

ESTUDIO DE PROPÓLEOS DE AMAICHA DEL VALLE: POSIBLE APLICACIÓN EN EL DISEÑO DE ALIMENTOS FUNCIONALES.

GONZÁLEZ*, M.; RUDYK, R.A.; ALBORNOZ, A.C.; LUNA, L.; LIMA, B.; TAPIA, A.A.; FERESIN, G.E.; TERESCHUK, M.L.; ALBARRACÍN, P.M.

Departamento de Ingeniería de Procesos y Gestión Industrial. Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología. Universidad Nacional de Tucumán. Av. Roca 1800. Tel: 0381-4364093. Int. 7724. E-mail: mago@fbqf.unt.edu.ar

1. RESUMEN

Los alimentos funcionales son aquellos que además del aporte nutricional, ayudan a prevenir ciertas enfermedades. En este trabajo se aborda la investigación de propóleos de Amaicha del Valle para su posible uso en tecnología alimentaria. Las actividades biológicas estudiadas fueron: antimicrobiana, antioxidante por método de β -caroteno y DPPH, antiinflamatoria y enzimática frente a xantina oxidasa.

Se puede afirmar que las muestras cosechadas en Amaicha del Valle (Tucumán) poseen una importante actividad antimicrobiana frente a los microorganismos estudiados. Además poseen buena actividad enzimática y antiinflamatoria. Particularmente, los resultados correspondientes a la actividad antioxidante presentan a los propóleos de Amaicha del Valle como posible materia prima para el diseño de alimentos funcionales. Este producto natural renovable, capaz de ser aplicado en el diseño de alimentos funcionales podría prevenir específicamente ciertas enfermedades que se inician por reacciones bioquímicas oxidativas. La actividad económica así desarrollada en la región, daría importante rentabilidad para la industria, como así también a los apicultores de esta zona de Tucumán.

2. INTRODUCCIÓN

Hace 50 años la OMS definió salud como un “estado de completo bienestar físico, mental y social y no meramente la ausencia de enfermedad (Anon., 1998f). Esto implica que la persona debe estar en perfectas condiciones que no necesita de algún tratamiento médico.

Se define como “estado de salud” a aquel en el que el individuo está en buenas condiciones físicas y no presenta ningún síntoma relacionado con cansancio o fatiga. El “estado de enfermedad” es entonces, aquel en el que la persona presenta síntomas que requieren tratamientos médicos. En el “estado de semisalud” que existe intermedio entre el estado de salud y el de enfermedad, la persona exhibe varios síntomas (cansancio, depresión, irritabilidad) que pueden afectar sus actividades cotidianas.

Simultáneamente, mientras se observaba que las ciencias químicas y biológicas iban en franco desarrollo, los costos de los tratamientos de enfermedades crónicas también se incrementaban. De allí que la medicina modifica su objetivo y pasa del tratamiento de las enfermedades a la prevención de las mismas¹.

Es entonces en el estado de semisalud, en donde cobra importancia el mercado de los *alimentos funcionales*. Cabe destacar que cualquiera de estos alimentos debería ser usado en la prevención y no como medicamento cuando está cursando la enfermedad.

En la actualidad, se está abordando con mayor interés la investigación de alimentos funcionales basados en fitoquímicos para su uso en tecnología alimentaria. El estudio de extractos naturales proporcionaría nuevas moléculas activas para el diseño de los mismos.

Dentro de los fitoquímicos, los extractos de propóleos resultan de importancia. Este producto de la colmena es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. Ampliamente utilizado desde la antigüedad con diversas finalidades, actualmente se investigan las acciones, efectos y posibles usos del propóleos en biología y medicina, destacando su utilización como suplemento dietético y en la industria farmacéutica. En tecnología alimentaria las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas del propóleos pueden ofrecer una gran variedad de aplicaciones con la ventaja de que sus residuos pueden ser beneficiosos para la salud humana².

3. OBJETIVO

Con el propósito de demostrar que el propóleos³ de Amaicha del Valle es apto para su potencial uso en el diseño de alimentos funcionales, en este trabajo se presentan algunos de los numerosos estudios realizados por nuestro grupo en los últimos años para determinar su actividad biológica.

