

**APLICACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE PROPOLEOS ROJO  
CUBANO EN EL DESARROLLO DE UNA BIOPELÍCULA ACTIVA**

**HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF RED CUBAN PROPOLIS FOR BIOACTIVE  
FILMS**

***Liliam Chang- Bravo \*, Mirian Martino \*\*, Jose Luis Rodríguez-Sánchez \* Lic.  
Mario Fajardo-Cárdenas\*\*\****

***(\*) Instituto de Investigaciones Industria Alimentaria, Cuba, Email:  
[liliam@iia.edu.cu](mailto:liliam@iia.edu.cu)***

***Carretera al Guatao km 3½, La Habana, CP 19200, telef 202 0589 ,Cuba***

***(\*\*) Centro de Investigación y Desarrollo de Alimentos, CIDCA, La Plata,  
CP1900, Argentina***

***(\*\*\*) Centro de Investigaciones Apícolas, CP 19190, La Habana, Cuba***

## **APLICACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE PROPOLEOS ROJO CUBANO EN EL DESARROLLO DE UNA BIOPELÍCULA ACTIVA**

### **HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF RED CUBAN PROPOLIS FOR BIOACTIVE FILMS**

#### **RESUMEN**

La adición de extractos bioactivos dentro de la matriz polimérica de películas biodegradables no solo contribuye a la reducción de algunos problemas medioambientales sino, potencia las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de extractos de origen natural que pueden emplearse en el desarrollo de envases activos. Cuba presenta formaciones vegetales tropicales típicas y un alto porcentaje de plantas endémicas que puede proporcionarle una composición química peculiar a sus propóleos, diferentes de otros orígenes geográficos. Los compuestos con actividad antibacteriana y antioxidante presentes en su composición química pueden incluirse en la matriz de una biopelícula y a partir de sistemas de liberación controlada aplicar a la conservación de alimentos. El objetivo de este trabajo fue medir la capacidad antioxidante por el método FRAP de una película base almidón con extractos de propóleos rojo cubano y evaluar su efectividad como envase activo a partir de la determinación del grado de inhibición de la oxidación lipídica en carne molida de cerdo refrigerada cubierta con la película, por el método del ácido tiobarbitúrico TBA. Se obtuvo una capacidad antioxidante de 319,86 (S=1,2)  $\mu\text{M}$  /100 g expresado como oxidación del ión ferroso y un 21 % de inhibición de la oxidación lipídica de la película en el modelo evaluado.

**Palabras clave:** Biopelículas, propóleos rojo, capacidad antioxidante, FRAP

#### **ABSTRACT**

The addition of bioactive extracts inside the polymeric matrix of biodegradable films contributes to the reduction of some environmental problems but also; enhance the antimicrobials and antioxidant properties of extracts from natural origin to be used in active packaging. Cuba has typical vegetable formations of tropical areas, within a high percentage of endemic plants, making available a peculiar chemical composition of propolis to others of different geographical origins. The antibacterial and antioxidant compounds in chemical composition of Cuban red propolis could be used in controlled release systems to food preservation. The objective of this work was measure the antioxidant capacity of corn starch film contained red Cuban propolis extract by the FRAP method and its grade of lipid inhibition in a model system by means of the method of tiobarbituric acid TBA. The antioxidant capacity obtained was 319,86 (S= 1,18)  $\mu\text{M}$  /100 g expressed like ion ferric oxidation and 21 % of lipid oxidation inhibition.

**Key Words:** Biofilms, red propolis, antioxidant capacity, FRAP

#### **INTRODUCCION**

El propóleos es una mezcla resinosa aromática y compleja, con una variable apariencia física elaborado por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de exudados de

diversas plantas<sup>1,2</sup> y es conocido por sus propiedades biológicas y antibacterianas, antifúngicas, antioxidante y antiviral<sup>3</sup>. En muchos países, se lo utiliza además como aditivo por sus propiedades antioxidantes. Unas gotas de solución de propóleos incluidas en productos envasados o en alimentos frescos, pueden prolongar entre dos y tres veces su vida útil lo que se ha comprobado en trabajos realizados con pescados congelados, grasas y aceites, ron y bebidas alcohólicas y podrían extenderse a otra clase de alimentos tales como carne vacuna, cordero, cerdo, pollo, fruta, etc.<sup>4,5,6,7</sup>

