

## Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos convencionales y por fluidos supercríticos de *Larrea cuneifolia* y propóleos para su uso en tecnología alimentaria

Florencia López Airaghi<sup>1</sup>; Lucrecia Corral<sup>1</sup>; César Acosta<sup>2</sup>; Alfredo R. Salguero<sup>2</sup>; Héctor J. Boggetti<sup>2</sup>; Mariela González<sup>1</sup> & María L. Tereschuk<sup>1</sup>

(1) *Cátedra de Química Orgánica. Departamento de Ingeniería de Procesos y Gestión Industrial, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Universidad Nacional de Tucumán. flairaghi@gmail.com*

(2) *Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad de Santiago del Estero boggetti@unse.edu.ar*

**RESUMEN:** Actualmente el objetivo de los estudios sobre propóleos y especies vegetales como nuevas fuentes de antioxidantes y antimicrobianos naturales, es utilizarlos en alimentos funcionales y preparados farmacéuticos con el fin de reemplazar los antioxidantes sintéticos, que están siendo restringidos debido a sus potenciales riesgos para la salud y toxicidad. Las tecnologías nuevas de extracción llamadas “limpias”, como las de fluido supercrítico, están a la vanguardia hoy en día por la rapidez para obtener extractos y por su eficiencia. El objetivo de este trabajo es comparar la eficiencia de extracción de principios activos mediante el método convencional (EC) y extracción supercrítica (ESC), estudiando la actividad antimicrobiana. Se analizó una muestra de propóleos (Camino a las Arcas 2010) y una especie vegetal (*Larrea cuneifolia*), ambos cosechados al norte de la provincia de Tucumán. Para el caso de *Larrea cuneifolia*, el rendimiento logrado fue superior en EFS que en EC, mientras que en propóleos sucedió lo contrario. En la composición química, ambos presentaron perfiles similares en compuestos de naturaleza fenólica. La actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos por ambas técnicas se mantuvo frente a *S. aureus*, pudiendo inferir que los compuestos fenólicos presentes son, al menos en parte, responsables de esta actividad.

### 1 INTRODUCCION

Los alimentos funcionales contienen algunos componentes que además de la función de nutrición, juegan un importante rol en el mejoramiento de la salud humana (Sun, 2007).

Los compuestos fenólicos se pueden encontrar en vegetales, frutas, miel, propóleos y bebidas provenientes de plantas como ser el té y el vino. Este tipo de compuestos son beneficiosos para la salud humana en la prevención de enfermedades ligadas al estrés oxidativo y como conservantes por sus propiedades antimicrobianas (Prior, 2013; Zampini, 2009).

El propóleos, del griego *propolis* (defensor de la ciudad), es una resina cerosa de composición

compleja, elaborada por las abejas a partir de resinas vegetales y secreciones propias (Asis, 1991). Sus principales componentes son flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, con efectos biológicos y farmacológicos. Se le atribuyen propiedades antiinflamatoria, inmunoestimulante, antimicrobiana, antiviral, entre otras. Desde 2008, el propóleos y subproductos fueron incorporados al Código Alimentario Argentino (CAA), Resolución Conjunta SPReI N° 94/2008 y SAGPyA N° 357/2008.

En la flora nativa de la provincia de Tucumán, se detectaron numerosas especies reconocidas con actividad biológica y usos en alimentación, pertenecientes a diversas familias. Estas resultaron ser factibles de usar en tecnología

alimentaria al ser una potencial fuente de estructuras químicas activas (Ej: flavonoides).

Una especie reconocida del Noroeste argentino es *Larrea cuneifolia*, perteneciente a la familia Zygophyllaceae. Es un arbusto de tallos leñosos, cilíndricos y resinosos, que presenta actividad biológica por su contenido de flavonoides y compuestos fenólicos, además de otros metabolitos de interés (Harborne y Williams, 2000). Esta especie seleccionada para este trabajo ya fue estudiada desde el punto de vista biológico, aunque no se estudió frente a todos los agentes patógenos de alimentos. (Quiroga, 2004; Zampini, 2007).

