

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FQF**  
Facultad de  
Química y Farmacia

## TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Optimización de la tecnología de elaboración de la tintura de propóleo de los Centros de Producción Local de Villa Clara.

Autora: Lietsy Sotolongo Moya

Tutores: MSc Miguel Ángel Alba de Armas  
Dra. C. Yanelis Saucedo Hernández

2021

Santa Clara  
Copyright©UCLV

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FQF**  
Facultad de  
Química y Farmacia

Academic Department: Pharmaceutical Sciences

## DIPLOMA THESIS

Title: Optimization of the technology for making propolis tincture of  
Villa Clara Local Production Centers

Author: Lietsy Sotolongo Moya

Tutores: MSc Miguel Ángel Alba de Armas  
Dra. C. Yanelis Saucedo Hernández

2021

Santa Clara  
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria "Chiqui Gómez Lubian" subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

**Atribución- No Comercial- Compartir Igual**



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830  
Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

*"Si la montaña que subes parece cada vez más imponente es que la cima está cada vez más cerca."*

## *Dedicatoria*

*A mi familia, en especial a mis padres que siempre han sido mi motor impulsor, los que me han formado como persona, por sus sacrificios y consejos, por confiar en mis expectativas, celebrar mis éxitos y apoyarme en mis tropiezos, todo lo que soy se los debo, los Amo.*

## *Agradecimientos*

*A mis padres por su inmensurable sostén, su dedicación, su amor, su sabiduría y por darme la oportunidad de ser la persona que soy. A mis tíos por su cariño y apoyo incondicional. A mi abuelita por educarme y su apego entrañable. A mis primitos por ser la alegría de la casa. Sobre todo, al angelito que guía y protege mis pasos.*

*A mis tutores por acompañarme en este camino, por su paciencia y entrega en este proyecto y permitir nutrirme de sus conocimientos y experiencias.*

*A Melissa Liliam Gómez Saucedo por su ayuda y colaboración en este trabajo.*

*A los docentes de la Facultad de Química-Farmacología, por concederme una base sólida en mi desarrollo como profesional.*

*A todas mis amistades por permanecer a mi lado y frases de aliento. A todas las personas que han contribuido indirecta o directamente en este estudio muchas gracias.*

## **Resumen**

La tintura de propóleo elaborada en los Centros de Producción Local (CPL) de Villa Clara presenta alta demanda por su diversidad de usos. En los últimos tiempos el contenido de sólidos totales de este producto está resultando inferior al 10% (límite permisible). El objetivo del presente trabajo fue optimizar la tecnología de elaboración de la tintura de propóleos con fines farmacéuticos, empleada en los CPL de Villa Clara. Se realizó un diseño de experimentos factorial  $2^3$ . Los factores independientes y sus niveles fueron: tipo de menstuo (nivel bajo etanol al 70 % y nivel alto etanol al 96 %), tiempo de extracción (7 días nivel bajo y 14 días nivel alto) y variedad de propóleo (color pardo nivel bajo y color castaño rojizo nivel alto). Se realizó una réplica para cada uno. La variable respuesta (variable dependiente) a considerar fue el contenido de sólidos totales. Otros índices de calidad evaluados a la tintura fueron: densidad relativa, índice de refracción y pH. Un elevado contenido de sólidos totales (23.02%) se obtuvo para la condición donde se empleó el propóleo de color castaño rojizo, etanol al 96 % como menstuo y tiempo de extracción de 7 días. El pH, índice de refracción y densidad relativa de la tintura, dieron resultados similares a los de otras tinturas de origen natural reportadas en la literatura. Estos índices de calidad se mantuvieron estables durante 7 meses. La concentración del disolvente, variedad de propóleo y el tiempo de extracción, influyen de manera significativa en el contenido de sólidos totales.

## **ABSTRACT**

The propolis tincture made in the Local Production Centers (CPL) of Villa Clara is in high demand due to its diversity of uses. In recent times the total solids content of this product has been less than 10% (permissible limit). The objective of this work was to optimize the technology for making propolis tincture for pharmaceutical purposes, used in the Villa Clara CPL. A 2<sup>3</sup> factorial design of experiments was carried out. The independent factors and their levels were: type of menstruation (low level 70% ethanol and high level 96% ethanol), extraction time (7 days low level and 14 days high level) and a variety of propolis (low level brown color and high level reddish brown color). A replica was made for each one. The response variable (dependent variable) to consider was the content of total solids. Other quality indices evaluated for the dyeing were: relative density, refractive index and pH. A high total solids content (23.02%) was obtained for the condition where reddish brown propolis was used, 96% ethanol as menses and extraction time of 7 days. The pH, refractive index and relative density of the dye gave results similar to those of other dyes of natural origin reported in the literature. These quality indices were stable for 7 months. The concentration of dissolvent and the variety of propolis have a significant influence on the total solids content.

