

Optimización de la extracción alcohólica para la obtención de soluciones concentradas de propóleos

Luis Enrique Rodríguez Rodríguez¹, Walter Góngora Amores², Ariel Escalona Arias³, Mirtha Beatriz Miranda Bazán⁴, Saidé Batista Suárez⁵, Yordanka Bermúdez Cisnero⁶.

Centro de Inmunología y Biopreparados (CIBHO), Av. de Los Álamos e/ Av. Lenin y Calle Mariana de la Torre, Holguín, Cuba, 461905. Fax: 053 427664.

¹ Correo electrónico: luis@cibho.hlg.sld.cu; ² Correo electrónico: luis@cibho.hlg.sld.u;

³ Correo electrónico: ariel@cibho.hlg.sld.cu; ⁴ Correo electrónico: mbeatrizmb@cibho.hlg.sld.cu;

⁵ Correo electrónico: saide@cibho.hlg.sld.cu; ⁶ Correo electrónico: yordanka@cibho.hlg.sld.cu;

Recibido para evaluación: 1º de abril de 2014.

Aceptado para publicación: 26 de diciembre de 2014.

RESUMEN

Introducción: existen distintos métodos para la obtención de soluciones concentradas de propóleos, utilizados por diferentes autores tanto en el ámbito nacional como internacional. En este trabajo se propone una variante del método *Pichansky* que consiste en una secuencia de pasos de extracción/filtración, para optimizar el proceso de obtención de soluciones alcohólicas concentradas de propóleos en el Centro de Inmunología y Biopreparados de Holguín. *Objetivo:* optimizar el proceso de obtención de las soluciones alcohólicas concentradas de propóleos que contribuya a eliminar contaminantes disueltos y elevar la calidad del producto final. *Materiales y métodos:* para la obtención de las soluciones se emplearon tres lotes experimentales y se realizaron tres extracciones alcohólicas sucesivas con filtraciones intermedias a temperatura controlada. Los parámetros de calidad se determinaron según procedimientos del Sistema de Gestión implantado, realizándose una comparación entre los lotes experimentales y los lotes elaborados posteriormente en el proceso de producción utilizando la misma variante del método de extracción. La información se procesó estadísticamente mediante un análisis de medias con el software Medcal. *Resultados:* en los resultados se obtuvieron valores óptimos de concentración de sólidos totales superior al 30% para todos los lotes ensayados de las soluciones concentradas, las propiedades organolépticas se encuentran dentro de los estándares de calidad establecidos. *Conclusiones:* se logró optimizar el proceso de obtención de

la solución concentrada de propóleos manteniendo la conformidad del producto, lográndose un mejor agotamiento de la materia prima, teniendo en cuenta la incorporación de un tercer paso en el proceso de elaboración y la filtración a temperatura controlada.

Palabras clave: propóleos, solución concentrada, método de purificación, optimización.

SUMMARY

Optimization of the alcoholic extraction to obtain concentrated solutions of propolis

Introduction: There are different methods to obtain concentrated propolis solution that have used by different national and international authors. In this document a variant of *Pichansky* method is proposed to optimize the process for obtaining concentrated propolis in the Immunology and Blood by Product Center. *Objective:* To optimize the process of obtaining concentrated propolis alcoholic solutions through a sequence of steps of extraction/filtration to remove dissolved contaminants and increase the quality of the final product. *Materials and methods:* To obtain solutions, three experimental plots were performed. This process was executed with three successive extractions using alcohol intermediate to temperature controlled. The quality parameters were determined according to procedures implemented of management system. A comparison was performed between experimental batches and batches subsequently produced with the change. The information was processed statistically by means of (means t-test) with Medcal software. *Results:* The optimal values of volume of total solids concentration above 30% were obtained for all tested batches of concentrated solutions, the organoleptic properties were found according to the standard quality. *Conclusions:* It was possible to optimize the process of obtaining the propolis concentrated solution of maintaining product compliance, achieving a better recovery of the first product due to considering the addition of a third step in the process with a controlled temperature.

Key words: propolis, concentrated solution, purification method, optimization.

INTRODUCCIÓN

El propóleos se conoce desde hace siglos. Los antiguos griegos, romanos y egipcios conocían sus propiedades curativas y hacían un amplio uso del propóleos como medicamento. En la Edad Media, el propóleos no era un tema muy popular y su uso en la medicina convencional desapareció. Sin embargo, el conocimiento de las propiedades medicinales del propóleos sobrevivió en la medicina popular tradicional. Solo ha sido en el último siglo que los científicos han sido capaces de demostrar que el propóleos presenta diversas propiedades farmacológicas [1].