Cobra fundamental importancia el estudio en paralelo de propóleos y especies vegetales, a fin de evaluar la posible presencia de algunos metabolitos secundarios existentes coincidentemente en ambos. En algunos casos, este hallazgo sugiere la posibilidad de que ésta fuera una de las especies vegetales más visitada por la abeja *Apis mellifera* (Agostini, 2004).

Actualmente, debido al incremento en el consumo de alimentos saludables se han desarrollado muchas investigaciones para obtener las sustancias que los componen de una forma segura, rápida y de bajo costo. En general, la extracción de éstos compuestos se realiza a través de solventes orgánicos, pero resultan poco efectivos por ser tóxicos, inflamables, poco selectivos y muy laboriosos.

Una buena alternativa para solucionar estos problemas se encuentra en el uso de la extracción supercrítica (ESC) ya que además de su seguridad, pueden obtenerse mejores resultados porque tienen la capacidad de disolver o extraer un mayor número de estos componentes con una mejor calidad y mediante un proceso más eficaz.

Los beneficios de aplicar la tecnología de ESC en la industria de alimentos son varios, comenzando por su respuesta a las demandas de producir sin dañar el medio ambiente, ya que en general los fluidos utilizados en esta técnica (generalmente anhídrido carbónico) no son contaminantes. La industria química requiere de éstos fluidos para su desarrollo sostenible ya que evitan los problemas de residuos en los productos finales, los riesgos para el personal de laboratorios de los compuestos orgánicos volátiles y su descarga a la atmósfera. Es por esto que la extracción por fluidos supercríticos es considerada una aplicación de tecnologías "limpias" (Brunner, 2005).

El objetivo de este trabajo es evaluar los recursos naturales autóctonos con la aplicación de tecnologías "limpias", que se realizan en conjunto con la UNSE, en comparación con la extracción convencional por solventes orgánicos, estudiando

el perfil químico de los extractos y la actividad antimicrobiana.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material

Se analizaron una muestra de propóleos (Camino a las Arcas 2010) y una especie vegetal (*Larrea cuneifolia*) ambos cosechados al norte de la provincia de Tucumán. La identificación de la especie ensayada fue realizada por el Lic. Alberto Slanis y un espécimen se encuentra depositado en el Herbario de la Fundación Miguel Lillo (LIL), Tucumán.

La cosecha del propóleo se realizó mediante técnica de raspado y usando mallas en colmenas de abejas *Apis mellifera*.

### 2.2 Métodos de extracción

#### 2.2.1 Extracción Convencional

Se colocó una porción de la muestra de propóleos (1 gr.) y de la especie vegetal (5 gr.) en erlenmeyers donde se maceraron con 10 y 20 mL de etanol 80% respectivamente, durante 48 hs. La muestra de propóleos se sonicó durante 15 minutos a 25°C. Luego se filtraron por gravedad. Los residuos sólidos fueron resuspendidos en el mismo solvente para el caso de propóleos y etanol 50% para *Larrea cuneifolia* hasta agotamiento. Los extractos fueron reunidos y concentrados en evaporador rotatorio a presión reducida a una temperatura no mayor a 50°C. Estos extractos se los denominó convencional (EC). La eficiencia del proceso viene dada por su rendimiento que se expresa en por ciento (%).

#### 2.3 Extracción supercrítica

Se tomaron aproximadamente 0,5 gr. de las muestras y se colocaron en la celda de extracción. El fluido extractor, el dióxido de carbono, mezclado con un 10 % de etanol como modificador orgánico, se presuriza usando nitrógeno desde un cilindro conectado a un vaso de presurización para obtener las condiciones supercríticas (90 atmósferas y 60°C de temperatura). El tiempo de extracción para cada muestra fue de 30 minutos y el material extraído se recibió en etanol. El equipamiento básico utilizado en este trabajo es un extractor construido en los talleres de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE). Los extractos fueron reunidos y concentrados en evaporador rotatorio a una temperatura no mayor a 50°C. Estos extractos fueron denominados supercríticos (ESC). El rendimiento de extracción se expresó en por ciento (%).