# Índice

Introducción.....	1
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos: .....	2
I. Marco teórico.....	3
I.1. Propóleos .....	3
I.1.1. Generalidades .....	3
I.1.2. Historia.....	3
I.1.3. Métodos de recolección del propóleo.....	4
I.1.3.1. Raspado de la colmena .....	5
I.1.3.2. Rejillas o mallas plásticas .....	5
I.1.3.3. Colector inteligente.....	5
I.1.4. Métodos de extracción .....	5
I.1.4.1. Procedimiento de extracción general.....	5
I.1.4.2. Extracción de compuestos volátiles.....	6
I.1.5. Composición química. Métodos analíticos para la identificación y caracterización de propóleos. ....	6
I.1.5. 1. Ensayos de identificación cualitativa de metabolitos (flavonoides y fenoles) .....	8
I.1.6. Actividad biológica .....	9
I.1.6.1. Actividad antioxidante .....	9
I.1.6.2. Actividad antimicrobiana. ....	9
I.1.6.3. Actividad antifúngica. ....	10
I.1.6.4. Actividad antiinflamatoria. ....	10
I.1.6.5 Actividad inmunomoduladora. ....	10
I.1.6.6. Actividad antitumoral. ....	11
I.1.6.7. Otras actividades biológicas.....	11
I.1.7 Tinturas. ....	11
I.1.7.1 Generalidades.....	11
I.1.7.2 Método de elaboración según método de Pichansky. ....	12
I.1.7.3. Parámetros de control de calidad.....	13
I.1.7.4. Ensayos analíticos empleados en el control de calidad de tintura.....	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15

2.1. Equipos, materiales y solventes empleados .....	15
2.2. Recolección del material vegetal. ....	16
2.2.1 Preparación del material vegetal .....	16
2.3. Obtención de las tinturas según método de Pichansky modificado.....	16
2.4. Caracterización física-química de las tinturas.....	17
2.4.1. Determinación de sólidos totales. ....	17
2.4.2. Determinación de pH .....	18
2.4.3. Determinación del índice de refracción.....	18
2.4.4 Determinación de la densidad relativa. ....	18
3. RESULTADOS Y DISCUSION. ....	19
3.1. Consideraciones generales en el diseño del estudio. ....	19
3.2. Optimización de la tecnología de elaboración de las tinturas, según método de Pichansky modificado. ....	20
3.3. Caracterización física-química de las tinturas.....	21
3.3.1. Determinación de parámetros de calidad (pH, índice de refracción y densidad relativa). ....	25
3.4. Estabilidad físico química preliminar de las tinturas elaboradas con la variedad A.....	26
Conclusiones .....	28
Recomendaciones .....	29
Referencias bibliográficas .....	30

# *INTRODUCCIÓN*

## Introducción

El propóleo es una mezcla de sustancias de apariencia resinosa que ha sido muy útil desde la antigüedad, principalmente en medicina tradicional, debido a sus diversas propiedades biológicas.(1-3) Las abejas *Apis mellifera* fabrican propóleos a partir de la recolección selectiva de exudados vegetales, los cuales se mezclan con secreciones salivales y cera de abejas.(4-7)

Las características organolépticas del propóleo (olor, color y sabor) dependen de varios factores como: la composición química, la fuente botánica circundante, zona geográfica, época de recolección, entre otros.(4, 8-10)

Para controlar la calidad de la droga vegetal se realizan ensayos fisicoquímicos de carácter cualitativo entre otros, que permiten la identificación de los metabolitos que contienen. En el propóleo se encuentran en mayor proporción compuestos fenólicos y flavonoides los que serán ratificados a través de reacciones de coloración como el ensayo de Shinoda, de Cloruro Férrico y de catequinas entre otros.(4)

La actividad biológica del propóleo, al igual que la composición química, en gran medida es variada. Estudios demuestran una alta capacidad antibacteriana y antifúngica; además, se le atribuye actividad antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, inmunomoduladora y antioxidante entre otros.(3-5, 11-14)

La caracterización química es fundamental en relación con el control de calidad y procesos de estandarización. Los métodos analíticos más utilizados en la caracterización química de muestras de propóleos son los métodos cromatográficos y espectroscópicos.(4, 15-19)

A partir del propóleo en bruto se obtienen extractos concentrados con los cuales se elaboran diferentes formas de dosificación, tales como cremas, ungüentos y tinturas. En específico, las tinturas son soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas que se obtienen extrayendo los principios útiles de drogas vegetales o animales. Se diferencian de los espíritus o alcoholes aromáticos en que usualmente se preparan con cuerpos volátiles. Se obtienen por lixiviación, maceración, solución o disolución, y los menstruos empleados en las tinturas oficiales son alcoholes, alcoholes diluidos en varias concentraciones, espíritu amoniacal aromático, agua amoniacal o mezclas de alcohol, agua y glicerina.(19)

Dentro de los ensayos de control de calidad reportados para las tinturas derivadas de productos naturales se encuentran la caracterización organoléptica, determinación del índice de refracción, pH, densidad relativa, contenido alcohólico, porcentaje de acidez y la determinación de sólidos totales donde se refiere como límite inferior permisible un 10%.(19-21)

El contenido de sólidos totales de la tintura de propóleo elaborada en los Centros de Producción Local (CPL) de Villa Clara en los últimos tiempos presenta un comportamiento variable, lo cual repercute en la elaboración posterior de formas de dosificación con calidad satisfactoria. Teniendo en cuenta lo anterior, se define el siguiente **problema científico**: La tintura de propóleo elaborada en los Centros de producción local (CPL) de Villa Clara presenta un contenido de sólidos totales muy variable e inferior al límite permisible (10%).

