la miel) mientras que las proteínas, aldehydos aromáticos, ácidos carboxílicos aromáticos y sus ésteres, carotenoides degradados, terpenoides, flavonoides y otros contribuyen al sabor de las mieles floral².

La composición química de la miel es dependiente en gran medida de los tipos de flores utilizadas por las abejas, así como también, por las condiciones regionales y climáticas. La cotización de una miel en el mercado internacional esta determinada en gran parte en base a su color, sabor y densidad.

Una amplia gama de constituyentes menores, está presente en la miel, mucho de los cuales se sabe presentan propiedades antioxidantes. En los últimos años, se han descrito una serie creciente de compuestos que demuestran el carácter emergente de su potencial antioxidante³⁻⁵; entre éstos, los compuestos fenólicos los que también contribuyen a exaltar las calidades sensoriales tales como su amargor^{6,7}.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contribuye significativamente a la salud humana. En varios estudios de las mieles europeas, Ferreres y colaboradores⁸ han demostrado que estas tienen un notable perfil fenólico que son aportados por varios ácidos y ésteres orgánicos aromáticos y por las agliconas de flavonoides.

La tipificación de los compuestos fenólicos y de otros químicos en mieles, es de clave significado para mejorar el conocimiento que se tiene de la química de las mieles, particularmente como un

agente antioxidante. Por otra parte, el conocimiento de sus flavonoides y el contenido de los fenólicos en mieles de diversos climas, podría ser no solamente un marcador del origen floral sino también un indicador potencial de su calidad biológica.

La composición y naturaleza de los flavonoides presentes en muestras de miel de diversas áreas geográficas (Europa, Norteamérica, regiones ecuatoriales, Sudamérica, China y Australia) han sido analizadas por HPLC⁹. El estudio mostró los perfiles de flavonoides de muestras de miel de Argentina y Chile y en ella se observó que derivados de flavonoides de polen-néctar son los componentes principales, y que flavonoides de propóleos, también estaban presentes.

La producción promedio anual de miel en Chile durante el periodo 2004 fue de 15000 ton. de estas, se exportaron 13 095 ton. con un retorno promedio de US\$ 22 262 y tan sólo representa el 0,5% del comercio mundial con un consumo medio de 100 g por persona muy por debajo de los 1200 g promedio que consumen países tales como Alemania. En Chile solo hay alrededor de 14000 apicultores con un total de 331 525 apiarios. Esta cifra incluye amplias variedades de mieles a granel, y diferenciadas incluyendo unifloral y polifloral^{10,11}.

Con el objeto de determinar la contribución relativa de los fenoles y de los flavonoides a la actividad antioxidante total de la miel chilena, se estableció una correlación entre el contenido de los compuestos fenólicos y su capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)⁴.

Con esta finalidad se identificaron y cuantificaron los compuestos ya citados en veinte seis mieles producidas en diversas zonas de Chile, y se determinaron las capacidades antioxidantes de algunas de los compuestos y/o de las fracciones (fenólica) aislados (fenoles y flavonoides).

PARTE EXPERIMENTAL**Muestras de miel**

Muestras de miel de diferente origen floral (Tabla 1) se colectaron en diversos lugares (del norte, centro y sur de Chile).

*e-mail: omunoz@uchile.cl

Estas áreas incluyen zonas de clima tipo Mediterráneo, según la clasificación bioclimatológica de Castri y Hajek¹²: árido, semiárido, subhúmedo, húmedo y perhúmedo.

Tabla 1. Resultados ORAC para compuestos fenólicos y flavonoides de mieles chilenas

Muestra	Región	μmol TE/g	Compuestos fenólicos (mg/100 g miel)	flavonoides (mg/100 g miel)
1	IV	5,8	2,83	4,58
2	VI	3,43	6,49	4,3
3	VI	3,04	3,08	4,41
4	VII	5,17	0	5,52
5	VII	2,99	0	7,31
6	VII	4,67	0,55	7,05
7	VII	12,31	2,82	6,22
8	VII	3,46	2,31	5,3
9	VII	2,51	1,76	5,11
10	VII	nd*	0,55	0,01
11	VIII	6,45	0,63	6
12	VIII	2,22	0,91	7,2
13	IX	4,73	1,7	5,06
14	X	2,01	0,36	4,41
15	X	5,25	0,54	4,8
16	X	6,63	0,71	11,5
17	RM**	5,81	0,16	12,5
18	RM	4,81	0,55	10,1
19	RM	1,26	0,11	13,8
20	RM	7,75	0,57	9
21	RM	1,77	8,83	11,9
22	RM	7,83	0,74	9
23	RM	4,72	0,45	9
24	RM	6,46	0,64	7,2
25	RM	9,08	0,43	8,41
26	RM	2,5	0	11

