

Presencia de ácido láctico y otros compuestos semivolátiles en mieles de Meliponini

Presence of lactic acid and other semivolatil compound in Meliponini honeys

Patricia Vit¹, Luis B Rojas², Alfredo Usubillaga², Rosa Aparicio², Gina Meccia², Miguel A Fernández Muiño³, María Teresa Sancho³

RESUMEN

Durante el estudio de compuestos semivolátiles, se encontró ácido láctico en mieles producidas por cuatro especies de abejas sin aguijón. Además, se identificaron otros compuestos: ácido 2-etil-2-hidroxi-propanoico en mieles de *Melipona favosa*, 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído y α -(fenilmetil)-benceno etanol, en mieles de *Scaptotrigona mexicana*, 2-butanol, eneicosano y heptacosano en mieles de *Trigona carbonaria*.

Palabras clave: ácido láctico, miel, Meliponini, compuestos semivolátiles

ABSTRACT

During the study of semivolatile compounds, lactic acid was found in the honey produced by four species of stingless bees. Moreover, other compounds were identified: 2-ethyl-hydroxy-propanoic acid in *Melipona favosa* honeys, 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde and α -phenylmethyl benzene ethanol in *Scaptotrigona mexicana* honey, 2-butanol, heneicosane and heptacosane in *Trigona carbonaria* honey.

Key words: lactic acid, honey, Meliponini, semivolatile compounds.

INTRODUCCIÓN

La evaluación sensorial de las mieles es necesaria para su caracterización, la cual permite identificar los sabores percibidos, mayormente dulce y ácido, junto con otros descriptores de la miel en la boca. En diversos trabajos se han utilizado paneles de catadores para conocer el olor, el sabor y el aroma de mieles hindúes (1), españolas (2) e italianas (3), producidas en panales.

Las abejas de la subfamilia Meliponini almacenan miel en botijas, mientras que las abejas de la subfamilia Apini almacenan miel en panal. Las mieles de abejas sin

aguijón (Meliponini) difieren de las mieles de *Apis mellifera* por su mayor contenido de humedad, que ocasiona mayor viscosidad y mayor acidez libre (4,5). También difieren en su espectro de azúcares (6,7) y menor contenido de diastasa; sin embargo, son similares en otros factores de composición bioquímica como el contenido de cenizas, nitrógeno, hidroximetilfurfural y actividad de la invertasa (8). Asimismo, las mieles de botija comparten algunos aspectos sensoriales con las mieles de panal y difieren en otros, resaltando su mayor intensidad del sabor ácido, en concordancia con su mayor acidez libre.

¹ Apiterapia y Bioactividad, Departamento Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

² Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal, Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

³ Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Burgos, España.
Autor principal: Tlf. 0274-2403565 (of) Fax 0274-2711802 vit@ula.ve.

En la tabla olor-aroma elaborada para la evaluación sensorial de las mieles de abejas sin aguijón (9) se resaltan ocho familias sensoriales, de las cuales cinco son compartidas con mieles de *Apis mellifera*, como floral frutal, vegetal, madera, químico (10), mientras que las tres familias fermentado, meloso y primitivo son nuevas y contienen descriptores requeridos para poder apreciar la miel en botijas (11). Las mieles de abejas sin aguijón han sido descritas sensorialmente en pocas ocasiones (11-13). No se conoce su perfil de volátiles, el cual ha sido estudiado en mieles de *Apis mellifera* con técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas, las cuales permiten separar mezclas complejas de volátiles en bajas concentraciones (14).

Las sustancias volátiles y semivolátiles contenidas en la miel deben separarse del contenido mayoritario de azúcares y agua, para lo cual se han utilizado técnicas de extracción por destilación (15), por solventes (16), por fase sólida (17), espacio de cabeza (18) y microextracción en fase sólida (19). Su estudio ha permitido caracterizar mieles uniflorales de azahar (20), romero (17), eucalipto (16) y de regiones geográficas como el Piemonte italiano (15).