Para dar solución al problema detectado se plantea la siguiente **Hipótesis**: Si se optimiza la tecnología de elaboración de la tintura de propóleo en cuanto a concentración de disolvente empleado, tiempo de extracción y variedad de propóleo, es posible obtener un contenido de sólidos totales superior al límite permisible (10%).

Con la realización del presente estudio se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Optimizar la tecnología de elaboración de la tintura de propóleo con fines farmacéuticos que se obtiene en los CPL de Villa Clara.

Objetivos específicos:

- Analizar la tecnología de elaboración de la tintura de propóleo con fines farmacéuticos, empleada en los CPL de Villa Clara.
- Evaluar la influencia de variables de formulación y de la metodología de preparación en la calidad tecnológica de la tintura de propóleo descrita en el Formulario de Fitofármacos y Apifármacos.
- Evaluar la calidad de la tintura de propóleo, mediante la determinación del contenido de sólidos totales y otros parámetros químico-físicos.

*MARCO TEÓRICO*

## I. Marco teórico

### I.1. Propóleos

#### I.1.1. Generalidades

El propóleo es un producto natural producido por las abejas melíferas (*Apis mellifera*), luego de recolectar el exudado de las plantas que se localizan en los alrededores de la colmena y mezclarlo con sustancias como secreciones salivales y enzimas propias de su metabolismo(1-5). Lo utilizan como material de construcción para cubrir grietas o espacios existentes, cubren los bordes de las entradas para proporcionar un sello hermético, evitando la posible entrada de invasores(14). También es utilizado para embalsamar a los organismos vivos que logren entrar en la colmena, como por ejemplo, el gusano de cera, hormigas, reptiles, pequeños roedores y mariposas que debido a su tamaño no pueden ser expulsados, y de esta forma se evita su descomposición dentro del hábitat(22). Se considera esencial para la supervivencia de las abejas, al ser una potente “arma química” que proporciona un medio inadecuado para el crecimiento de microorganismos patógenos, evitando cualquier contaminación(6, 7, 11, 23).

Las características organolépticas y su composición química, dependen directamente de la flora circundante, zona geográfica e incluso de la época de recolección(24). Su coloración es heterogénea pudiendo presentar tonalidades amarillentas y verdes, típicas de los propóleos europeos y algunos del Brasil, tonos castaños o rojizos son característicos de algunos propóleos cubanos, y en otras ocasiones se manifiestan pardos o negros(8-10). Es resinoso (olor a madera), muy aromático y el agradable olor que presentan resulta característico de la vegetación de la cual las abejas han obtenido la resina(7). En cuanto a su sabor, puede ser insípido, áspero o acre y su consistencia varía de acuerdo a la temperatura, pasando de flexible, blanda, y pegajosa a dura y quebradiza.(4, 6, 24, 25)

#### I.1.2. Historia

El propóleo, desde tiempos remotos (aprox. 300 a.c), ha sido ampliamente utilizado por varias civilizaciones en la medicina ancestral, incluyendo la Inca, Egipcia, Persia y Grecorromana (4, 12, 13). El vocablo “propóleos” tiene origen etimológico griego, *pro*, que significa “en defensa de, en frente de”, y *polis*, que significa “ciudad o estado” .(26) En conjunto, se traduce como “en defensa de la ciudad o defensor de la ciudad”; lo que guarda relación con la función protectora de la colmena(27, 28).

En la cultura mesopotámica, las experiencias médicas aparecen grabadas en tablillas de cerámica donde se recogen los primeros indicios del uso terapéutico de la miel en ginecología, oftalmología, afecciones del oído y como estimulante de masajes.(29)

Hipócrates consideraba la miel como: " una magistral medicación fortificante y dadora de larga vida". Aristóteles la recomendaba para el tratamiento de las llagas, tanto internas como externas, así como la resina (propóleos) para las vías urinarias. Galeno, la prescribía en casos de afecciones de las mucosas y envenenamientos.(29)

En Egipto era utilizado como medicina natural y como componente principal en el proceso de embalsamamiento o momificación de cadáveres(14, 29) . Por otra parte, los Incas lo suministraban para controlar estados febriles y heridas infectadas, sobre todo ocasionadas por flechas(8, 30). Durante las Guerra de los Bóeres (1880 – 1902), se utilizó propóleo vasógeno, que era una mezcla de propóleo y vaselina, para evitar el desarrollo de gangrena en heridas de guerra infectadas(31). Dentro de las historias de civilizaciones como China, Hindú y Tibetana, fue reconocida su potente capacidad antiséptica, antimicrobiana y cicatrizante.(4)

A inicios del siglo XX, el uso del propóleo como medicina natural cesa por los avances tecnológicos. Es a partir de los años 70 que América, Rusia y China retoman el estudio de su composición química y actividad biológica. Casi al finalizar el siglo XX se reconocen propiedades biológicas adicionales como la actividad antioxidante, antiinflamatoria, anestésica, antitumoral, antifúngica, antiviral, etc.(4)

Actualmente, países como Brasil, Colombia, Argentina, China, Japón, Polonia, México, Venezuela, Cuba, entre otros, reconocen su potencial terapéutico y lo han introducido en la industria farmacéutica con la finalidad de tratar numerosos padecimientos.(12, 27, 32, 33)Además, también ha ganado espacio en el campo de la industria cosmética como preservante y antioxidante natural, aprovechando también sus demás restantes potencialidades biológicas.(33)

### **I.1.3. Métodos de recolección del propóleo.**

La obtención de propóleos se obtiene a la llegada de la primavera.(34) Dentro de los métodos de recolección se encuentran los siguientes.