* nd: no detectado; ** RM: Región Metropolitana. El contenido de los flavonoides de las veintiséis muestras de miel, varió entre 0,014 y 13,8 mg/100 g; y el de fenoles entre 0 y 8,83 mg/100 g en muestras frescas de miel.

Las muestras fueron recogidas directamente por los apicultores sin manipulación para evitar cambios posibles durante el almacenaje, manejo y el proceso. Las muestras fueron almacenadas a 0,5 °C en oscuridad hasta su análisis. El origen botánico de las muestras fue confirmado por el análisis del polen^{13,14}.

Extracción de los flavonoides de la miel

Muestras de miel de 50 g cada una, fueron mezcladas con cinco porciones de agua acidificadas a pH 2 con HCl, hasta quedar totalmente fluida, luego fueron filtradas a través de algodón para remover partículas sólidas. El líquido filtrado fue colocado en una columna de Amberlite XAD-2 (Fluka Chemie; tamaño de poro 9 nm, tamaño de partícula 0,3-1,2 mm), (35 x 2 cm) (150 g)^{15,16}. Los compuestos fenólicos se retuvieron en la columna, mientras que los azúcares y otros compuestos polares fueron eluidos con el solvente acuoso, permitiendo la recuperación de los flavonoides. La columna fue lavada con una solución ácida (pH 2 con HCl, 100 mL) y luego con agua destilada (~300 mL). La fracción fenólica fue luego eluida con metanol (~300 mL) y secada a presión reducida (40 °C). El residuo fue redisoluto en 5 mL de agua y extraído con el éter dietílico (5 mL x 3). Los extractos de éter fueron reunidos,

concentrados a presión reducida, y redisolutos en 0,5 mL de metanol para el análisis de HPLC. Las muestras fueron guardadas en atmósfera de N₂ hasta su análisis.

Análisis por HPLC de los flavonoides de la miel

Todos los análisis fueron realizados en un aparato de cromatografía líquida Shimadzu SCL-GA con detector UV. La columna usada fue una Lichrospher RP-18 tamaño de partícula 5-μm de 12,0 x 0,4 cm, usando una mezcla de agua:ácido fórmico (23:450 v:v; solvente A) y metanol (solvente B). El gradiente de elución comenzó con metanol al 30%, siendo isocrático durante 15 min, metanol 40% durante 20 min, metanol 45% por 30 min, metanol 60% por 50 min, y metanol 80% por 52 min, y después isocrático por 60 min. Los flavonoides fueron examinados con detector UV para obtener los espectros UV de los diversos compuestos fenólicos; los cromatogramas fueron registrados en 340 y 290 nm. Los picos fueron identificados por comparación con la muestra auténtica o con tiempos de retención descritos por la literatura para el mismo método. La Tabla 2 muestra las estructuras de los diversos flavonoides.

Identificación de flavonoides y determinación cuantitativa

Los diversos flavonoides de las mieles fueron identificados comparando sus cromatogramas con marcadores auténticos (comerciales), y comparando sus espectros UV con los de los marcadores. Los flavonoides de la miel fueron cuantificados por la absorbancia de sus picos correspondientes en los cromatogramas las flavononas como pinocembrina estándar externo detectado en 290 nm, las flavonas con un anillo sin sustituir en B (crisina, galangina y tectocrisina) como crisina estándar externo detectado a 340 nm, y el resto de flavonoles y de flavonas con el estándar externo quercetina, detectado a 340 nm.

Análisis de fenólicos

Los análisis fueron realizados en un espectrofotómetro, Schimatzu 1203 UV, la absorbancia 280 nm fue utilizada para estimar el contenido de fenólicos totales, y la absorbancia a 360 nm fue utilizada para estimar flavonoles; el ácido gálico al 10% fue utilizado como estándar para fenólicos totales, y quercetina en etanol al 95% fue utilizada para los flavonoles. Los estándares fueron obtenidos de Sigma Chemical (St. Louis, MO)¹⁷. La regresión lineal fue empleada en todos los análisis.