El objetivo planteado en este trabajo es el estudio descriptivo de sustancias semivolátiles en extractos de miel producida por cuatro géneros de abejas sin aguijón *Melipona*, *Scaptotrigona*, *Tetragonisca* y *Trigona*, procedentes de Venezuela, México, Bolivia y Australia respectivamente, separados por cromatografía de gases e identificadas por espectrometría de masas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mieles

Cuatro muestras de miel de botija, producidas por abejas sin aguijón fueron recolectadas de colmenas ubicadas en Australia, Bolivia, México y Venezuela. Las mieles se recibieron empacadas comercialmente en envases PET, vidrio y cerámica, y se mantuvieron congeladas hasta su análisis. Cada país conoce la identificación entomológica de las especies criadas, las cuales también tienen nombres comunes, como se indica en la Tabla 1.

Extracción

La extracción de los volátiles se realizó siguiendo el

método de D'Arcy y col. (1997), con agitación de triplicados de $10,00 \pm 0,01$ g de miel y porciones consecutivas de acetato de etilo, cuyos extractos fueron recolectados, concentrados en rotavapor a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, llevados a un volumen final de 2 mL y conservados en envases de vidrio color ámbar, con tapa hermética, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizó undecanoato de etilo como estándar interno y acetato de etilo como estándar externo.

Tabla 1
Origen entomológico y geográfico de las mieles de botija

Nº	Identificación	Nombre común	País
1	<i>Melipona favosa</i>	erica	Venezuela
2	<i>Scaptotrigona mexicana</i>	negrita	México
3	<i>Tetragonisca angustula</i>	señorita	Bolivia
4	<i>Trigona carbonaria</i>	carby	Australia

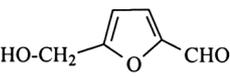
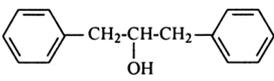
Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM)

Se inyectó 1 μL del extracto en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 serie II, provisto de columna capilar HP-5 MS (30 m de longitud: 0,25 mm de diámetro interno: 0,25 μm espesor de pared), se utilizó helio como gas portador, a un flujo de 0,9 mL/min, con un reparto de la muestra 1:10. Se utilizó un programa de temperatura inicial $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ x 1 min, con incremento de $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ x 10 min. Tiempo total de análisis 60 min. La temperatura de la fuente de iones en el inyector fue de $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la temperatura de transferencia en la interfase fue de $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. El detector se utilizó con modo de escaneo 40-400 m/z, energía de ionización 70 eV, con un retraso de solvente de 3 min. La identificación de los compuestos volátiles se realizó por comparación computarizada de los espectros de masa obtenidos, con la base de datos del equipo (Librería Wiley, Sexta Edición), y los índices de Kováts consultados en la literatura (21-22).

RESULTADOS

En la Tabla 2 se muestran las estructuras químicas de los compuestos identificadas en cada miel, según su orden de elución. Se pueden observar compuestos alifáticos, un compuesto bencénico y un derivado de

Tabla 2
Estructuras químicas y tiempos de retención de los compuestos semivolátiles contenidos en mieles de diferente origen entomológico

compuestos semivolátiles	Especies de abejas sin aguijón			
	<i>Trigona carbonaria</i>	<i>Tetragonisca angustula</i>	<i>Scaptotrigona mexicana</i>	<i>Melipona favosa</i>
	tiempos de retención (min)			
ácido 2-etil-2-hidroxi-propanoico $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	-	-	-	3,20
2-butanol $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	4,02	-	-	-
ácido 2-hidroxi-propanoico $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	4,20	4,33	4,49	4,61
5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído 	-	-	13,67	-
α-(fenil metil)-benceno etanol 	-	-	19,24	-
eneicosano $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{19}-\text{CH}_3$	46,21	-	-	-
heptacosano $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{25}-\text{CH}_3$	49,93	-	-	-

reacciones Maillard. Los compuestos alifáticos están representados por un ácido hidroxilado (2-hidroxi-propanoico y 2-etil-2-hidroxi-propanoico, conocido como ácido láctico). Entre los compuestos alifáticos también se

encontró un alcohol (2-butanol) y dos hidrocarburos (eneicosano y heptacosano). El 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído, conocido también como hidroximetilfurfural, fue el único derivado de reacciones tipo Maillard.