### **I.1.3.1. Raspado de la colmena**

Es el método más sencillo, rápido y barato que emplea el apicultor para obtener mayor cantidad de propóleos. Consiste en raspar aleatoriamente, con la ayuda de una espátula, las paredes internas de la colmena, con el fin de obtener el propóleo en forma de trozos; además de limpiar la colmena al término de la estación. Sin embargo, es importante tener en cuenta la dificultad para determinar la edad exacta del propóleo ya que en cada estación pueden quedar remanentes adheridos a la caja. Además, el propóleos se obtiene con una mayor cantidad de impurezas, incorporadas al momento de la recolección, por lo que no es aconsejable.(4, 14, 25, 35)

### **I.1.3.2. Rejillas o mallas plásticas**

Son trampas comerciales que permiten obtener menor cantidad de propóleos en comparación con el método de raspado de la colmena, pero con muy pocas impurezas, por lo que se considera de mejor calidad. Se resume en colocar láminas de plástico con ranuras (1,6 mm) en la superficie de la colmena, donde las abejas depositarán el propóleo para, posteriormente, someter la lámina a bajas temperaturas, lo cual permite que el propóleos se vuelva duro y quebradizo, de tal manera que pueda retirarse por raspado.(4) Son empleadas dos tipos de mallas plásticas, las matrizadas y mosquiteras, de diferentes procedencias y dimensiones.(34, 36, 37)

### **I.1.3.3. Colector inteligente**

Esta variante sustituye los laterales de las alzas por varios listones de madera separados por milímetros que se pueden retirar con facilidad para cosechar el propóleos depositado y son suplidos por otros. El instinto de las abejas, es tan pronto se detectan aberturas, se encarga de cerrarlas depositando así el propóleo en los agujeros del colector, tomándolo como actividad de importancia.(34)

## **I.1.4. Métodos de extracción**

### **I.1.4.1. Procedimiento de extracción general**

El procedimiento de extracción general incluye la extracción dinámica por maceración, un tipo de extracción sólido-líquido donde la muestra es sumergida en el disolvente y los componentes afines con él, son solubilizados en el disolvente. Finalmente, se concentra en un rotaevaporador a presión reducida para remover el exceso de disolvente y proceder con su análisis.(4, 10, 38, 39)

Dado que la mayor parte de principios activos del propóleo no son solubles en agua, el extracto del propóleo que permite un aprovechamiento absoluto de sus propiedades terapéuticas debe ser de naturaleza alcohólica. Estudios recientes han demostrado que otros factores como la temperatura, concentración del disolvente y el tiempo de extracción, también pueden influir notablemente en la extracción de compuestos bioactivos, especialmente los compuestos fenólicos y, por ende, influir en sus propiedades biológicas.(4, 40)

Los disolventes más utilizados son etanol absoluto, metanol, mezclas hidroalcohólicas (etanol o metano/agua) y glicerol. Otros investigadores han optado por el uso de cloroformo o hexano como disolvente, obteniendo también resultados favorables.(4, 31)

#### **I.1.4.2. Extracción de compuestos volátiles**

Son numerosas las técnicas disponibles para extracción de compuestos volátiles, entre ellas tenemos la hidrodestilación, destilación al vapor, extracción por disolvente simple, destilación- extracción simultánea, extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción asistida por microondas (EAM) e incluso, la microextracción en fase sólida.(40) Recientemente, científicos compararon las técnicas de extracción por maceración, EAU y EAM aplicadas a una muestra de propóleo, y determinaron que la EAU tuvo mayor rendimiento de extracción en relación a los compuestos fenólicos extraídos.(32)

Es necesario resaltar que los compuestos volátiles, además de funcionar como una señal olfativa para las abejas tropicales que están encaminadas en la búsqueda de resina, son de gran importancia, ya que a ellos se les atribuye la aromaticidad y muchas de las propiedades biológicas de este producto natural. (4, 14)

#### **I.1.5. Composición química. Métodos analíticos para la identificación y caracterización de propóleos.**

Desde inicios del siglo XX se han estudiado los componentes del propóleo, gracias a nuevas técnicas y equipos sofisticados, se han identificado más de quinientos componentes diferentes.(4, 15, 19) La composición química del propóleo, se resume en la Tabla # 1.(36)

Tabla 1: Composición química del propóleo.