4. METODOLOGÍA

4.1 Composición

4.1.1 Perfil cromatográfico por HPTLC⁴.

Para conocer cualitativamente la composición de las diferentes muestras de propóleos cosechados de colmenas de Amaicha del Valle, se realizó cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC) en la cual, después del desarrollo en un sistema de eluyente adecuado, se observan los diferentes perfiles.

Para la realización de esta cromatografía en placa delgada de alta eficiencia, se sembraron alícuotas de 3 µL de cada extracto en cromatoplasmas (10 x 20cm) RP-18 F254-S (Merck Co.). Se desarrolló durante 100 minutos aproximadamente, utilizando como sistema eluyente etanol 95%: agua destilada (55:45, v/v). Concluido el desarrollo las placas fueron observadas bajo luz ultravioleta de longitud de onda de 254 y 366nm, utilizando un equipo U.V. Cole Parmer, modelo UVP-UVGL-58.

4.1.2 Perfil cromatográfico por HPLC⁴.

La determinación cuantitativa de la composición química de las diferentes muestras de propóleos se estudió por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Esta técnica fue realizada utilizando un cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-10 equipado con columna de fase reversa y acoplado a un detector de arreglo de diodo. La fase móvil utilizada fue una mezcla de metanol, agua y ácido acético en un sistema de gradiente. Para la identificación de los compuestos fueron utilizados patrones auténticos Extrasynthese A.A. Co., Francia.

4.2 Actividad biológica

4.2.1 Actividad antimicrobiana⁴: Sobre discos de papel Whatman N°3 (5 x 1mm de diámetro) fueron aplicados 10 µL de los respectivos extractos de propóleos. Estos se colocaron en desecador con sílica a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente,

fueron mantenidos en estufa a 60°C por 2 horas para la eliminación de cualquier residuo etanólico.

El análisis de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos sobre la bacteria gram positiva *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva fue realizada de acuerdo al método descrito por Blair *et al.* (1958). La actividad antimicrobiana fue determinada por la formación del halo inhibitorio alrededor de los discos.

-4.2.2 Actividad Antibacteriana^{5,6,7}: se utilizaron diversas cepas de bacterias: ATCC, Instituto Malbrán (IM), Instituto Pasteur (IP) y del Laboratorio de Microbiología (LM), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. Cepas Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922, LM *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* (IM), *Yersinia enterocolitica* (IP). Cepas Gram (+): *Staphylococcus aureus* meticilino- sensible ATCC 29213 y *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.

Las bacterias fueron mantenidas en agar Müeller-Hinton por 24 hs a 37°C. Las suspensiones celulares se ajustaron en agua destilada estéril a una concentración final de $5 \cdot 10^5$ UFC/mL utilizando la escala 0,5 de Mac Farland. (Jorgensen y col., 1999).

Ensayo antibacteriano: determinación de la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima). Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de propóleos (EMP) y/o compuesto se utilizó el método de dilución en agar, usando medio agar Müeller-Hinton de acuerdo a lo informado por Feresin y col. (2001). El ensayo se llevó a cabo en tubos. Se prepararon soluciones madre de los extractos en La CIM se definió como la menor concentración de extracto, que no mostró desarrollo visible luego del tiempo de incubación.

4.2.2 Actividad antioxidante⁴: La actividad antioxidante fue determinada por la oxidación acoplada de β - caroteno y de ácido linoleico como fue descrito en las referencias^{7,8,9} (Hammerschmidt & Pratt, 1978; Pratt & Birac, 1979; Pratt & Watts, 1979). Se graficó absorbancia porcentual en función del tiempo transcurrido para testear de esta manera cómo se degrada paulatinamente el β -caroteno en presencia del ácido linoleico y cómo es inhibida esta degradación y en qué medida por los diversos EEP usados en este análisis.