En Cuba ha cobrado auge su empleo por sus reconocidas propiedades medicinales, siendo este uno de los productos naturales más activos que se insertan en las investigaciones al respecto (cosméticos, suplementos alimentarios y medicamentos). Cuba cuenta con más de un 51% de flora endémica que puede proporcionarle una composición química peculiar a los propóleos nativos y justificar su variabilidad en diferentes zonas del país.<sup>8,9,10,11,12,13</sup>

Los estudios actuales relacionados con el envasado activo están encaminados hacia la caracterización de nuevas películas basadas en hidrocoloides de fuentes no convencionales y hacia la determinación de la capacidad que estas poseen para liberar compuestos con funciones preestablecidas. Así mismo, deben evaluarse las interacciones y la estabilidad que puedan ofrecer dichas matrices.<sup>14,15,16,17</sup>

En el Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, se viene desarrollando esta línea de investigación insertado inicialmente en el Proyecto CYTED “Desarrollo de nuevos envases” y mas recientemente en el de “Empleo de recursos de la agroindustria en la obtención de películas bioactivas y biodegradables”. Se ha desarrollado una película activa base almidón, con la incorporación de propóleos rojo cubano, con una formulación cuyas propiedades funcionales son coincidentes con las de películas semejantes reportadas en la literatura.<sup>18</sup>

Para evaluar el poder antioxidante se emplean diversos métodos, como el “Ferric Reducing Ability of plasma” (FRAP), utilizado para medir la actividad antioxidante del plasma humano. Actualmente, se le denomina Ferric Reducing/ antioxidant Power y su utilización se ha extendido al estudio de diferentes compuestos, mezclas o extractos biológicos. El fundamento del método consiste en la reducción de un compuesto o mezcla de compuestos(X) sobre el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en un complejo con un compuesto orgánico: Tripiridiltriazina (TPTZ). Cuando el hierro del complejo es reducido a la forma ferrosa toma un color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm y cuya intensidad del color es proporcional a la capacidad reductora del compuesto ensayado<sup>19</sup>.

El objetivo de este trabajo fue medir la capacidad antioxidante por el método FRAP de una película base almidón con extractos de propóleos rojo cubano y evaluar su efectividad a partir de la determinación del grado de inhibición de la oxidación lipídica en carne molida de cerdo refrigerada cubierta con la película, por el método del ácido tiobarbitúrico TBA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1 Propiedades antioxidantes

#### 2 Determinación del contenido total de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu

Se determinó el contenido total de fenoles de los extractos empleados y en las películas obtenidas. Este último a partir de la extracción de 1 g de película en 20 mL de una solución de etanol / agua (50/50 m/m) bajo agitación de  $200 \text{ min}^{-1}$  por 2 h.

En un tubo de ensayo de 15 mL de capacidad se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de la muestra y luego se adicionaron 2.5 mL de solución diluida de reactivo Folin (1+9 de agua). Se esperó 5 min y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 7.5%. Después de 2 h se leyó la absorbancia a 765 nm. Se empleó una curva de calibración para ácido gálico como estándar y se calculó la concentración como:

$$\text{Concentración de mg fenoles totales/L} = (\text{Absorbancia} - a / b) \times fd$$

Donde Absorbancia: Lectura realizada

a: intercepto de la recta de mejor ajuste de la parte lineal de la curva de calibración

b: pendiente de la recta de mejor ajuste de la parte lineal de la curva de calibración  
para  $R^2 = 0,998$

fd: factor de dilución 1mLmuestra/3 mL de solución etanol/agua (50/50w/w).

Se evaluó la estabilidad en el tiempo del contenido de fenoles, por tres meses de conservación de la película a temperatura ambiente. A los resultados se les determinaron los estadígrafos media y desviación típica.

