

Artículo científico

Cuantificación de prolina libre en la dieta del ganado meliponícola de las provincias de Matanzas y Mayabeque[▲]

Quantification of free proline in the diet of the stingless bee livestock of the Matanzas and Mayabeque provinces[▲]

Leydi Fonte-Carballo¹, Ana María González-Paramás², David Rodríguez-de la Cruz³, Maykelis Díaz-Solares¹, Dariel Morales-Querol¹, Liliet González-Sierra¹, Nancy Altunaga-Pérez¹, Inelvis Castro-Cabrera¹ y Yudit Lugo-Morales¹

¹Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, Universidad de Matanzas, Ministerio de Educación Superior, Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba.

²Facultad de Farmacia, Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Salamanca, España.

³Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Universidad de Salamanca, España

Correo electrónico: leydis.fonte@ihatuey.cu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2167-4288>

Resumen

Una nutrición óptima mediante el consumo de una dieta equilibrada, rica en aminoácidos, es imprescindible para el buen funcionamiento del sistema inmune de los animales. Por ello, este trabajo tuvo como objetivo determinar la cantidad de prolina libre, presente en los alimentos consumidos (polen y miel) por el ganado meliponícola en las provincias de Matanzas y Mayabeque. Para realizar la determinación de prolina libre mediante espectrofotometría, se tomaron 60 g de polen, provenientes de torales sellados, y 80 mL de miel en cada una de las diez colmenas muestreadas (cinco por provincia), elegidas al azar. Después de verificar que los datos cumplieron con los supuestos de homogeneidad de varianza y distribución normal, se procedió a realizar un análisis de varianza simple. Las medias se compararon por el test de Duncan, para un nivel de significación de 5 %. Para todos los análisis se utilizó el paquete estadístico Infostat[®], versión 1.1. Los resultados indicaron que, desde el punto de vista estadístico, la cantidad de prolina libre encontrada en las mieles procedentes de ambas provincias, difirió significativamente. Mientras, los valores de prolina libre hallados en el polen procedente de Matanzas, estuvieron en el rango de 4,2 a 19,5 mg/g. El que procedió de Mayabeque presentó valores de 5,9 a 7,1 mg/g. Se concluye que las mieles, como los pólenes, que constituyen la fuente de alimentación del ganado meliponícola de ambas provincias, cuentan con una proporción adecuada de prolina libre. Por tanto, la masa ganadera ubicada en ambas zonas tiene el soporte aminoacídico necesario en su dieta para desarrollar una respuesta inmune adecuada ante cualquier agente microbiano.

Palabras clave: aminoácidos, miel, polen

Abstract

An optimum nutrition through the consumption of a balanced amino acid-rich diet is essential for the good functioning of the immune system of animals. For such reason, the objective of this work was to determine the quantity of free proline, present in the consumed feedstuffs (pollen and honey) by the stingless bee livestock in the Matanzas and Mayabeque provinces. To determine the free proline through spectrophotometry, 60 g of pollen were taken, from sealed amphorae, and 80 mL of honey in each of the ten randomly chosen sampled beehives (five per province). After verifying that the data fulfilled the assumptions of variance homogeneity and normal distribution, a simple variance analysis was performed. The means were compared by Duncan's test, for a significance level of 5 %. For all the analyses the statistical package Infostat[®], version 1.1, was used. The results indicated that, from the statistical point of view, the quantity of free proline found in the honeys from both provinces significantly differed. Meanwhile, the free proline values found in the pollen from Matanzas, were in the range from 4,2 to 19,5 mg/g. The one from Mayabeque showed values from 5,9 to 7,1 mg/g. It is concluded that the honeys, like the pollens, which constitute the feeding source of the stingless bee livestock of both provinces, have an adequate proportion of free proline. Thus, the livestock located in both zones has the necessary amino acid support in its diet to develop adequate immune response to any microbial agent.

Keywords: amino acids, honey, pollen

[▲]Trabajo presentado en la V Convención Internacional Agordesarrollo 2019 celebrada del 22 al 26 de octubre del 2019. Centro de Convenciones Plaza América. Varadero, Cuba.