-Ensayos de decoloración de DPPH

Para la búsqueda de agentes atrapadores de radicales libres^{10,11,12,13} se empleó el bioensayo "in vitro" del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) de acuerdo a lo reportado por Tapia y col., (2004). Este ensayo se fundamenta en que el radical DPPH (Aldrich), de color violeta intenso, al ser capturado pierde su color característico. Es posible cuantificar la capacidad de captura de radicales libres que poseen distintos extractos y/o compuestos, mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una solución metanólica de radical. Como captador de radicales libres de referencia se utilizó catequina. Los valores se presentan como la media \pm la desviación estándar.

4.2.3 Actividad antiinflamatoria: En tejidos animales, el espacio extracelular se encuentra ocupado por diversos tipos de heteropolisacáridos que forman una matriz que mantiene unidas las células individuales y proporciona protección, forma y soporte a células, órganos y tejidos. El ácido hialurónico, uno de los polímeros que proporcionan resistencia y flexibilidad a cartílagos y tendones, tipifica este grupo de polisacáridos extracelulares.

El glucosaminoglucano ácido hialurónico (hialuronato a pH fisiológico) de la matriz extracelular de los tejidos animales antes citados, contiene unidades alternas de ácido D-glucurónico y *N*-acetilglucosamina.

Dado que el ácido hialurónico tiene por función lubricar las articulaciones de los vertebrados, cuando actúa la enzima hialuronidasa sobre ese sustrato degradándolo, comienza un proceso de tipo inflamatorio en dichas articulaciones. En esto radica la importancia de encontrar moléculas o mezclas de ellas que inhiban la acción de la enzima. La inhibición de la actividad de hialuronidasa fue determinada conforme a lo descrito en las referencias^{14,15}. La enzima hialuronidasa es la responsable de varios procesos inflamatorios, ya que actúa sobre la degradación de ácido hialurónico e inhibe su actividad. Por esto es de importancia encontrar compuestos capaces de evitar la acción de la enzima sobre el sustrato, ejerciendo así una acción antiinflamatoria.

Se graficó porcentaje de inhibición de la enzima para cada EEP evaluado, siempre comparado con un control negativo que no contenía sustancia capaces de inhibir la acción de la enzima.

4.2.4 Actividad Enzimática: Ensayo de la Inhibición de la xantina oxidasa

La enzima oxidasa de la xantina (XO) (E.C 1.1.3.22) es una metaloflavoenzima que cataliza la oxidación *in vivo* de hipoxantina a xantina, y de ésta a ácido úrico. Niveles altos de urato son característicos de la gota, así como también dolores articulares fuertes. Estos últimos son causados probablemente por el depósito de cristales de urato de calcio en las membranas sinoviales. En el ámbito clínico, la enfermedad se combate mediante el uso del alopurinol, un análogo estructural de la hipoxantina y a la vez, potente inhibidor de la xantina oxidasa. Para la búsqueda de inhibidores alternativos de la XO en extractos vegetales, se emplea un bioensayo *in vitro* que mide el efecto que ejerce el extracto sobre la actividad de la enzima, en una reacción estandarizada. El efecto inhibitorio se expresa como porcentaje de inhibición de la enzima con respecto a una reacción control sin inhibidores. Para estudiar la actividad de la enzima xantina oxidasa con xantina como sustrato, se midió espectrofotométricamente a 290 nm usando el procedimiento reportado originalmente por Iio y col. (1985), con algunas modificaciones. Los extractos crudos se evaluaron a una concentración de 50 µg/mL. Aquellos extractos o productos que inhibieron la enzima en más del 50% fueron nuevamente ensayados para determinar la IC₅₀.

5. RESULTADOS

- En la figura 1 se presentan los fingerprints de RP-HPTLC correspondientes a las 11 muestras de Amaicha del Valle, que demuestran claramente que la composición de los propóleos estudiados es la misma a pesar de haber sido cosechados de colmenas de diferentes zonas de Amaicha.