#### 1.1. Determinación de la capacidad antioxidante por el método Ferric Reducing Ability of plasma (FRAP)

Se elaboró la curva de calibración a diferentes concentraciones de catión ferroso. En un tubo de 10 mL de capacidad se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de la muestra (extracción en la película a partir de 1 g de la misma en 20 mL de solución 50/50 m/m etanol/agua) y se adicionaron 1,5 mL de reactivo FRAP. Se atemperó a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min y se leyó la absorbancia a 593 nm,<sup>19</sup>

La concentración de  $\mu\text{M}$  de hierro  $\text{Fe}^{2+}$  se calculó como:

$$\text{Concentración de } \mu\text{M de } \text{Fe}^{2+} = (\text{Absorbancia} - a / b) \times fd$$

Donde Absorbancia: Lectura realizada

a: intercepto de la recta de mejor ajuste de la parte lineal de la curva de calibración

b: pendiente de la recta de mejor ajuste de la parte lineal de la curva de calibración

$$R^2 = 0,994$$

fd: factor de dilución

## **1.2. Inhibición Lipídica**

### **Preparación de las muestras**

Se prepararon muestras de 50 g de carne molida en forma de círculos de 55 mm de diámetro. Este procedimiento se realizó sin condimentación para evitar la posible interferencia de la acción de estos en el retardo de la oxidación, se colocaron las muestras en baño de Maria hasta alcanzar 70 °C en su interior, y garantizar retardar el probable deterioro microbiológico antes de la oxidación, luego se recubrieron con cera dejando expuesta solo la superficie exterior de una de las caras, para limitar la oxidación de la muestra por otras áreas que no fuera la superficie externa y se colocaron en la parte superior de una placa petri estéril, empleada como soporte de las muestras, se cubrieron con la película de 90 mm de diámetro de forma que ajustara totalmente a la placa y se almacenaron a 6 – 7 °C (condiciones de refrigeración que favorecen la aparición del fenómeno a evaluar).

En cada muestreo se tomaron 2 muestras control sin contacto con la película y 2 muestras en contacto con la película, para ambos casos se seccionó una lasca superficial de 2 mm de espesor (considerando que la acción de inhibición lipídica es fundamentalmente superficial). Las lascas superficiales se trituraron, se homogenizaron y se formaron porciones de 10 g por separado para realizar la determinación por la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TBA.

La frecuencia de muestreo fue diaria hasta los 3 días y luego se alargó hasta el día 10 y 20 en función del comportamiento mostrado por la película (liberación lenta).

### **Determinación de la inhibición lipídica por el método de TBA**

Los 10 g de muestra se homogeneizaron con 50 mL de agua destilada a la que se la añadió previamente 100 µL de BHT (protección a la oxidación propia del procedimiento analítico) y luego 50 mL de solución de HCL (0.4N), esta mezcla se trasvasó a un balón de destilación. El destilado se enrasó con agua destilada, en un matraz aforado de 50 mL. En un tubo de ensayo de 10 mL se añadieron 5 mL del mismo y 5 mL de la solución 0,20 mol/L de TBA, se introdujo en un baño a 80 °C durante 90 min y finalmente se midió la absorbancia a 532 nm, en un espectrofotómetro<sup>20</sup>.

El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente forma:

% de inhibición =  $100 - (\text{Abs}_{\text{mp}} / \text{Abs}_{\text{msp}}) \times 100$ , donde:

$\text{Abs}_{\text{mp}}$  absorbancia medida de la muestra con película

$\text{Abs}_{\text{mp}}$  absorbancia medida de la muestra con película

$\text{Abs}_{\text{msp}}$  absorbancia medida de la muestra sin película (control)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 1 muestra el contenido total de fenoles, posibles responsables de la capacidad antioxidante de la película conteniendo el extracto. En general se aprecia una tendencia a la estabilidad en los valores en el tiempo.

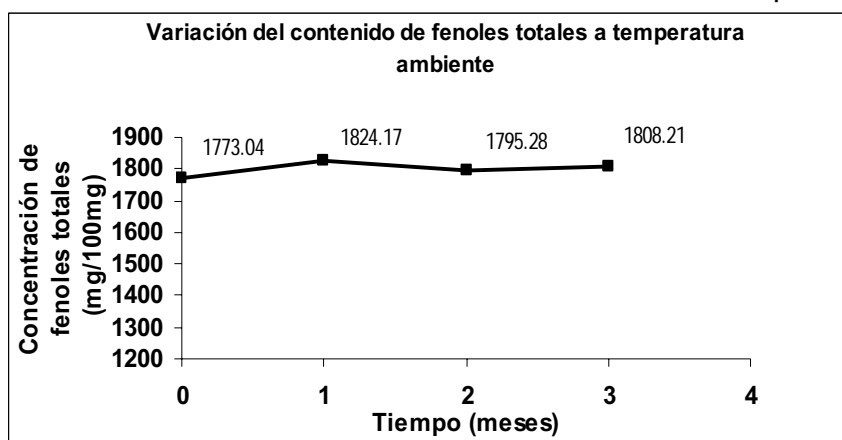


Fig. 1 Variación del contenido de fenoles totales de una película base almidón con extractos de propóleos almacenada a temperatura ambiente por 3 meses.