DISCUSIÓN

En la miel, los compuestos volátiles son más abundantes que los semivolátiles; sugerir su origen es un reto porque requiere un viaje retrospectivo de la miel analizada. Algunos volátiles provienen del néctar, otros de la mielada, de las transformaciones dentro de la colmena, durante el manejo y el almacenamiento, los cambios ocasionados por microorganismos, e inclusive de la contaminación ambiental (23). El estudio descriptivo de la composición semivolátil de la miel para caracterizar y diferenciar su origen entomológico, es la primera etapa para aplicar la cromatografía de gases y la espectrometría de masas; sin embargo, se necesitan más mieles de cada grupo para poder insertarlas en un sistema de análisis multivariante. La presencia de ácido láctico en todas las mieles puede ser un indicador de la fermentación láctica de sus azúcares, aunque no se ha identificado aun la flora responsable, y tampoco su origen en el ecosistema. Hace veinte años, Gilliam y col., postularon una hipótesis sobre el uso de bacterias esporuladas para procesar la miel por abejas de la especie *Melipona fasciata*, en una investigación donde lograron identificar varias especies de *Bacillus* asociados al alimento de la cría, la miel y el polen conservado en botijas (24).

Si bien el ácido láctico fue el compuesto detectado en todas las mieles, el comienzo es prometedor porque con los cuatro géneros analizados se observaron diferencias importantes en el análisis de semivolátiles presentes en mieles de *M. favosa*, *T. angustula*, *T. carbonaria* y en *S. mexicana*. Según se indicó en la Tabla 2, la miel de *T. angustula* sólo presentó ácido láctico, mientras que la miel de *M. favosa* presentó un compuesto adicional, el ácido 2-etil-2-hidroxi-propanoico. En la miel de *S. mexicana* también se indentificó un derivado de rección Maillard y un alcohol, el 5-(hidroximetil)-2-furan-carboxialdehído, conocido como hidroximetilfurfural, y el α -(fenil metil)-benceno etanol. Este alcohol complejo podría tener actividad biológica, junto con el ácido láctico, y quizás explicar la creencia de los meliponicultores de la Sierra Norte de Puebla sobre el mayor poder medicinal de esta miel para tratar enfermedades respiratorias luego de su fermentación post-cosecha (25). Las mieles de *T. carbonaria* presentaron además el 2-butanol, como alcohol adicional, y dos hidrocarburos de cadena larga, representados por el eneicosano y el heptacosano.

La posible función nutricional implícita por la presencia de *B. megaterium*, *B. circulans* y *B. alvei* presentes en la colmena de *M. fasciata*, se explicó por la diversidad de enzimas asociadas esterasas, lipasas, proteasas, aminopeptidasas, fosfatasas y glicosidasas, las cuales podrían aumentar la digestibilidad de los recursos nutritivos en la colmena (24) y también en su aprovechamiento nutracéutico para el consumo humano. Se han identificado bacterias ácido lácticas presentes en el estómago de las abejas, como el *Lactobacillus johnsonii*, con estudios de biología molecular 16S rRNA (26). Se ha postulado que varios oligosacáridos de la miel podrían aumentar la producción de ácido láctico por bifidobacterias y *Lactobacillus* (27). También se ha reportado la mayor jerarquía de grupos combinados de dos o tres representantes de la flora láctica en hidromieles (28). Si bien los ácidos orgánicos en mieles (acético, butírico, cítrico, fórmico, glucónico, láctico, málico, piroglutámico y oxálico) han sido identificados desde 1960 (29) y se han identificado otros (fumárico, málico, maleico, succínico) más recientemente (30), explicar su origen es muy actual gracias a los avances analíticos y biotecnológicos.

Al trabajar con las sustancias semivolátiles, se eliminaron las variaciones atribuidas a la flora visitada por las abejas, e inclusive de la selección del néctar pecoreado que podría ser específica según el tipo de abeja. Debido a la gran biodiversidad de abejas sin aguijón, 391 especies-grupo sólo en la región neotropical (31), es necesario concentrarse en el origen entomológico, para valorizar estas mieles precolombinas que aún no tienen normas en Venezuela (32), pero que afortunadamente ya han sido consideradas por las normas colombianas para miel (33), al hacer una transferencia inmediata de nuestra contribución científica sobre los estándares (34) a su aplicación normativa de referencia.