### 2.3 Cromatografía en capa delgada

La composición de los extractos (EC y ESC) se analizaron por técnicas cromatográficas en capas finas (TLC) según Wagner y Bladt (1996), en particular el contenido de sustancias del tipo flavonoides. Se utilizó placas de sílica gel G60 con indicador de fluorescencia F<sub>254</sub>. Los cromatofolios de activaron en estufa 20 minutos a 110°C para eliminar humedad. Se sembraron las muestras de propóleos y del extracto vegetal a una concentración de 20 µg/mL. En el caso de los estándares la concentración fue de 0,5 µg/mL. En la cámara de desarrollo se colocó el eluente ciclohexano; acetato de etilo; ácido acético en relación 31:14:5 para propóleos y tolueno; acetato de etilo; ácido acético; metanol 4:1:1:1 para la especie vegetal. Se saturó en esta fase móvil por 12 hs para lograr corridas más veloces y homogéneas. Las placas secas fueron reveladas físicamente mediante luz UV de onda corta y onda larga (254 nm y 365nm).

### 2.4 Actividad Antimicrobiana

Se siguió el método de Rahalison (1991) modificado, frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). En los ensayos bioautográficos se estudiaron los extractos usando como control positivo Gentamicina y control negativo etanol 80%, solvente utilizado para ambas muestras. Se sembraron los extractos a una concentración final de 10 mg/mL.

## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Métodos de extracción

Se obtuvieron los extractos tanto de propóleos como *Larrea cuneifolia* por método convencional y por extracción supercrítica. La eficiencia de la extracción se evaluó como la cantidad de extracto obtenido sobre la cantidad de muestra seca inicial, por 100 gr. de muestra. Los resultados alcanzados se expresan en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Rendimiento de la extracción por EC y ESC

Muestras	Rendimiento EC [%]	Rendimiento ESC [%]
<b>Propóleos Camino a las Arcas 2010</b>	32,19	29,31
<i>Larrea cuneifolia</i>	27,76	34,56

Como se puede observar en la Tabla 1, el rendimiento en la extracción supercrítica es mayor que en la convencional para *Larrea cuneifolia*, sin embargo el rendimiento de los propóleos fue ligeramente mayor para la EC.

### 3.2 Perfiles cromatográficos

Se observó similares perfiles cromatográficos con los extractos convencionales y supercríticos tanto para propóleos como para *Larrea cuneifolia*. Ambas muestras, obtenidas por ESC revelaron un perfil similar a la de las EC.

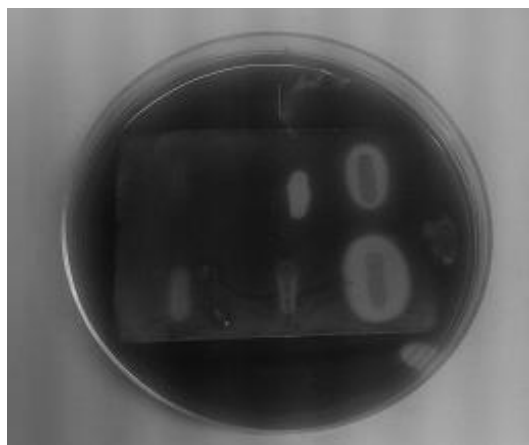
En cuanto a la eficiencia en la EFS en propóleos, según las condiciones aplicadas, se extrajeron todos por el grupo de la UNSE. La ESC extrajo los mismos compuestos que la EC pero a menor concentración. Esto podría deberse a que sólo se realizó una corrida del mismo, es decir, no se agotó la droga. y a las propias variabilidad del método. Por el contrario, en la especie vegetal se observó que los compuestos de mayor y menor polaridad fueron extraídos por ESC, aunque la EC reveló una mayor variedad de los mismos.