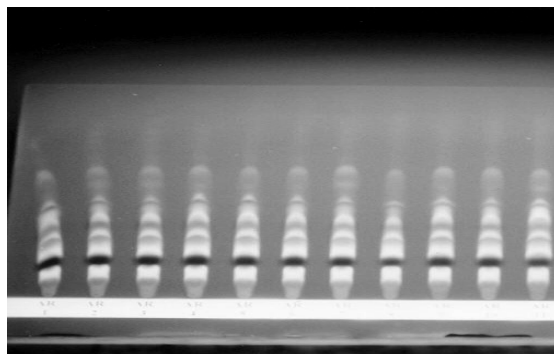


Figura 1. RP-HPTLC de 11 muestras de propóleos cosechadas de diferentes lugares de Amaicha del Valle.

-En la figura 2 se presentan los resultados de los fingerprint de RP-HPLC de una muestra de propóleos (m3) de Amaicha del Valle en comparación con muestras cosechadas en Uruguay, Buenos Aires (Argentina), Santa Cruz (Brasil) y resina de *Populus alba*.

-Los resultados de la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* por uso de swabs, se presentan en la tabla 1. En la tabla 2 se resume la actividad antimicrobiana expresada por los MICs en $\mu\text{g/ml}$.relativa.

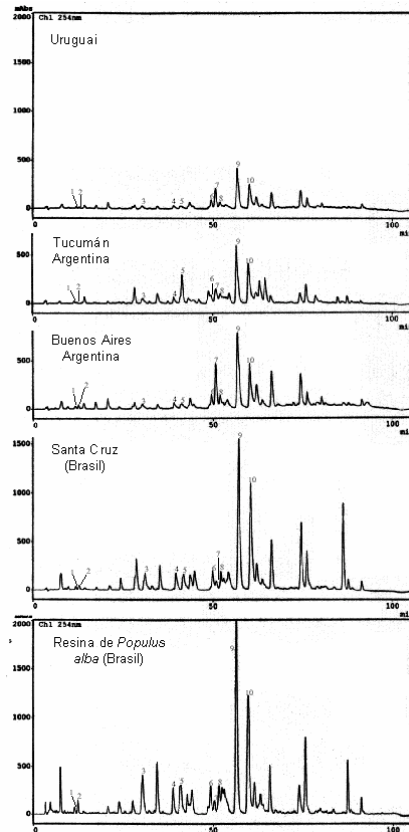


Figura 2. RP-HPLC fingerprint de propóleos cosechados en Uruguay, Amaicha del Valle, Buenos Aires (Argentina), Santa Cruz (Brasil) y Resina de *Populus Alba*.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de EEP y extracto metabólico de resina de álamo sobre el microorganismo *Staphylococcus aureus*

| Muestras | Zona de inhibición (mm) frente a <i>S. aureus</i> |
|-------------------------------|---|
| Santa Cruz (Brasil) | 2.0 |
| Uruguay | 1.0 |
| Buenos Aires (Argentina) | 1.5 |
| Amaicha del Valle (Argentina) | 2.5 |
| Resina de álamo | 4.0 |

-En cuanto a la actividad antioxidante, los resultados del método de Pratt se presentan en la figura 3

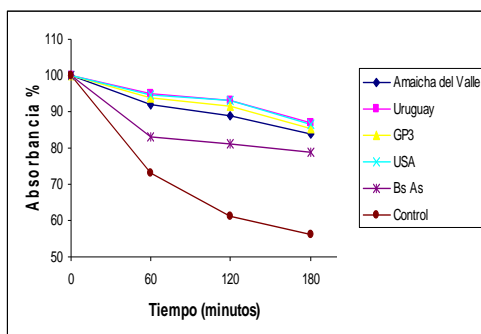


Figura 3. Actividad antioxidante evaluada por método de Pratt & Watt para Propóleos de Amaicha del Valle (A. del V.), Uruguay, Grupo 3 (Brasil), USA y Buenos Aires

La tabla 2 contiene valores de actividad antioxidante por el método de DPPH como así también, Xantina Oxidofasa. Los resultados se presentan como la media \pm s.d.