[▲]Paper presented in the 5th International Convention Agordesarrollo 2019 celebrated on October 22-26, 2019. Plaza America Convention Center. Varadero, Cuba

Introducción

En Cuba, el ganado meliponícola está compuesto por todas las colmenas manejadas, pertenecientes a la especie *Melipona beecheii* Bennett, 1831 (Apidae: Meliponini), censadas o no (Lóriga, 2015). Como en cualquier otro rebaño, es de vital importancia el mantenimiento de la salud de los animales por medio de la acción de los mecanismos de defensa (colectivo e individual) que proporciona el sistema inmune.

En las abejas, este sistema consta de componentes celulares y humores (Bulet *et al.*, 1999). Los mecanismos de defensa celular están mediados por hemocitos, que residen en la hemolinfa y participan especialmente en la fagocitosis y en la encapsulación (Chapman, 2013). La respuesta humoral involucra la síntesis de péptidos antimicrobianos, que actúan en respuesta a infecciones producidas por bacterias, hongos y parásitos (Gätschenberger *et al.*, 2013).

Según Gutiérrez y Orduz (2003), entre los péptidos antimicrobianos más estudiados se encuentra la abaecina, presente en la hemolinfa de las abejas, compuesta entre 34 y 39 aminoácidos. La prolina, que se destaca entre estos aminoácidos, tiene marcada actividad antimicrobiana ante bacterias gram positivas y gram negativas.

Para poder funcionar, los sistemas biológicos necesitan de elementos nutricionales que provienen de un conjunto de alimentos suministrados mediante la dieta. En las abejas, estos corresponden, principalmente, al polen y al néctar (Brodschneider y Crailsheim, 2010). Ambos resultan de vital importancia para el sistema inmunológico de estos insectos (Di Pasquale *et al.*, 2013).

A partir de lo anterior, por la importancia que tiene el aporte de este aminoácido en la dieta de las abejas para el buen funcionamiento de su sistema inmune, este trabajo tuvo como objetivo determinar la cantidad de prolina libre, presente en los alimentos consumidos (polen y miel) por el ganado meliponícola en las provincias de Matanzas y Mayabeque.

Materiales y Métodos

Localización. El estudio se realizó en dos meliponarios. Uno está ubicado en la zona de Pastorita, municipio Matanzas, en la provincia de Matanzas, y el otro se encuentra en la zona del Consejo Popular Norte del municipio San Nicolás, en Mayabeque.

Muestras. Se seleccionaron 10 colmenas al azar, cinco en cada escenario. En Mayabeque se eligieron las colmenas 14, 2, 48, 5 y 6. En Matanzas se seleccionaron la 1, 9, 11, 12 y 13. En cada una de las colmenas, se tomaron de torales sellados 60 g de polen meliponícola y 80 mL de miel. Los muestreos se realizaron en abril del 2018.

Curva de calibración. Se estableció mediante la utilización de patrones de prolina de diferente concentración, sometidos al mismo proceso indicado para las muestras. Se elaboró la curva de calibración con los datos de absorbancia de los patrones a partir de las diferentes concentraciones de prolina y se halló la ecuación de la recta de calibrado.

Determinación de prolina libre en miel. Se pesaron, con precisión de 0,1 mg aproximadamente, 2,5 g de miel homogenizada. Se disolvieron en agua mediante el uso del agitador magnético. Luego, se trasvasaron a un matraz aforado de 5 mL, y se enrasó la disolución. Posteriormente, se tomaron 0,5 mL y se le añadieron 0,25 mL de ácido fórmico (H-COOH) al 98 %, proveniente de la suministradora de materiales de laboratorio PROLABO, y 1 mL de disolución de ninhidrina al 3 %. De igual manera, se preparó un blanco, en el que se sustituyó la solución de trabajo por 0,5 mL de agua destilada. Posteriormente, se cerraron los tubos, se agitaron y se mantuvieron 15 minutos en baño de agua en ebullición. Una vez terminado este proceso, se retiraron del agua caliente y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron 5 mL de la solución de isopropanol-agua y se agitó fuertemente. Por último, se procedió a medir la absorbancia a 517 nm con respecto al blanco, que se trató igualmente en los 35 minutos que siguieron al enfriamiento.