Análisis ORAC

El análisis ORAC fue realizado de acuerdo a los protocolos descritos por Cao y colaboradores¹⁷, en que los radicales libres se producen por 2, dihidrocloruro 2'-diazobis (2-amidinopropano) (AAPH) y la β-ficoeritrina fluorescente de la proteína del indicador (β-PE) la que luego se oxida. Todos los reactivos fueron preparados en 150 mmol/L, tampón fosfato pH 7,0, usando Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametiltetrahidro-2-carboxílico) (0-4 μM) como estándar. Las muestras de la miel fueron disueltas convenientemente en el tampón fosfato. Las mezclas de reacción consistieron en 1000 μL de β-PE (0,92 nmol/L, preincubado por 15 min en 37 °C), 60 μL del compuesto de la prueba, 40 del tampón de fosfato de 75 mmol/L (pH 7,0), y 100 μL de AAPH (500 mM). Una vez que el AAPH fuera agregado, la placa fue agitada automáticamente durante 3 s, y la fluorescencia fue medida cada 2 min por 70 min con longitudes de onda de emisión y de excitación de 565 y 540 nm, respectivamente, usando un lector FL600 (Biotek, Inc., VT) de fluorescencia de

Tabla 2. Compuestos fenólicos y flavonoides ^(a)

Muestra	Región	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	IV																				
2	VI	x	x	x	x	x	x	x	x												
3	VI	x								x	x										
4	VII		x									x	x	x							
5	VII														x	x					
6	VII														x						
7	VII									x							x	x			
8	VII	x								x	x		x			x					
9	VII					x				x	x		x		x		x				
10	VII																		x		
11	VIII			x																x	
12	VIII				x			x				x			x	x					
13	IX									x					x						
14	X											x			x	x			x		
15	X				x							x	x	x		x	x		x		x
16	X																		x		
17	RM**						x					x	x	x							
18	RM				x							x	x	x							
19	RM							x								x			x		x
20	RM							x						x		x					x
21	RM				x									x		x	x				
22	RM	x													x						
23	RM	x		x	x			x			x			x		x					
24	RM																				
25	RM	x																			
26	RM	x																			

^{a)} (1) pinobanksina, (2) crisina, (3) hesperetina, (4) luteolina, (5) 3 metilquercetina, (6)isorramnetina, (7) pinocembrina, (8) dimetil cafeato, (9) fenil etil cafeato,(10) miricetina 3,7, 4', 5'-metileter,(11) galangina (12) galangina 3 metil eter,(13) tectocrisina, (14) ácido elágico, (15) 8 metoxikaempferol, (16) apigenina,(17) dimetilalil cafeato, (18) quercetina, (19) kaempferol (20) pinobanksin 3 acetato

^{b)} Muestras 1 y 24 no se detectaron compuestos marcadores.

microplaca mantenida a 37 °C. Los valores de ORAC fueron calculados según Cao y colaboradores¹⁸ y expresados como equivalente de micromolar Trolox (el análisis de TE/g). Análisis de varianza y comparaciones *post-hoc* se realizaron según Tukry, para comparar los valores de ORAC de las diversas mieles usando el software del SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, version 8, 1999). El tampón fosfato salino (PBS, 75mM, pH 7,0) se preparó primero mezclando 0,75 M K₂HPO₄ con 0,75M Na₂HPO₄ en la razón 61.1:38.9 (v/v). Esta mezcla fue diluida 1:9 (v/v) con agua de MilliQ y su pH ajustado a 7.0: AAPH (2, dihidrocloruro 2'-diazobis (2-amidinopropano), Molecular Probes). Una solución de trabajo preparada *in situ* a 320 mM se obtuvo por el agregado de 10 mL PBS a 868 mg de AAPH. Esta fue almacenada en hielo hasta ser utilizado para los análisis de ficoeritrina (Sigma R-PE). Una solución *stock* de 0.17 mg/mL fue preparada disolviendo 1 mg de PE en 5.9 mL PBS. Esta fue diluida adicionalmente para dar una solución de trabajo de 3.38 mg/L de Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametiltetrol-2-carboxílico; Sigma Labs). Una solución *stock* (100 µM) fue preparada disolviendo 5.0 mg Trolox en 200 mL PBS. Esta fue diluida posteriormente a 1:4 v/v en PBS para dar una solución de trabajo de 20 µM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los flavonoides son una serie considerable de pigmentos fenólicos de la planta y su contenido en el vegetal, alcanza normalmente niveles de 0,5% en polen, 10% en propóleos y casi 6000 µg kg⁻¹ en miel¹⁴. Los flavonoides identificados en la miel y propóleos son normalmente grupos de flavanonas y flavononas/flavonoles^{11,22}. Según To-