Los valores del contenido de fenoles totales obtenidos para la película en estudio expresados como mg de ácido gálico/ g de películas fueron de **17.73**, mínimo a **18.24** mg GA/g película, máximo. Para la actividad antioxidante, descrita como la capacidad para inhibir la acumulación de especies oxidativas, así como radicales libres, el valor obtenido de los análisis fue de  $319,86 \pm 1,18 \mu\text{M Fe}^{2+}/100 \text{ g}$ .

Se conoce que el propóleo contiene una amplia variedad de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides. Las variaciones en el contenido de fenoles se puede atribuir principalmente a las diferencias en la vegetación circundante a la colmena. No existe un procedimiento único para evaluar la capacidad antioxidante y las correlaciones entre el contenido de fenoles totales y la determinación de capacidad antioxidante no son completamente lineales porque el método de Folin-Ciocalteu es específico para compuestos fenólicos, y la actividad antioxidante también puede ser exhibida por compuestos no fenólicos. Es también posible que se presenten interacciones antagonistas o sinergistas entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos que pueden afectar la actividad antioxidante.<sup>21</sup>

Para extractos de diferentes regiones de Colombia se han informado resultados similares,<sup>22</sup> con valores de fenoles totales de 22,11 a 75, 02 mg de ácido ascórbico AAC/g de extracto etanólico de propóleos EEP, en correspondencia con una capacidad antioxidante, medida por FRAP de 40,9 a 338,4  $\mu\text{mol AAE/g EEP}$ .

De esta manera, altos valores representan una actividad antioxidante superior; indicando respectivamente, mayor capacidad para captar radicales libres mediante transferencia de hidrógeno, y/o para reducir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . En la Tabla 1 se muestra el grado de inhibición obtenido.

Tabla 1. Resultados de la evaluación del % de inhibición lipídica de la película

Tiempo(días)	0	1	2	3	10	20
% Inhibición	0	1	4	9	25	13

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - (\text{Absmp} / \text{Absmsp}) \times 100$$

Absmp: Absorbancia muestra con película; Absmsp: Absorbancia muestra sin película

Se aprecia que ocurre la inhibición, con una tendencia al incremento en el tiempo, hasta el lógico agotamiento de los activos o compuestos antioxidantes presentes. A partir del contacto inicial la diferencia es poco notable, haciéndose más evidente del tercer día al décimo y a partir de este disminuye la inhibición. En trabajos anteriores donde se caracterizó la estructura de la película por difracción de rayos x, espectrofotometría infrarroja y microscopia óptica<sup>13</sup> se determinó que el extracto de propóleos incluido en la formulación no reaccionaba químicamente con otros componentes de la matriz, solo se mantenía atrapado en la estructura, por tanto es de esperar que la desorción a la carne no sea instantáneamente, sino de modo mas lento, como es característico además en este tipo de películas. De igual modo influye la naturaleza sólida de la matriz evaluada (carne) que hace más lenta la difusión del principio activo. La presencia de humedad en exceso, propia de la composición de la carne es quien estimula la liberación al penetrar en la matriz de la película.

Según los mecanismos de oxidación de los lípidos lo que se produce, con el empleo de los antioxidantes naturales clasificados como antioxidantes de tipo primario es un retardo en la velocidad de propagación de la oxidación por la acción de estos sobre determinados radicales,<sup>22,23,24</sup> de modo que aun cuando las evaluaciones muestran valores de oxidación, hay diferencias en los valores obtenidos para las muestras cubiertas con películas, por la acción del propóleos como principio activo contenido en la película y dicha acción se produce en el tiempo.

## CONCLUSIONES

Los resultados mostraron una tendencia a la inhibición lipídica de la película en carne molida, más perceptible entre el tercer y el décimo día, equivalente a un 25 %.