Componentes	%	Contenido
Resinas y Bálsamos	50-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Ceras	30-40	Ácidos grasos de cadena larga
Aceites esenciales	5-10	Aceites volátiles
Polen	5	Proteínas
Sustancias orgánicas y minerales	5	14 trazas de minerales, Fe y Zn, cetonas, lactonas, quinonas, esteroides, ácido benzoico, vitaminas y azúcares

La presencia y diversidad de los componentes está determinada por la ubicación geográfica de la colmena y la vegetación aledaña; incluso la estación del año también es un factor que debe considerarse.(41) En Brasil se destacan el ácido gálico, ácido elágico, catequina, morin, kaempferol, naringina y rutina, como los principales compuestos fenólicos del propóleo. Además, de otros compuestos como terpenoides, derivados del ácido p-cumárico, benzofenonas preniladas, xantonas y artepillin C.(10, 31, 41) En el propóleo mexicano se han aislado los ácidos ferúlico, cafeico, cumárico, y benzoico.(40) En Colombia la composición química del propóleo se caracteriza por la presencia de sesquiterpenos, triterpenos pentacíclicos y diterpenos (tipo labdano); además de ácidos carboxílicos aromáticos como el ácido p-cumárico, 3,4-dimetoxicinámico y ácido cafeico; y flavonoides como quercetina, pinocembrina, apigenina, kaempferol, galangina, etc.(4, 35, 42)

En Cuba, además de los compuestos comunes, se identificaron por primera vez pterocarpanos (isoflavonoide) y cuatro compuestos pertenecientes a las benzofenonas preniladas, los cuales no habían sido aislados o reportados anteriormente desde una muestra de propóleos.(19)

El empleo de técnicas cromatográficas y espectroscópicas ha permitido proponer un sistema de clasificación para propóleos cubanos (en tres grupos) sobre la base de su composición química mayoritaria.(4) Actualmente se han podido aislar y caracterizar de forma inequívoca 10 benzofenonas preniladas, 14 flavonoides y 12 triterpenos.(19) La composición mayoritaria de cada grupo es la siguiente:

- Propóleos pardos (tipo I): De estos propóleos se pueden obtener extractos pardos rojizos, los cuales se caracterizan químicamente por la presencia de benzofenonas, fundamentalmente, nemorosona.(19)
- Propóleos rojos (tipo II): Estos propóleos son de color rojo y en su composición química prevalecen los isoflavonoides, fundamentalmente, vestitol, medicarpina, neovestitol e isosativan.(19)
- Propóleos amarillos (tipo III): En sus extractos, de color generalmente amarillo, predomina la existencia de triterpenos. Se sugiere dos subtipos diferentes (A y B) para este tipo de muestra.(19)

#### **I.1.5.1. Ensayos de identificación cualitativa de metabolitos (flavonoides y fenoles).**

Para controlar la calidad de la droga vegetal se realizan ensayos fisicoquímicos de carácter cualitativo entre otros, que permiten la identificación de los metabolitos que contienen. En el propóleo se encuentran en mayor proporción compuestos fenólicos y flavonoides los que serán ratificados a través de reacciones de coloración.(43, 44)

Para reconocer la presencia de compuestos fenólicos se recurre al ensayo de Cloruro Férrico, con el desarrollo de una coloración rojo –vino evidencia la presencia de estos compuestos.(43)

La reacción más usual para la detección de los flavonoides en un extracto vegetal es la de Shinoda.(43) El ensayo se considera positivo cuando aparece una coloración o el alcohol amílico se colorea de diferentes tonalidades, intensas en todos los casos.(45) Estas tinciones están relacionadas con la estructura del flavonoide. Las flavonas originan amarillo, naranja o rojo; flavonol o flavanonol rojo a carmesí o rojo magenta; flavanonas carmesí a magenta, rojo, magenta, violeta o azul; isoflavonas amarillo y las isoflavanonas, calconas y auronas son incoloras.(44)

Existen otras reacciones de color empleadas como el ensayo de Pacheco, donde se evidencia la presencia de flavonoles con color rojo característico mientras que las flavonas, chalconas, auronas, flavonoles y flavanonas dan una respuesta negativa. El Reactivo de Dimroth identifica la presencia de hidroxiflavonas con soluciones anaranjadas o rojas. Mientras que para el ensayo de catequinas una evidencia positiva es la aparición de una mancha verde carmelita.(46, 47)

### **I.1.6. Actividad biológica**

Al igual que la composición química, la actividad biológica del propóleo, es altamente heterogénea.(10, 13) Múltiples estudios realizados en este producto de origen natural han comprobado una elevada capacidad antibacteriana, antioxidante y antifúngica. En menor medida, se ha demostrado capacidad antiviral, antiinflamatoria y antitumoral.(48) De todos los componentes del propóleos, son los flavonoides y los ácidos fenólicos a quienes se les atribuye gran parte de su actividad biológica.(19)

#### **I.1.6.1. Actividad antioxidante**

Es una de las propiedades biológicas más reconocidas e importantes del propóleos; en efecto, son numerosos los estudios que se han enfocado en determinar la capacidad antioxidante del propóleos, dada su importancia en la prevención y tratamiento de enfermedades que se relacionan con el estrés oxidativo.(4, 49)

Son los flavonoides y los ácidos fenólicos a quienes se les atribuye esta propiedad, dada su capacidad para eliminar radicales libres; además de desempeñar un rol importante durante el proceso oxidativo, protegiendo a los lípidos y vitamina C de su destrucción.(39)

En otras ramas industriales cada vez es mayor la explotación del propóleo, en la cosmética es empleado para el tratamiento del acné u otras lesiones cutáneas, en la alimentaria se destina para prevenir el deterioro oxidativo de los alimentos que sigue siendo su principal obstáculo y además minimizar los riesgos que representan derivados de los antioxidantes sintéticos (4, 24, 33)