mas-Barberan y colaboradores⁹, las muestras de miel analizadas de Chile y Argentina muestran perfiles de flavonoides presentes en el polen-néctar como compuestos fenólicos mayoritarios¹⁵.

Los principales flavonoides detectados en el presente estudio, fueron pinocembrina, pinobanksina, quercetina, kaempferol, crisina, galangina y otras dos flavanonas no identificadas (Tabla 1); todos ellos, también detectados en propóleos^{20,21,23}; adicionalmente se identificaron el éter de 3 metil kaempferol, luteolina, éter de 7 metil luteolina, éter de 3 metil-quercetina e isorramnetina; todos ellos son flavonoides característicos también de propóleos y varios de ellos son compuestos típicos de los exudados de las yemas de álamo, aunque como componentes minoritarios; es de hacer notar que el álamo no es planta nativa de Chile¹⁹ (Tabla 1).

La gran variabilidad de contenidos de flavonoides y compuestos fenólicos totales, no ha permitido obtener conclusiones definitivas con la actividad antioxidante. Así, la actividad de ORAC en la VI Región (Tabla 2), esta ligada a un contenido importante de flavonoides, en tanto el mayor contenido de fenólicos totales 8,83 (mg/100 g miel) de la Región Metropolitana (Chile central) dio tan sólo un 1,77 µM TE/g. La muestra 10, (VII Región), no le fueron detectados valores de ORAC; al parecer el bajo contenido de flavonoides y de fenólicos podría ratificar dichos resultados.

Pinobanksina y kaempferol, son compuestos típicamente identificados en mieles chilenas. Sin embargo, el ácido elágico también aparece con frecuencia, su fuente de origen es probablemente el néctar del eucalipto o propóleos.

El análisis de correlación entre el contenido de flavonoides con el potencial antioxidante de Trolox® (Tabla 2) no fue significativa,

probablemente porque los diversos compuestos muestran gran variabilidad en sus actividades antioxidantes y las muestras que exhiben quercetina (5), pinocembrina (5) y galangina (6) son escasas.

Por otra parte, los fenólicos totales se correlacionan con la actividad antioxidante. Sin embargo, el coeficiente de correlación es bajo ($r: 0,003$); esto es probablemente, porque la muestra de miel utilizada para el ensayo ORAC es entera, y no ha sido fraccionada. Gheldof y colaboradores⁵ han obtenido mejores correlaciones usando los extractos purificados para la determinación de las actividades biológicas^{4,5}; además, la miel entera contiene azúcares y otros agentes – v. g. proteínas responsables de un 16% de actividad, que pueden interferir con el ensayo. Sin embargo, esta evaluación partió del supuesto que el consumo de la miel por la población es como tal, es decir, sin fraccionamiento y este análisis podría mostrar un índice de su capacidad antioxidante como miel fresca.

En conclusión, los resultados de este estudio, sugieren que los niveles de fenólicos y de flavonoides en mieles chilenas, es relativamente alta respecto a otras mieles, pero su valor relativo es bajo

como para tener significación biológica antioxidante individual importante. Por otra parte, y debido a la compleja composición de la miel, la capacidad antioxidante total ORAC es el resultado de la actividad y de la interacción combinadas de una amplia gama de los compuestos (fenólicos, péptidos, ácido orgánico y otros componentes minoritarios) y no se correlaciona sólo con la determinación de fenólicos. Sin embargo, estos resultados podrían proporcionar un índice de su capacidad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda financiera de Fondecyt 1060535 y a FONDEF D031-1054(GM) por este trabajo.