En este trabajo se realizaron las primeras identificaciones de compuestos semivolátiles en cuatro mieles de Meliponini, desde sus primeras referencias sensoriales como mieles apreciadas en el Nuevo Mundo (35) y la percepción como mieles ácidas (35, 36).

AGRADECIMIENTOS

La abeja *Melipona favosa* fue identificada por el Prof. JMF Camargo de la Universidad de São Paulo,

en el Departamento de Filosofía, Ciencia y Letras de la Facultad de Ciencias en Ribeirão Preto. La abeja *Trigona carbonaria* fue identificada por el Dr. TA Heard, de Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Brisbane, Australia, quien también donó la miel. La abeja *Scaptotrigona mexicana* es la abeja que cría la cooperativa TOSEPAN TITANISKE (palabras nahuats que significan Unidos Venceremos), de la Sierra Norte de Puebla en México, de donde se obtuvo la miel. La miel de la abeja *Tetragonisca angustula* fue recibida de la Asociación Ecológica del Oriente ASEO, de Santa Cruz, Bolivia, donde se conoce como señorita. Se agradece el apoyo financiero del CDCHT-ULA a los grupos Apiterapia y Bioactividad ADG y Productos Naturales ADG, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Anupama D, Bhat K, Sapna V. 2003. Sensory and physicochemical properties of commercial samples of honey. *Food Res. Int.* 2003; 36:1983-1991.
- (2) Galán Soldevilla H, Ruiz Pérez Cacho M, Serrano Jiménez S, Jodral Villarejo M, Bentabol Manzanares A. *Food Qual. Pref.* 2005; 16: 71-77.
- (3) Persano Oddo L, Sabatini A, Accorti M, Colombo R, Marcuzzan G, Piana M, Piazza M, Pulcini P. *Mieli Italiani. Nuove Schede di Caratterizzazione.* Roma, Italia: Ministero delle Politiche Agricole e Forestali; 2000.
- (4) Vit P, Medina M, Enríquez E. Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, México and Venezuela. *Bee World* 2004; 85: 2-5.
- (5) Souza B, Roubik D, Barth O, Heard T, Enríquez E, Carvalho C, Marchini L, Villas Bôas J, Locatelli J, Persano Oddo L, Almeida Muradian L, Bogdanov S, Vit P. Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *Interciencia* 2006; 31(12): 867-875.
- (6) Bogdanov S, Vit P, Kilchenmann V. Sugar profiles and conductivity of stingless bee honeys from Venezuela. *Apidologie* 1996; 27: 445-450.
- (7) Vit P, Fernández Maeso M, Ortiz Valbuena A. Potential use of three frequently occurring sugars in honey to predict stingless bee entomological origin. *J. Appl. Entomol.* 1998a; 122: 5-8.
- (8) Vit P, Persano Oddo L, Marano ML, Salas de Mejías E. Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties. *Apidologie* 1998b; 29: 377-389.
- (9) Vit P. Una guía para la evaluación sensorial de miel de abejas. En: Vit P, Ed. *Abejas sin aguijón y valorización sensorial de su miel.* Mérida, Venezuela: APIBA-DIGECEX; 2008, p. 124-132.
- (10) Piana M, Persano Oddo L, Bentabol A, Bruneau E, Bogdanov S, Guyót Declerck C. Sensory analysis applied to honey: State of the art. *Apidologie* 2004; 35:s26-s37.
- (11) Vit P. Valorización de la miel de abejas sin aguijón (Meliponini). *Rev. Fac. Farm.* 2008; 50(2): 20-28.
- (12) Carvalho C, Sodrê G, Fonseca A, Alves R, Souza B, Clarton L. Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (Apidae: Meliponinae submitted to a dehumidification process. *Ann. Acad. Bras. Ciencias* 2009; 81(1): 143-149.
- (13) Ferreira E, Lencioni C, Benassi M, Barth M, Bastos D. Descriptive sensory analysis and acceptance of stingless bee honey. *Food Sci Tech Int* 2009.
- (14) Maga J. Honey flavor. *Lebens. Wissen. Technol.* 1983; 16: 65-68.
- (15) Bicchi C, Belliardo F, Frattini C. Identification of the volatile components of some Piedmontese honey. *J. Apic. Res.* 1983; 22: 130-136.
- (16) D'Arcy B, Rintoul G, Rowland C, Blackman A. Composition of Australian honey extractives. 1. Norisoprenoids, monoterpenes, and other natural volátiles from blue gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and yellow box (*Eucalliptus melliodora*) honeys. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 1834-1843.
- (17) Castro Vázquez L, Pérez Coello M, Cabezudo M. Analysis of volatile compounds of Rosemary honey. Comparison of different extraction techniques. *Chromatographia* 2003; 57: 227-233.
- (18) Rowland C, Blackman A, D'Arcy B, Rintoul G. Comparison of organic extractives found in leatherwood (*Eucryphia lucida*) honey and leatherwood flowers and leaves. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 753-763.
- (19) Soria A, García M, Martínez Castro I, Sanz J. Patterns in the precision of quantitative data from multicomponent gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chrom. A* 2003; 1008: 105-114.
- (20) Castro Vázquez L, Díaz Maroto M, Pérez Coello M. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honey. *Food Chem.* 2007; 103: 601-606.
- (21) Adams R. *Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy.* Carol Stream, IL, Estados Unidos: Allured Publ. Corp.; 1995.
- (22) Hochmuth D. *MassFinder 3: GC/MS visualization, interpretation and library administration.* 1999-2006. En: *Mass*