La composición química del propóleos es heterogénea y depende de la vegetación que predomina alrededor de la colmena (aproximadamente en un radio de 2 km), la estación del año, así como de su origen geográfico. A través del empleo de métodos cromatográficos y espectroscópicos se han podido aislar y caracterizar de forma inequívoca benzofenonas preniladas, flavonoides, isoflavonoides, polifenoles, ácidos fenólicos y triterpenos [2-9].

Basado en el uso que las abejas le dan a este producto e independientemente de la versatilidad farmacológica que el mismo posee, la acción antimicrobiana es común para propóleos de diversos orígenes geográficos. Se le han referido propiedades tales como antibacteriana, antifúngica, antipsoriásico, aftas y úlceras bucales, estomatitis aftosa y antiviral. Se ha utilizado además como antiinflamatorio, antiulceroso, analgésico, antitumoral, hepatoprotector, inmunoestimulante, anestésico local y antioxidante, entre otras [10-19].

En el mundo existen diferentes procesos de purificación de propóleos, entre los que se encuentran el método soviético, inglés y el rumano, entre otros. Adanero [20] y Ordóñez [21], en sus trabajos desarrollados, describen métodos muy similares al utilizado en el Centro de Inmunología y Biopreparados de Holguín, para la obtención de tinturas madres o soluciones concentradas de propóleos (SCP). También existen otros métodos como son la maceración del propóleos con etanol al 70% conocido como método Pichansky, y la patente cubana para la obtención de fases acuosas, alcohólicas y la combinación de ambas [22].

El Centro de Inmunología y Biopreparados de Holguín (CIBHO), cuenta con un Sistema de Gestión de Calidad (SGC) que responde a las NC-COPANT-ISO 9002:94 [23] y la NC 26-211:1992 [24]. Estos procedimientos aparecen registrados en el PNO2.049: "Preparación de la solución concentrada de propóleos", PNO1.017: "Análisis fisicoquímico de propóleos" y las especificaciones ESP0005: "Propóleos" y la ESP2.503: "Solución alcohólica de propóleos concentrada".

La metodología propuesta para la obtención de SCP, constituye una variante del método Pichansky anteriormente mencionado y persigue optimizar el proceso de obtención de las soluciones alcohólicas concentradas de propóleos que contribuya a eliminar contaminantes disueltos y elevar la calidad del producto final. Se derivan de este objetivo general los siguientes objetivos específicos:

1. Alcanzar el agotamiento deseado a través de la disminución de los sólidos totales.
2. Eliminar contaminantes no deseados (cera) disueltos en la solución concentrada final durante el proceso de extracción alcohólica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suministro de la materia prima

Se empleó la masa de propóleos en bruto procedente de la provincia de Holguín, recolectados en los meses de septiembre y octubre de 2011, respectivamente; los mismos se encontraban conforme según requisitos establecidos en la especificación ESP0005 del Sistema de Gestión de Calidad implantado.

El etanol fue suministrado por la Empresa Comercializadora y Distribuidora de Medicamentos (Encomed), conforme a los requisitos establecidos en la especificación ESP0010 del Sistema de Gestión de Calidad implantado.

Metodología empleada

Para dar cumplimiento a los objetivos se elaboraron tres lotes experimentales de SCP entre diciembre de 2011 y febrero de 2012, siguiendo la metodología que se establece en el PNO2.049: "Preparación de la solución alcohólica concentrada de propóleos" del SGC implantado. Para la elaboración de los mismos se utilizó como materia prima, 50 kg de masa de propóleos en bruto proveniente de APISUM, Holguín. Estas materias primas fueron evaluadas por el departamento de calidad según los requisitos establecidos en la ESP0005: "Propóleos".

El proceso de extracción se basa en una maceración con agitación predeterminada por espacio de tres semanas, fraccionado el proceso en tres extracciones por separado obteniéndose un residuo para cada extracción, el cual fue filtrado a temperatura controlada. La metodología exacta se establece en el PNO2.049, y se opera de la forma siguiente:

Para realizar la primera extracción alcohólica se hace el pesado del propóleos en bruto y se desmenuza con tijeras hasta obtener fragmentos de 0,20 a 0,50 kg, posteriormente se

vierten los mismos en un tanque de acero inoxidable, y se mide con cilindro graduado 1.000 mL de etanol por cada kilogramo de propóleos y se añade en el tanque de acero inoxidable, y se agita con la paleta de acero inoxidable la mezcla durante 30 minutos; luego se tapa para evitar la evaporación del producto. Este proceso de maceración dura aproximadamente siete días, por lo que conlleva un proceso de agitación tres veces al día con una paleta de acero inoxidable durante 5 minutos, colocando la tapa al recipiente una vez terminada la misma. Posteriormente se realiza el proceso de filtración a temperatura controlada (4 y 8 °C), de la solución concentrada de propóleos obtenida.