### 3.3 Actividad antimicrobiana

Al realizar el estudio de actividad antimicrobiana se observó que ambos tipos de extracción mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *E.coli*, como se muestran en la Fig.1.y en la Tabla 2

**Tabla 2.** Resultados de actividad antimicrobiana de los extractos convencionales y supercríticos.

Muestras	<i>S. aureus</i>
<b>Propóleos Camino a las Arcas 2010 (EC)</b>	+
<b>Propóleos Camino a las Arcas 2010 (ESC)</b>	+
<i>Larrea cuneifolia</i> (EC)	+
<i>Larrea cuneifolia</i> (ESC)	+



**Figura 1.** Método bioautográfico con EC y ESC frente a *Staphylococcus aureus*.

#### 4 CONCLUSIONES

Los beneficios de aplicar la tecnología de extracción por fluidos supercríticos en la industria de los alimentos son varios, comenzando por su respuesta a las demandas de producir sin dañar el medio ambiente, ya que en general los fluidos utilizados no son contaminantes, sumado a que requiere menos tiempo y menor cantidad de solvente.

Los rendimientos logrados por las muestras fueron mayores en la técnica de extracción supercrítica para la especie vegetal y ligeramente menor para propóleos en comparación con la extracción convencional. No obstante, dependiendo de la muestra tratada, la extracción por fluidos supercríticos muestra un carácter más prometedor que la técnica convencional en la extracción de compuestos.

La actividad antimicrobiana tanto de propóleos como de *Larrea cuneifolia* por ambas técnicas se mantuvieron, acorde a lo esperado en el estudio de la bibliografía y trabajos precedentes (Isla, 2005; Park, 2002), lo que lleva a pensar que los compuestos extraídos y que según los resultados obtenidos por los métodos cromatográficos son de naturaleza fenólica, podrían considerarse responsables de la actividad antimicrobiana.

El aporte de estos estudios será proponer la asociación de compuestos bioactivos para ser considerados por la industria alimentaria como alternativa válida y relativamente económica en el desarrollo de alimentos funcionales sin el agregado de conservantes artificiales.

#### 5 REFERENCIAS

- Agostini, L. R., Morón Jiménez, M. J., Ramón, A.N. & Ayala Gómez, A., Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, volumen 54(1), 2004.
- Asis M. Propóleos oro púrpura de las abejas. *La Habana: CIDA Pp62 -70*. 2ª Edición., 1991.
- Brunner, G, Supercritical fluids: technology and application to food processing". *J. Food Eng.*, 67:21-33, 2005.
- Harborne J.B & Williams C.A., Review. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 441-504, 2000.
- Isla, M.I., Paredes Guzman, J.F., Nieva Moreno, M.I., Koo, H. & Y.K. Park, Some Chemical Composition and Biological Activity of Northern Argentine Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (4): 1166 - 1172, 2005.
- Park, Y. K., De Alencar, S. M., Scamparini, A. R. P. & Aguiar, C. L. Propolis produzida no sul da Brasil, Argentina e Uruguai. Evidencias fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciencia Rural*, 32 (6): 997 - 1003, 2002.
- Prior, R. & R. Wu, Diet antioxidant capacity: relationships to oxidative stress and health, *Am. J. Biomed. Sci.*, 5 (2), 126-139, 2013.
- Quiroga, E. , Sampietro A.R. & M.A. Vattuone, In vitro fungitoxic activity of *Larrea divaricata* cav. Extracts. *Letters in Applied Microbiology.*, volume 39, Issue 1, pages 7-12, 2004.
- Rahalison, L.; Hamburguer, M.; Hostettman, K.; Monod, M. & Frenk, E., A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis* 2, 199-203, 1991.
- Sun, Y., Hayakawa, S., Ogawa, M. & K.IZUMORI, Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-psicose. *Food Control*. 18, 220-227, 2007..
- Wagner H. & Blatt S., *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Second Edition. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 169-224, 1996.
- Zampini, I. C., Cudmani, N. & Isla, M. I., Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquím. clín. latinoam.* [online], Vol.41, n.3, 2007.