- spectral library. Terpenoids and related constituents of essential oils. Hamburg, Alemania: 2006; p 1-42.
- (23) Bouseta A, Collin S. Optimized Likens-Nickerson methodology for quantifying honey flavors. *J. Agric. Food Chem.* 1995;43(7):1890-1897.
- (24) Gilliam M, Roubik DW, Lorenz BJ. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie* 1990; 21: 89-97.
- (25) Vit P, Medina M, Enriquez M. Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, México and Venezuela. *Bee World* 2004; 85(1): 2-5.
- (26) Audisio M, Torres M, Sabaté D, Iburguren C, Apella M. 2010. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut *Microbiol. Res.* 2010; en imprenta.
- (27) Chick H, Shin H, Ustunol Z. Growth and Acid Production by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Grown in Skim Milk Containing Honey. *J. Food Sci.* 2001; 63(3): 478-481.
- (28) Bahiru B, Mehari T, Ashenafi M. Yeast and lactic acid flora of tej, an indigenous Ethiopian honey wine: Variations within and between production units. *Food Microbiol.* 2006; 23(3): 277-282.
- (29) Stinson E, Subers M, Petty J, White J. The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 1960; 89(1): 6-12.
- (30) Suárez Luque S, Mato I, Huidobro JF, Simal Lozano J, Sancho MT. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2002; 955(2): 207-214.
- (31) Camargo J, Pedro S. Meliponini Lepeletier, 1836. En: Moure J, Urban D, Melo G Eds. *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region.* Curitiba, Brasil: Sociedade Brasileira de Entomologia; 2007, p. 272-578.
- (32) Vit P. La miel precolombina de abejas sin aguijón (Meliponini) aún no tiene normas de calidad. *Rev. Bol. Centro Invest. Biol.* 2008; 42(3): 415-423.
- (33) Souza B, Roubik D, Barth O, Heard T, Enriquez E, Carvalho C, Marchini L, Villas Bôas J, Locatelli J, Persano Oddo L, Almeida Muradian L, Bogdanov S, Vit P. Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *Interiencia* 2006; 31(12): 867-875.
- (34) Norma Técnica Colombiana. Miel de Abejas. NTC 1273. Bogotá, Colombia: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONOTEC); 2007 Disponible en: <http://www.sinab.unal.edu.co/ntc/NTC1273.pdf> (recuperada junio 2010).
- (35) Schwarz H. Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 1948; 90: 1-546.
- (36) Gonnet M, Lavie P, Nogueira-Neto P. Étude de quelques caractéristiques des miels récoltés para certains Méliponines brésiliens. *Comptes Rendus Acad. Scienc. Paris* 1964; 258: 3107-3109.