#### **I.1.6.2. Actividad antimicrobiana.**

Esta fue una de las primeras propiedades observadas en el propóleo, atribuida mayoritariamente a los compuestos de tipo flavonoides y ácidos fenólicos; en menor medida, a ácidos orgánicos y terpenos. El ácido cinámico y algunos flavonoides desactivan la energía de la membrana citoplasmática, inhibiendo la motilidad bacteriana, haciéndola más vulnerable al ataque del sistema inmunológico y potenciando a los antibióticos El mecanismo de acción podría consistir en frenar la síntesis del ARN mensajero inhibiendo la enzima ARN polimerasa o interviniendo en la síntesis de la pared celular del microorganismo.(50)

Diversos estudios han confirmado su actividad bactericida, tanto frente a bacterias Gram(+) como a Gram(-), siendo la eficacia de esta actividad dependiente de la dosis.(23, 32, 40)

#### **I.1.6.3. Actividad antifúngica.**

La industria alimentaria ha demostrado que el propóleo inhibe el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, un hongo común en las frutas y causante de la patología conocida como antracnosis, y también de *Rhizopus stolonifer*, característico de las fresas.(24) Así mismo, se ha confirmado su efectividad frente a *Candida albicans* y *Candida tropicalis*.(32)

En el 2017, un estudio in vitro demostró actividad antiprotzoaria al estudiar la composición química y actividad farmacológica del propóleo rojo, logrando este reducir la carga del protozoo *Leishmania amazonensis*.(23) Además, se ha evaluado también su efecto frente a *Trichomonas vaginalis*, donde ejercen su efecto sobre los trofozoítos.(51)

Con respecto a la actividad antivírica, los propóleos obtenidos de zonas templadas han demostrado significativa actividad frente al virus *Avian influenza*.(4)

#### **I.1.6.4. Actividad antiinflamatoria.**

La capacidad de acelerar positivamente la epitelización, la división celular en la curación de heridas y la prevención y detención del desarrollo de procesos inflamatorios, son algunas de las características propias de los preparados a base de propóleos, directamente relacionadas con la presencia de flavonoides.(13, 23, 52)

Constituyentes como el ácido cafeico (modulador más potente), quercetina, naringenina, entre otros, actúan a nivel de macrófagos, suprimiendo la producción de leucotrienos y prostaglandinas; como consecuencia se produce una inhibición de la lipoxigenasa del ácido araquidónico, evento crítico durante el proceso inflamatorio.(4, 52)

#### **I.1.6.5 Actividad inmunomoduladora.**

Diversos trabajos demuestran que el propóleo estimula la inmunidad inespecífica y específica, tanto la inmunidad celular como la humoral. Revelan que una respuesta mediada por anticuerpos es superior cuando se emplea el propóleo como adyuvante

de vacunación antitetánica concluyendo que se estimulan los factores específicos y no específicos de la inmunidad.(53)

#### **I.1.6.6. Actividad antitumoral.**

Aun cuando los estudios sobre esta actividad biológica son recientes, se considera a este producto natural como uno de los postulantes más prometedores frente a la prevención y tratamiento del cáncer, por su rica composición química en compuestos fenólicos y flavonoides.(54)

En el 2015, en un estudio in vitro enfocado en evaluar la actividad antitumoral de propóleos egipcios, demostró su potente capacidad para inducir apoptosis de líneas celulares pertenecientes al cáncer de próstata (PC3) y, además, su aporte en la potenciación de los efectos antioxidantes y antiproliferativos del fármaco.(55)

La actividad antitumoral del propóleos ha sido estudiada in vitro en otros tipos de cáncer dando resultados prometedores, al actuar sobre aquellas células tumorales que resisten a la quimioterapia.(56-58)

#### **I.1.6.7. Otras actividades biológicas.**

Además de las actividades biológicas antes mencionadas, el propóleo ejerce también la función de fotoprotector, cicatrizante de heridas, antiasmática, antidiabética, antiplaquetario, hemostático, hepatoprotector, regenerador de tejidos, anestésico local y antiséptico.(28) Actualmente, se utiliza en medicina alternativa para tratar afecciones como la gastritis, quemaduras, infecciones de las vías respiratorias, dolor de garganta, periodontitis, mucositis oral, herpes simple y genital.(59)

### **I.1.7 Tinturas.**

#### **I.1.7.1 Generalidades.**

Son soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas que se obtienen extrayendo los principios útiles de drogas vegetales o animales. Se diferencian de los espíritus o alcoholes aromáticos en que usualmente se preparan con cuerpos volátiles. Se obtienen por lixiviación, maceración, solución o disolución, y los menstruos empleados en las tinturas oficiales son alcoholes, alcoholes diluidos en varias concentraciones, espíritu amoniacal aromático, agua amoniacal o mezclas de alcohol, agua y glicerina.(19) Estos deben disolver los componentes terapéuticos de las drogas sin extraer los principios inertes, y han de contener alcohol para que los preparados sean

estables y con el tiempo no sedimenten porciones de dichos componentes activos. Al seleccionarlos para la extracción de la droga se propone generalmente que la proporción de agua sea la mayor posible. Es precisamente una de las particulares ventajas que tienen, pues al `poseer bajas proporciones de alcohol pueden ser agregadas en pequeñas cantidades a preparados acuosos, sin ocasionar precipitación perceptible.(60, 61)