En la figura 4 se presentan los resultados de la actividad antiinflamatoria de propóleos de Buenos Aires, Grupo 3 (Brasil), Uruguay, Amaicha del Valle (Tucumán) y USA

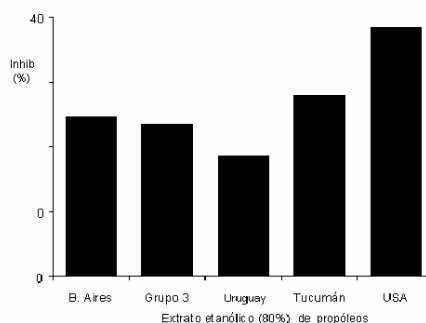


Figura 4. Actividad antiinflamatoria de propóleos de Buenos Aires, Grupo 3 (Brasil), Uruguay, Amaicha del Valle (Tucumán) y USA

6. CONCLUSIONES

-Se puede afirmar que el perfil de las 11 muestras cosechadas en Amaicha del Valle (Tucumán) es bastante interesante en lo que respecta a las actividades biológicas acá estudiadas. Los propóleos de Amaicha del Valle poseen una importante actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* según el estudio realizado por el método de

swabs y por dilución por tubos de Cepas Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922, LM *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* (IM), *Yersinia enterocolitica* (IP). Cepas Gram (+): *Staphylococcus aureus* meticilino-sensible ATCC 29213 y *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300. Además poseen buena actividad enzimática y antiinflamatoria.

Particularmente creemos que los resultados correspondientes a la actividad antioxidante por el método de Pratt & Watt y de DPPH, presenta a los propóleos de Amaicha del Valle como posible materia prima para el diseño de alimentos funcionales. Este producto natural renovable, capaz de ser aplicado en el diseño de alimentos funcionales podría prevenir específicamente ciertas enfermedades que se inician por reacciones bioquímicas oxidativas.

La actividad económica así desarrollada en la región, daría importante rentabilidad para la industria, como así también a los apicultores de esta zona de Tucumán.

Destacamos que el CAA (código alimentario argentino) permitía hasta el presente la comercialización del propóleos debiendo indicar en el envase que se trata de un suplemento dietario, a pesar de que las propiedades biológicas de propóleos ameriten aprobarlo por medio del ANMAT (Administración Nacional de medicamentos, alimentos y tecnología) para su uso en medicina.

En conclusión creemos que para el desarrollo de alimentos elaborados en base a propóleos se presenta como un desafío para la región, siendo necesaria la interacción de apicultores, investigadores, empresarios y gobiernos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1- KWAK, N. S. and JUKES, D. J. (2001). Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*. **12**, 99-107.
- 2- FARRÉ, R.; FRASQUET, I.; SANCHEZ, A. (2004). El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*. **45:1**, 21-43.
- 3- GONZÁLEZ GUERRA, A.; BERNAL MÉNDEZ, R. (1997). Propóleos. Un camino hacia la salud. Pablo de la Torriente Editorial. Cuba
- 4-PARK, Y. K.; DE ALENCAR, S.; DE AGUIAR, C. L.; SCAMPARINI, A. R. P.; GONZÁLEZ, M. and MOLINA M. A. A. (2001). Comparação das características Físico-Químicas das Própolis Produzidas na Região Subtropical da América do Sul: Evidência Fitoquímica de sua Origem Botânica. Publicado en MENSAGEM DOCE on line, número 61, edição maio/2001.
- 4- GONZÁLEZ, M.; GUZMÁN B.; RUDYK R., ROMANO E. and MOLINA M.A.A. (2003). Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. **22** (3) 243-8.
- 5- BLAIR, J. E.; BORMAN, E. K.; BYNOE, E. T.; UPDYKE, E. L.; WILLIAMS, R. E. O. (1958) Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation. Atlanta, G.A: United States Department of Health, education and Welfare, Public Health Service.
- 6- Principios de bioquímica. (1955) LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. & COX, M.M. 2ª Edición. Omega. ISBN 84-282-0924-3.
- 7- FIERRO MORALES WALTER. (2000). Evidencia científica del propóleos desde el punto de vista médico. Congreso Internacional de propóleos. Buenos Aires. Argentina.
- 8- PRATT, D.E.; WATTS, B.M. (1964) The antioxidant activity of vegetable extracts. I: Flavone aglycones. *J. Food. Sci.* **29**, p.27-