Cálculos y expresión de los resultados. Si C son los $\mu\text{g/mL}$ de prolina, obtenidos de la curva de calibrado, y P (g) es el peso de la miel que se utilizó en la muestra objeto de análisis, se tendría que:

$$\mu\text{g prolina} = 5C$$

$$\text{mg/kg de miel} = 5C/P$$

Determinación de prolina en polen. Se procedió a la extracción de los aminoácidos libres. Para ello, se pesaron con precisión de 0,1 mg aproximadamente, 0,25 g de polen meliponícola y se le adicionaron 25 mL de etanol al 80 %. Posteriormente, durante 30 segundos, se disgregó la disolución con el sonicador. Luego, se mantuvieron en agitación durante 15 minutos antes de proceder a la centrifugación (5 min. a 10 000 r.p.m.) y decantación del sobrenadante. Este procedimiento de extracción se

realizó dos veces más sobre el precipitado. El extracto etanólico resultante se llevó a sequedad en el rotavapor, sin superar los 40 °C. Posteriormente, el residuo se resuspendió en agua ultrapura y se enrasó a 25 mL. Para su filtrado, se utilizaron filtros millipore de 0,45 micras. Por último, se tomaron 0,5 mL del filtrado y se procedió como en la determinación en miel.

Cálculos y expresión de los resultados. Si x es la concentración de prolina, medida en la recta de calibrado, entonces:

$$\mu\text{g pro/mL} = x$$

$$\text{En los 25 mL, mg pro} = x \times 25/1000 = C$$

$$\text{En P (g) de polen, mg prolina/g de polen} = C/P$$

Análisis estadístico. Después de verificar el cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianza mediante la prueba de Levene, y luego de la distribución normal de los datos, de acuerdo con Shapiro-Wilk, se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA). Se utilizó el paquete estadístico Infostat®, versión 1.1. Para la comparación de las medias, se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para un nivel de significación de $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

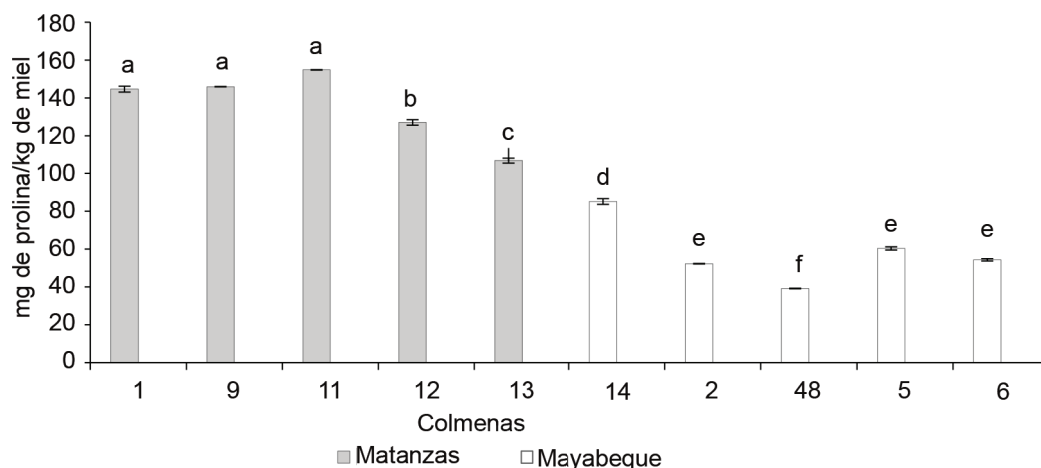
Como muestra la figura 1, la cantidad de prolina encontrada en las mieles procedentes de ambas provincias varió considerablemente, con valores entre 39,2 mg/kg (colmena 48) y 154,8 mg/kg (colmena 11). Desde el punto de vista estadístico, también hubo diferencias significativas entre las mieles de las dos provincias, a excepción de las colmenas 1, 9 y 11 de Matanzas, y 2, 5 y 6 de Mayabeque. En esto