La segunda extracción alcohólica: esta se realiza añadiendo 0,50 L de alcohol por cada 1,00 kg de propóleos añadido en el tanque en la primera extracción y se procede a repetir las operaciones de agitación y filtrado.

Una vez finalizada esta etapa, se le incorporó una tercera extracción y otra de filtración a temperatura controlada, la cual se desarrolló en una cámara fría a la temperatura anteriormente mencionada durante 12 a 24 horas para favorecer la separación de la cera disuelta. Finalmente se mezcla el volumen obtenido en las tres extracciones y se realiza un pool con los filtrados obtenidos de cada extracción alcohólica.

Este procedimiento es una variante del método Pichansky, que aparece reportado en el “Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos” del Ministerio de Salud Pública y la Dirección Nacional de Farmacias, editado por la Editorial de Ciencias Médicas en La Habana [22].

Determinación de los parámetros de calidad

Para ello se elaboraron tres lotes experimentales a los cuales se les incorporó —como se mencionó anteriormente— un tercer paso de extracción a partir del segundo residuo de la extracción obtenida, utilizando el procedimiento de preparación de la solución alcohólica concentrada de propóleos. Se tomaron las tres muestras correspondientes de los tres lotes experimentales elaborados, utilizando la variante propuesta y se le determinaron las propiedades organolépticas según las especificaciones de calidad como se muestra a continuación:

- **Aspecto:** líquido sin sedimentos, más traslúcido.
- **Color:** pardo rojizo oscuro, puede presentar tonalidades verde amarillentas.
- **Olor:** resinoso alcohólico, característico del propóleos.
- **Sabor:** resinoso, amargo, alcohólico.
- **Sólidos totales:** $\geq 16\%$.

La concentración de sólidos totales de la SCP obtenida en cada lote fue determinada según lo establecido en las Normas Cubanas NC 26-211:1992 [24] y la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 312 [25]. El volumen total y el rendimiento de la obtención se determinaron según lo establecido en el PNO 2.049: “Preparación de la solución alcohólica concentrada de propóleos”.

Después de comprobada la factibilidad de la introducción de esta tercera etapa de extracción/filtración a temperatura controlada, se analizaron los lotes producidos en el CIBHO a partir de marzo de 2012 y se determinaron los mismos parámetros fisicoquímicos mencionados anteriormente.

Para la comparación entre los lotes producidos en el 2011 antes del cambio propuesto y en el 2012 con los cambios implementados, se empleó el programa estadístico Medcal.

RESULTADOS

Los resultados de la evaluación de los lotes experimentales procesados se observan en la tabla 1. Se definieron como parámetros a evaluar en cada caso, las propiedades organolépticas mencionadas en el capítulo anterior, así como el porcentaje de sólidos totales como parámetro fisicoquímico fundamental, calculado sobre la base del volumen inicial y final obtenido en cada caso, según se describe en el PNO 2.049.

Tabla 1. Evaluación de los lotes experimentales de solución concentrada de propóleos.

Lotes	Propiedades organolépticas	Sólidos totales (%)	Decisión final
FI 110001	Responde	36	Conforme
FI 120001	Responde	31	Conforme
FI 120002	Responde	34	Conforme
Promedio	-	33,7	-

En la tabla 2 se observan los resultados obtenidos de SCP durante el período 2012, en los cuales se empleó la variante propuesta. El promedio de los sólidos totales en estos lotes fue de 30,44%, similar a los obtenidos en los lotes experimentales (33,66%).

Tabla 2. Evaluación de los lotes de solución concentrada de propóleos elaborados en el 2012.

Lotes	Propiedades organolépticas	Sólidos totales (%)	Decisión final
F 120001	Responde	31,31	Conforme
F 120002	Responde	30,51	Conforme
F 120003	Responde	34,10	Conforme
F 120004	Responde	29,41	Conforme
F 120005	Responde	26,91	Conforme
Promedio	-	30,44	-

La tabla 3 muestra el promedio de los sólidos totales de la SCP de los lotes producidos en el 2011 (sin el cambio) y los lotes producidos en el 2012 (con el cambio).