- 9- HAMMERSCHMIDT, P.A.; PRATT, D.E.(1978) Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.*, **43**, p.556-559.
- 10- PRATT, D.E.; BIRAC, P.M. (1979) Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, **44**, p.1720-1722.
- 11- HARBORNE J.B. & WILLIAMS, C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*.**55**, p.490-500.
- 12- DAS, N. P. & PEREIRA, T.A. (1990) Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure activity relationships. *Journal of American Oil Chemists Society* **67**, 255-258.
- 13- Value-added products from beekeeping. (1996) FAO. Agricultural services bulletin No. 124.
- 14- BORRELLI, F. MAFFIA, P., PINTO, L., IANARO, A. RUSSO, A. CAPASSO, F. IALENTI,A. (2002) Phytochemical compounds involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* **73** Suppl. 1 S53-S63.Krell, R.
- 15- ARONSON, N.N.; DAVIDSON, E.A. (1967) Lysosomal hyaluronidase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **242**, p.437-440.

| Extractos | Extracto blando | XO 50 µg/ml | Samr Btatica | Samr Bcida | Sams Btatica | Sams Bcida | E.coli Btatica | E.coli Bcida | DPPH decoloración (µg/ml) | | |
|------------|-----------------|-------------|--------------|------------|--------------|------------|----------------|--------------|---------------------------|------------|-------------|
| | | | | | | | | | 100 | 50 | 10 |
| Muestra1 | 72.66 | 100±0.0 | 250 | >500 | 250 | >500 | 1000 | 1000 | 90.60±1.42 | 89.25±0.14 | 51.64±3.030 |
| Muestra2 | 59.47 | 96.34±6.34 | 200 | >1000 | 100 | >500 | 1000 | 1000 | 95.56±0.39 | 93.53±0.38 | 62.97±5.17 |
| Muestra3 | 60.76 | 84.41±12.08 | 250 | >500 | 200 | >500 | 750 | >1000 | 96.72±1.76 | 94.29±0.53 | 64.22±5.76 |
| Muestra4 | 73.00 | 97.62±4.11 | 250 | >500 | 250 | >500 | 1000 | 1000 | 98.86±1.60 | 74.81±6.31 | 49.79±5.17 |
| Muestra5 | 43.33 | 98.91±1.88 | 250 | >500 | 200 | >500 | 1000 | 1000 | 100±0.0.0 | 100±0.0 | 78.09±3.55 |
| Muestra6 | 66.10 | 91.33±12.97 | 250 | >500 | 250 | >500 | 750* | >1000 | 96.73±0.48 | 96.51±0.57 | 63.44±1.76 |
| Muestra7 | 44.71 | 81.45±2.58 | 250 | >500 | 250 | >500 | 750 | >1000 | 95.98±0.69 | 95.97±0.34 | 70.61±0.97 |
| Muestra8 | 69.25 | 90.58±4.88 | 250 | >500 | 250 | >500 | 1000 | 1000 | 94.84±0.27 | 94.76±0.20 | 64.31±1.17 |
| Muestra9 | 51.05 | 88.68±7.47 | 300 | 1000 | 250 | >500 | 1000 | 1000 | 88.52±0.27 | 90.13±3.29 | 69.13±1.45 |
| Muestra10 | 58.55 | 92.48±13.02 | 250 | >1000 | 200 | >500 | 1000 | 1000 | 90.13±4.44 | 88.00±7.51 | 40.32±2.77 |
| Muestra11 | 48.35 | 97.83±3.76 | 250 | >500 | 200 | >500 | 750 | 1000 | 92.33±2.11 | 91.04±5.12 | 53.38±6.38 |
| Cefotaxina | | | 0.5 | | 0.5 | | 0.5 | | | | |

Tabla 2. Actividad relativa al control inducida por EEP de Amaicha del Valle y Cefotaxina por método de DPPH, Xantina Oxidfasa y actividad antibacteriana. Los resultados se presentan como la media ± s.d. y MICs en µg/ml.