Usualmente las tinturas no son diluidas con soluciones acuosas ni con líquidos que contengan escaso porcentaje etanólico. Aunque se puede añadir alguna cantidad de tales líquidos sin precipitación notable, si se agrega una cantidad mayor se separa una parte de la sustancia extractiva de la tintura. Se alcanzan precipitaciones considerables cuando se adiciona una tintura a un volumen relativamente grande de vehículo que contenga poco alcohol. Muchas tinturas a causa de sus reacciones ácidas tienen ciertas incompatibilidades, algunas de ellas alcalinas. El tanino que contiene varias de estas soluciones ocasiona las reacciones de esta sustancia.(60, 61)

#### **I.1.7.2. Elaboración según método de Pichansky.**

Según la Norma Ramal # 312 de Salud Pública (1991) se establece el método de Pichansky para la elaboración de tinturas a partir del propóleo. Los pasos principales de dicho procedimiento se describen a continuación:

- Homogenizar el propóleo bruto, previamente enfriado
- Tomar muestra para determinar contenido de cera y materias insolubles.
- Verter el propóleo libre de impurezas mecánicas y homogenizado en recipiente de esmalte o acero inoxidable (AISI 304), con dimensiones adecuadas que permitan el proceso de agitación.
- Añadir el menstruo hidroalcohólico al 70 % poco a poco con agitación continua hasta que se desintegre (utilizar preferiblemente el filtrado de baja concentración disponible obtenido del punto 6), aplicar calor de ser posible a una temperatura entre 50 y 55 °C de 3 a 5 horas, o macerar entre 10 y 14 días con agitación periódica.
- Llevar a enfriamiento ( $\approx 58$  °C) y separar mecánicamente la cera.
- Extraer el producto terminado, filtrarlo con gasa.
- Medir concentración del filtrado.

- Repetir el proceso de maceración, extracción a la masa residual hasta agotar los sólidos solubles (hasta que los sólidos totales del filtrado se encuentren por debajo del 2%).
- Llevar la muestra al laboratorio de control de la calidad para verificar (mediante la determinación de los sólidos totales) el porcentaje de la tintura. En caso de estar por encima, diluir (teniendo en cuenta la ley de la volumetría) hasta llegar a la concentración adecuada. Garantizar el producto final con una concentración del 10% de sólidos totales.
- Se controlará las especificaciones de calidad del producto de acuerdo con lo descrito en la N de la URSS: RST – RSFSR 317-77
- Envasar.
- Etiquetar.(19)

El método anterior emplea calor moderado y etanol al 70% como menstuo, sin precisar con exactitud el tiempo de agitación. A partir del mismo, se propone trabajar a temperatura ambiente e incorporar el etanol al 96%.

#### **I.1.7.3. Parámetros de control de calidad**

Dentro de los ensayos de control de calidad reportados para las tinturas derivadas de productos naturales se encuentran la caracterización organoléptica, determinación del índice de refracción, pH, densidad relativa, contenido alcohólico, porcentaje de acidez y la determinación de sólidos totales donde se refiere como límite inferior permisible un 10%.(19, 20). A pesar de lo anterior en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos no están descritos estos ensayos para productos derivados del propóleo y en la Norma Ramal de Salud Pública # 312 solo se establecen los sólidos totales.(19, 21)

#### **I.1.7.4. Ensayos analíticos empleados en el control de calidad de tintura.**

La cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta (HPLC/UV) y la Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas (LC/MS) constituyen dentro de las técnicas de análisis, excelentes herramientas para el análisis de flavonoides, compuestos fenólicos y terpenos presentes en el propóleo y subproductos.(62)

Fernández y colaboradores (2020) desarrollan el perfil químico de propóleos, empleando la Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC/MS) y la

Cromatografía gaseosa de alta resolución con un detector de espectrometría de masas (GC-MS).(15-18)

Los perfiles cromatográficos de diferentes extractos de propóleos fueron analizados por HPLC con detector de fotodiodos (HPLC-PDA), utilizando una columna analítica termostaticada  $\mu$ Bondapak C-18.(63)

Se llevó a cabo un perfil de extractos de doce muestras de propóleos recolectadas de ocho regiones de Nigeria utilizando cromatografía líquida (LC) de alto rendimiento junto con dispersión de luz evaporativa (ELSD), detección ultravioleta (UV) y espectrometría de masas (MS), espectrometría de masas por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).(64)

La Cromatografía en Capa delgada (CCD), continúa empleándose con frecuencia debido a sus numerosas ventajas. Resulta un método rápido, económico y se puede utilizar como análisis previo a otros métodos como HPLC, CG, etc. Machala (2020) empleó la CCD para la caracterización química de tres muestras de propóleos; el perfil cromatográfico fue analizado utilizando dos fases móviles de diferente polaridad ( $C_6H_{14}/C_4H_8O_2$  y  $CHCl_3/CH_3OH$ ), lógicamente, buscando la separación de los metabolitos de manera diferenciada.(4)

Dentro de los métodos analíticos descritos con mayor frecuencia en la literatura para el estudio químico del propóleo, se destacan los siguientes: espectrofotometría, cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), espectrometría de masas de ionización por electroespray (ESI/EM), electroforesis capilar, cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía en capa delgada (CCD) y resonancia magnética nuclear (RMN).(26)

*MATERIALES*

*2*

*MÉTODOS*

## **2. Materiales y Métodos**

El procedimiento experimental fue desarrollado en el Centro de Producción Local de Medicamentos (área de producción) en el municipio de Santa Clara, provincia de Villa Clara, durante el mes de marzo del 2021.