Tabla 3. Valores promedios de los lotes de solución concentrada de propóleos elaborados en el 2011 (antes del cambio) y 2012 (después del cambio).

Año	Promedio de sólidos totales de las SCP (%)	Decisión final
2011	34,60	Conforme
2012	30,44	Conforme

DISCUSIÓN

Al analizar los resultados, podemos plantear que los lotes experimentales y en los lotes producidos en el 2012 con la implementación del cambio muestran características organolépticas que se corresponden con la especificación ESP 2503 del SGC implantado en el centro, obteniéndose productos conformes en todos los lotes evaluados.

Por otra parte, la concentración final de sólidos totales mostró igual comportamiento en todos los lotes, ya que reportó un valor promedio superior al valor establecido en la especificación del producto. Es válido mencionar que el valor de los sólidos totales de los lotes experimentales fue ligeramente superior al valor de los lotes producidos en el 2012. Esto puede ser debido a que la recolección de la materia prima se realizó en

diferentes épocas del año. Sin embargo, al hacer una comparación de medias no existen diferencias significativas entre estos lotes, ya que para un nivel de confianza de 95% se obtuvo un valor de t de 1,847 con una probabilidad mayor de 0,05 ($p = 0,1143$).

Por otra parte, el valor promedio de los sólidos totales de los lotes producidos en el 2012 resultó inferior al de los lotes producidos en el 2011. Entre estos lotes sí existieron diferencias significativas, ya que para un nivel de confianza de 95% se obtuvo una $t = 2,701$ para una probabilidad menor o igual que 0,05. Esto se debe a que al incorporarle la tercera etapa de extracción/filtración se logra un agotamiento mayor de la materia prima que se incorporaría a la solución concentrada, lo que influye notablemente en los resultados de los sólidos totales, por lo que podemos afirmar que la metodología propuesta en el estudio es mucho más eficiente respecto a los procedimientos realizados tradicionalmente.

Con respecto a la calidad final de la SCP, al incorporar una tercera etapa en el proceso de extracción y el sistema de filtración con temperatura controlada, se logró obtener una preparación mucho más traslúcida, con características menos resinosas, favoreciéndose la separación de compuestos de baja polaridad disueltos en el sobrenadante durante los procesos de extracción alcohólica.

Al realizar una comparación de las concentraciones obtenidas en este trabajo, con los resultados obtenidos por Ordóñez [21], donde se aplicó el método rumano de purificación de propóleos para la obtención de la solución hidroalcohólica con etanol al 90%, a partir de masas de propóleos obtenidas de diferentes zonas del Ecuador, se pudo constatar que existen marcadas diferencias en cuanto a las concentraciones de sólidos totales reportadas por este autor (por encima del 45%) en su estudio.

Estas diferencias pueden tener como origen, tanto las características del propóleos en bruto de acuerdo con su ubicación geográfica, edad, forma de recolección, almacenamiento, composición química y, por supuesto, la técnica empleada en la extracción y recuperación de los principios activos de interés. Aunque si lo comparamos con otros datos referidos en la literatura, se puede apreciar que tanto las normas brasileñas como cubanas, los sólidos totales oscilan en un rango de 10% y 11%, lo que nos indica que aún deben buscarse o perfeccionar más el proceso de extracción para lograr un mejor agotamiento de la masa bruta de propóleos durante el método de extracción, y optimizar aún más dicho proceso.

CONCLUSIONES

Mediante la introducción de una tercera etapa de extracción/filtración a temperatura controlada, se logró optimizar el proceso de obtención de soluciones etanólicas concentradas de propóleos, además se obtuvieron concentraciones de sólidos totales superiores al 30%. Por otro lado, se obtuvo un producto final de mayor calidad más traslúcido, ya que se agota la presencia de sustancias lo cual contribuye a elevar la calidad del producto final.