REFERENCIAS

- Rodríguez, G. O. de; Ferrer, B. S. de; Ferrer, A.; Rodríguez, B.; *Food Chem.* **2004**, *84*, 499.
- Mendes, E.; Proença, E. B.; Ferreira, I. M. P. L.V. O.; Ferreira, M. A.; *Carbohydr. Polym.* **1998**, *37*, 219.
- Molan, P.; *Bee World* **2001**, *82*, 22.
- Gheldof, N.; Engeseth, N. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3050.
- Gheldof, N.; Wang, X.-H.; Engeseth, N. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5870.
- Campus, R.; Madau, G.; Solinas, B.; *Tecn. Aliment.* **1983**, *6*, 10.
- Amiot, M. J.; Aubert, S.; Gonnet, M.; Tacchini, M.; *Apidologie* **1989**, *20*, 115.
- Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A.; Gil, M.; Lorente, T.; *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *96*, 49.
- Tomás-Barberán, F. A.; Martos, I.; Ferreres, F.; Radovic, B. S.; Anklam, E.; *J. Sci. Food Agr.* **2001**, *81*, 485.
- <http://www.prochile.cl/noticias/noticia.php?sec=5333>, accessed on January 2006.
- <http://www.apicultura.cl/pdf/Miel-Chile-1205.pdf>, accessed on January 2006.
- Di Castri, F.; Hajek E.; *Bioclimatología de Chile*, Ediciones Universidad Católica de Chile: Santiago, 1976.
- Lobeaux, J.; Mauricio, A.; Vorwohl, G.; *Bee World* **1978**, *59*, 139.
- Montenegro, G.; Pizarro, R.; Avila, G.; Castro, R.; Ríos, C.; Muñoz, O.; Bas, F.; Gómez, M.; *Ciencia e Investigación Agraria* **2003**, *30*, 161.
- Ferreres, F.; Andrade, P.; Tomás-Barberán, F. A.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1994**, *202*, 40.
- Gil, M. G.; Ferreres, F.; Ortiz, A.; Subra, E.; Tomás-Barberán, F. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2833.
- Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G.; *Free Radical Biol. Med.* **1993**, *14*, 303.
- Cao, G.; Verdon, C. P.; Wu, A. H. B.; Wang, H.; Prior, R. L.; *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 1738.
- Montenegro, G.; Peña, R. C.; Mujica, A. M.; Pizarro, R.; *Phyton* **2001**, *191*.
- Muñoz, O.; Peña R. C.; Ureta, E.; Montenegro, G.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2001**, *56*, 269.
- Muñoz, O.; Peña, R. C.; Ureta, E.; Montenegro, G.; Caldwell, C.; Timmermann, B. N. Z.; *Naturforsch., C: J. Biosci.* **2001**, *56*, 273.
- Campos, M. D. G. R.; Sabatier, S.; Amato, M.-J.; Aubert, S.; *Planta Med.* **1990**, *56*, 580.
- Pereira, A. dos S.; Seixas, F. R. M. S.; de Aquino Neto, F. R.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 321.

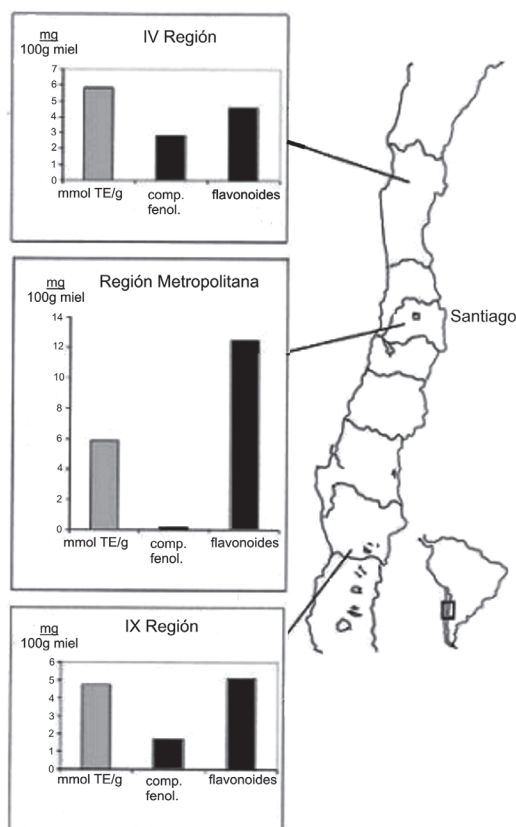


Figura 1. Área de distribución de las muestras examinadas para ORAC, contenido de fenólicos y flavonoides