El contenido total de fenoles se mantuvo en los tres meses evaluados estables, por lo que se mantiene la capacidad antioxidante de la película.

La capacidad antioxidante de la película con extracto de propóleos rojo cubano, medida por FRAP fue de  $319,86 \pm 1,18 \mu\text{M} / 100 \text{ g}$  expresado como oxidación del ión ferroso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peña RC. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Cienc Inv Agr.* 2008; 35(1):17-26.
2. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001;15(7):561-571.
3. Kooa H, Gomes BP, Rosalena PL, Ambrosanoa G; Parkb YK; Curya JÁ. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. *Archives of Oral Biology.* 2000; 45 (2), 141–148.
4. Cerezal, P.; Ponce, J. y Quilobrán, C. Aplicaciones de propóleos como preservante natural en la conservación de pulpa de manzana por factores combinados, 2008. Universidad de Antofagasta, Chile
5. Vargas Sánchez, R. D. Capacidad antioxidante y antimicrobiana de los propóleos en hamburguesas de bovino, 2011. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), Hermosillo, Sonora, México.
6. Isla, M. I.; Nieva Moreno, M. I.; Sampeiro, A. R.; Valtuone, M. A. Antioxidant activity of Argentina propolis extracts .*Journal of Ethanopharmacology*, 2001, 76 , 165-170.
7. Quintero, C. J.; Falguera, V.; Muñoz, H. A,. Films and edible coatings: importance, and recent trends in fruit and vegetable value chain. *Revista Tumbaga*, 2010; (5) 93-118
8. Álvarez, J.D.; Granadillo, J.; Tabio, C. Cromatografía en capa delgada como método de clasificación del propóleos cubano. *Ciencia Tecnología Aplicada* 1989; (5):51.
9. Cuesta-Rubio, O. Estudio químico de los propóleos cubanos. [Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas]. 2001, Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana.
10. Marrero, Y. Composición química de propóleos rojos cubanos. Parte I. [Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas].2005, Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana.
11. Campo, F. M,. Estudio químico de propóleos rojos cubanos. [Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas]. Instituto de Farmacia y Alimentos,2007. Universidad de la Habana.
12. Lecaro, G. A,. Estudio químico de una muestra de propóleos. [Tesis en opción al título de Master en Química Farmacéutica]. 2008 Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana.



13. Quijije A.. Estudio físico-químico y microbiológico de la formulación propolis. [Tesis en opción al título de Master en Química Farmacéutica], 2008. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana.
14. Cha D. S. y Chinnan M. S. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 2004, (44), 223–37
15. Weber GH, Haugard V, Festersen R, Bertelsen. Production and applications of biobased packaging materials for the food industry. *Food Addit Contamin* 2002, 19(Supplement), 172–177.
16. Tharanathan RN. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends Food Sci Technol* 2003, (14), 71–78.
17. Lopez-Rubio A, Gavara R, Lagaron JM. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends Food Sci Technol*, 2006,17(10):567–75.
18. Chang, L., Martino, M y Rodríguez, J.. Influencia de la incorporación de extracto de propóleos rojo cubano en las propiedades funcionales de una película base almidón. II Jornadas Internacionales sobre avances en la tecnología de películas y coberturas funcionales en alimentos, del 17 al 18 de mayo de 2010, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
19. Benzie, I. F. ; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 1996, (239), 70-76.
20. Rhee, Ki. Minimization of further lipid peroxidation in the distillation 2-thiobabutaric acid test of fish and meta. *Journal of food Science* 1978. Vol 43 (6), 1776-1778.
21. Palomino, L. R.; García, C. M.; Gil, J. H.; Rojano, B. A.; Durango, D. L. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Atioquia (Colombia). *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 2009,16 (3),388-395 Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia .
22. Ladikos D.and V. Lougovois T. Lipid Oxidation in Muscle Foods: A Review, *Food Chemistry* 1990; 35, 295-314.
23. MacDonald-Wicks, L. K.; Wood, L. G.; Garg, M,. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci Food Agric.* 2006; 86(13), 2046-2056.
24. Amarowicz R.and R.B. Pegg. Assessment of the antioxidant and pro-oxidant activities of tree nut extracts with a pork model system *J. Food Lipids* 2005, 12, 344-358.