podría haber influido que los aminoácidos libres en la miel provienen, mayoritariamente, de los recursos florales que las abejas visitan de forma selectiva. Este criterio coincide con lo informado por Truzzi *et al.* (2014), quienes encontraron diferencias en las cantidades de prolina, según la procedencia botánica.

En Chile, resultados similares obtuvo Sanhueza-Rojas (2016), al analizar muestras de mieles de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Este autor informó gran variabilidad en los valores de prolina, incluso para muestras provenientes de un mismo sector y similar origen floral. Esto se explica porque, en el caso particular de la miel, una parte importante de la prolina la aporta la abeja, y tiene su origen en el polen consumido durante las primeras etapas de su vida (Crane, 1990).

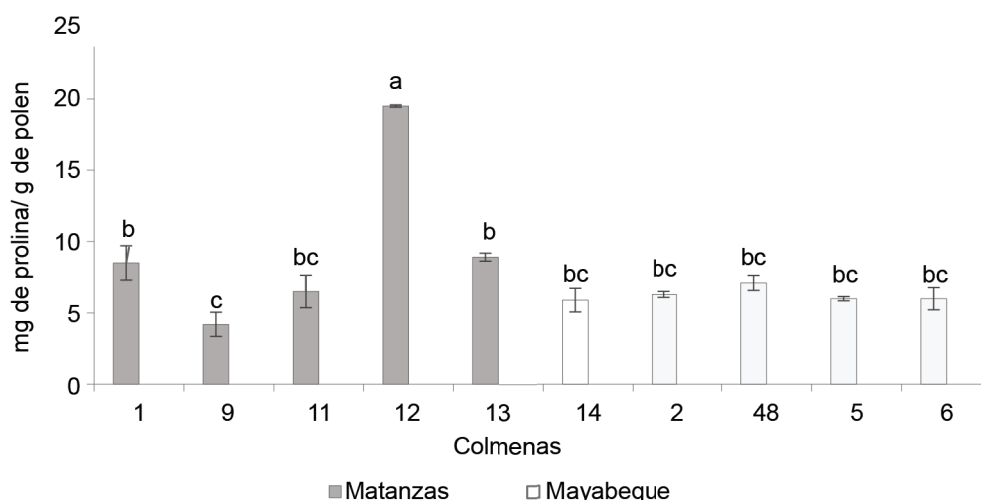
Según Bosi y Battaglini (1978), las mieles genuinas de *Apis mellifera* deben contener un mínimo de 180 mg de prolina/kg de miel. Sin embargo, es necesario considerar que existen grandes variaciones, según el tipo de miel y el género de abeja del que proviene. En el presente estudio, ninguna de las mieles muestreadas exhibió cantidades de prolina cercanas a ese valor.

El polen, según Brodschneider y Crailsheim (2010), es uno de los componentes más importantes de la dieta de las abejas, y constituye la fuente proteica/aminoácida principal. Como se muestra en la figura 2, los valores de prolina encontrados en el polen procedente de Matanzas estuvieron en el rango de 4,2 a 19,5 mg/g. Se destacó la colmena 12, donde se halló la mayor cantidad de prolina, que



Letras diferentes indican diferencia significativa para $p \leq 0,05$.

Figura 1. Cantidad de prolina en la miel procedente de las colmenas de Matanzas y Mayabeque.



Letras diferentes indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

Figura 2. Cantidad de prolina en polen en base seca, procedente de las colmenas de Matanzas y Mayabeque.

difirió estadísticamente de la encontrada en el resto de las colmenas. La colmena 9 fue la de menor resultado, aunque no difirió estadísticamente de lo obtenido en la 11, y en todas las colmenas pertenecientes a Mayabeque.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de prolina en las colmenas de Mayabeque (figura 2). Los valores estuvieron entre 5,9 y 7,1 mg/g.