REFERENCIAS

1. A.K. Kuropatnicki, E. Szliszka, W. Krol, Historical aspects of propolis research in modern times, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Article ID 964149 (2013).
2. G.M. Sulaiman, K.W. , Al-Sammarræ A.H. Ad'hiah, M. Zucchetti, R. Frapolli, E. Bello *et al.*, Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials, *Food Chem. Toxicol.*, **49**(9), 2415-2421 (2011).
3. S.A. Shaheen, M.H. Zarga, I.K. Nazer, R.M. Darwish, H.I. Al-Jaber, Chemical constituents of Jordanian propolis, *Nat. Prod. Res.*, **25**(14), 1312-1318 (2011).
4. F.M. Campos, Estudio químico de propóleos cubanos. Tesis doctoral, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, 2008.
5. I. Márquez, Análisis cromatográficos y espectroscópicos de propóleos cubanos. Tesis doctoral, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, 2007.
6. O. Cuesta, Estudio químico de propóleos cubanos. Tesis doctoral, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, 2001.
7. O. Cuesta, B.A. Frontena, T. Ramírez, J. Cárdenas, Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemororosona, *Z. Naturforsch. C.*, **57**(3-4): 327-378 (2002).
8. A.L. Piccinelli, M. Campo, O. Cuesta, I. Márquez, F. de Simone, L. Rastrelli, Isoflavonoids isolated from Cuban propolis, *J. Agric. Food Chem.*, **53**(23), 9010-9016 (2005).

9. F.M. Campo, O. Cuesta, A. Rosado, P.R. Montes de Oca, H.I. Márquez, A. Piccinelli, L. Rastrelli, GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples, *J. Agric. Food Chem.*, **56**(21), 9927-9932 (2008).
10. S. Ewelina, P.C. Zenon, B. Joanna, M. Anna, P. Andrzej, K. Wojciech, Ethanolic extract of propolis augments TRAIL-induced apoptotic death in prostate cancer cells, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Article ID 535172 (2011).
11. S. Rodríguez, O. Ancheta, D. Ramírez, A. González, N. Merino, R. González, Efecto protector del propóleo rojo cubano, ante el daño agudo inducido en hepatocitos de roedores, *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, **29**(2), 69-72 (1998).
12. M. García, R. Medina, P.I. Hidalgo, M.S. Delgado, E. Triffin, R. Gómez, Actividad *in vitro* del propóleo frente a patógenos bacterianos aislados de infecciones humanas, *Lat. Am. J. Pharm.*, **26**(1), 100-102 (2007).
13. B.A. Rocha, P.C. Bueno, M.M. Vaz, A.P. Nascimento, N.U. Ferreira, G.P. Moreno *et al.*, Evaluation of a propolis: Water extract using a reliable RP-HPLC methodology and *in vitro* and *in vivo* efficacy and safety characterization, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Article ID 670451 (2013).
14. Propóleos, Medlineplus información de salud para usted. Servicio de la Biblioteca Nacional de EE.UU., Institutos Nacionales de la Salud, URL: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/390.html>, consultado el 11 de junio de 2013.
15. A.M. Kurek-Górecka, A. Sobczakb, A. Rzepecka-Stojkod, M.T. Górecki, M. Wardas, K. Pawłowska-Góral, Antioxidant activity of ethanolic fractions of Polish propolis, *Z. Naturforsch. C.*, **67**(11-12), 545-550 (2012).
16. N. Ledón, A. Casacó, R. González, N. Merino, A. González, Z. Tolón, Efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico del propóleo rojo colectado en Cuba, *Zhongguo Yao-li Xue-bao*, **18**(3), 274-276 (1997).
17. D. Suárez, Estudio de la actividad antitumoral de propóleos cubanos. Tesis de Máster en Ciencias, Universidad de La Habana, 2003.
18. G. León, G. Graz, Efectos del propóleos en el tratamiento de aftas bucales, *Rev. Cubana Med. Milit.*, **22**(1), 42-45 (1993).
19. D. Quintana, Efectos del propóleos en los tratamientos quirúrgicos y úlceras bucales, *Rev. Cubana Estomatología*, **33**(1), 26-29 (1996).

20. F. Adanero, "Curso para diplomado en sanidad animal", Editorial Soria, 2000.
21. C. Ordóñez, S. Fabricio, Métodos de purificación del propóleos para su posterior aplicación en sanidad animal. Tesis de grado, Escuela Superior Tecnológica de Chimborazo, 2002.
22. M.L. Enríquez, A.D. Cruz, R.O. Bilbao, M.M. Miranda, G.M. Ruenes, H. López et al., Método Pichansky: maceración de propóleos en alcohol al 70%. Patente cubana 21875: Método de obtención del propóleos (índice de clasificación internacional A 61K35/64). Tomado del "Formulario Nacional Fitofármacos y Apifármacos", Ministerio de Salud Pública y la Dirección Nacional de Farmacias, Editorial de Ciencias Médicas, La Habana, 2010, pp. 130-132.
23. "Modelo para el aseguramiento de la calidad en la producción y la instalación". NC-COPANT-ISO 9002:94, 1994.
24. "Buenas prácticas de producción farmacéuticas". NC 26-211, 1992.
25. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 312. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayos, Minsap, 1991