Estos resultados están en los parámetros informados por Baldi-Coronel *et al.* (2004) en estudios bromatológicos de pólenes argentinos, en los que se hallaron valores de prolina desde 2,30 mg/g a 24,30 mg/g. Generalmente, la prolina es el aminoácido libre más importante en los pólenes maduros. No sucede lo mismo en los recién recolectados.

Conclusiones

Los resultados confirman que las mieles como los pólenes, que constituyen las fuentes de alimentación de las que dispone el ganado melipónico de ambas provincias, cuentan con una proporción adecuada de prolina, aunque las colmenas de la provincia de Matanzas mostraron mayor producción de esta sustancia. Por tanto, la masa ganadera melipónica, ubicada en las zonas de Matanzas y Mayabeque, tiene en su dieta el soporte aminoácido necesario para desarrollar una respuesta inmune adecuada ante cualquier agente microbiano.

Agradecimientos

Se agradece a la Agencia Suiza para la Cooperación y el Desarrollo (COSUDE) por su aporte al financiamiento de esta investigación mediante el proyecto BIOMAS-Cuba, en su fase III.

Se expresa también gratitud al grupo de investigadores de la Facultad de Farmacia, del área de Nutrición y Bromatología, de la Universidad de Salamanca.

Referencias bibliográficas

- Baldi-Coronel, Bertha; Grasso, D.; Chaves-Pereira, Silvia & Fernández, G. Caracterización bromatológica del polen apícola argentino. *Ciencia, Docencia y Tecnología*. 15 (29):145-181, 2004.
- Bosi, G. & Battaglini, M. Gas chromatographic analysis of free and protein amino acids in some unifloral honeys. *J. Apicult. Res.* 17:152-166, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.1978.11099920>.
- Brodtschneider, R. & Crailsheim, K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*. 41 (3):278-294, 2010. DOI <https://doi.org/10.1051/apido/2010012>
- Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J. L. & Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23 (4-5):329-344, 1999. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0145-305x\(99\)00015-4](http://doi.org/10.1016/s0145-305x(99)00015-4).
- Chapman, R. F. *The insects, structure and function*. 5th ed. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press, 2013.

- Crane, Eva. *Bees and beekeeping. Science, practice and world resources*. Nueva York: Cornell University Press, 1990.
- Di Pasquale, G.; Salignon, Marion; Le Conte, Y.; Belzunces, L. P.; Decourtye, A.; Kretzschmar, A. *et al.* Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*. 8 (8):e72016, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>.
- Gätschenberger, H.; Azzami, K.; Tautz, J. & Beier, H. Antibacterial immune competence of honey bees (*Apis mellifera*) is adapted to different life stages and environmental risks. *PLoS ONE*. 8 (6):e66415, 2013. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0066415>.
- Gutiérrez, P. & Orduz, S. Péptidos antimicrobianos: estructura, función y aplicaciones. *Actual. Biol.* 25 (78):5-15, 2003. DOI: <http://doi.org/10.17533/udea.acbi>.
- Lóriga, W. *Caracterización de las abejas, colmenas, sistema de manejo y estado de salud de Melipona beecheii Bennett (Apidae, Meliponini) en áreas del Occidente de Cuba*. Tesis de doctorado. San José de las Lajas, Cuba: Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de La Habana, 2015.
- Sanhueza-Rojas, O. H. *Caracterización química multifactorial de miel en relación a la infección por Nosema ceranae en abejas, actividad antimicrobiana y origen geográfico del producto*. Memoria presentada para optar al título de Químico. Santiago de Chile: Facultad de Ciencia Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Universidad de Chile, 2016.
- Truzzi, C.; Annibaldi, A.; Illuminati, S.; Finale, C. & Scarponi, G. Determination of proline in honey: comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chem.* 150:477-481, 2014. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.003>.

Recibido el 18 de julio del 2019

Aceptado el 26 de agosto del 2019