Para ello, se utilizaron dos variedades de propóleos diferentes procedentes de apiarios de la provincia de Villa Clara. A partir de los mismos, se desarrolló la tecnología de elaboración según el método de Pichansky realizando modificaciones a la misma, para la obtención de la tintura de propóleo con fines farmacéuticos.

Se llevó a cabo un diseño factorial de experimento  $2^3$  y fueron determinados los parámetros de control de la calidad exigidos en la Norma Ramal Salud Pública # 312.

### **2.1. Equipos, materiales y solventes empleados**

#### Equipos

- Balanza analítica digital (RADWAG, AS 220.R2, Poland)
- Balanza técnica digital (ACCULAB, VICON, Sartorius, Estados Unidos)
- Densitómetro (Density Specific Gravity Meter, DA-130N, Kyoto, Japón)
- Plancha de calentamiento (IKA, C-MAG HP7, Alemania)
- Refractómetro digital (ABBE, WYA-S, URSS)
- pH-metro (HANNA, Estados Unidos)

#### Materiales

- Cápsulas de porcelanas
- Pipetas aforadas (10 mL)
- Beakers (1000 mL)
- 1 probeta (2000 mL)
- 1 probeta (100 mL)
- 1 probeta (50 mL)
- Agitadores de vidrio
- Copa graduada (1000 mL)
- Embudo de vidrio
- Papel de filtro
- Gasa

## Solventes

Agua destilada

Solución reguladora pH 4 y 7

Etanol al 70%

Etanol al 96%

### **2.2. Recolección del material vegetal.**

Se emplearon dos variedades de propóleos (uno de tonalidad castaño rojizo y el otro pardo), colectadas de forma manual por diferentes apiarios de la provincia Villa Clara.

#### **2.2.1 Preparación del material vegetal**

Se procedió a la eliminación de forma manual de las materias extrañas con relación a la droga objeto de estudio. Se disminuyó el tamaño de partícula de las muestras evaluadas, al desmenuzar de forma manual cada variedad.

### **2.3. Obtención de las tinturas según método de Pichansky modificado.**

Se desarrolló el procedimiento experimental general siguiente:

- Pesar la muestra de propóleo en balanza técnica digital.
- Homogenizar el propóleo bruto disminuyendo el tamaño de partícula de forma manual.
- Transferir a un Beaker de 1000 mL.
- Humectar con un volumen de 500 mL de menstuo hidroalcohólico.
- Macerar en un beaker tapado, durante un tiempo determinado con agitación periódica (cada 2h).
- Colar el extracto con gasa.
- Almacenar en frascos de vidrio ámbar con tapa de bakelita a temperatura ambiente.

Se realizó un diseño de experimentos factorial  $2^3$ , teniendo en cuenta la posible incidencia en la calidad tecnológica de la tintura de factores independientes tales como concentración de etanol (70 y 96%), tiempo de maceración (7 y 14 días) y variedad de propóleo (castaño-rojizo y pardo). Como factor respuesta se consideró el porciento de sólidos totales.

Se obtuvo un total de 8 formulaciones y sus réplicas, para su evaluación fisicoquímica (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles empleados para cada factor independiente en el diseño factorial 2<sup>3</sup>.

Formulación	Contenido de etanol (%)	Tiempo de maceración (días)	Variedad de propóleo
1	70	7	A
2	70	14	A
3	96	7	A
4	96	14	A
5	70	7	B
6	70	14	B
7	96	7	B
8	96	14	B

Leyenda: A: castaño-rojizo (color más intenso); B: pardo (color menos intenso)

Para el procesamiento estadístico de los resultados obtenidos se empleó el paquete de programas STATGRAPHICS CENTURION XV versión 15.2.14 del 2007.

#### **2.4. Caracterización física-química de las tinturas.**

Se cuantificó el porcentaje de sólidos totales (%) de las tinturas en el Laboratorio Provincial de control de la calidad de Fitofármacos y Apifármacos de Villa Clara, según se establece en la Norma Ramal de Salud Pública # 312.

##### **2.4.1. Determinación de sólidos totales.**

De la muestra de ensayo previamente homogeneizada se transfirió 5 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada. Se evaporó la muestra en una plancha de calentamiento hasta que el residuo estuvo aparentemente seco. Al alcanzar temperatura ambiente se pesó. Se repitió el proceso anterior las veces necesarias, hasta obtener masa constante. Esta determinación se realizó a cada extracto por triplicado y posteriormente se calculó el promedio y se determinó el valor de los sólidos totales en % (g en 100 mL).

**Expresión de los resultados:** El porcentaje de los sólidos totales (St) se calculó mediante la expresión siguiente:

$$St=(Pr-P) /V *100$$

donde:

$P_r$  masa de la cápsula más el residuo (g)

$P$  masa de la cápsula vacía (g)

$V$  volumen de la porción de ensayo (mL)

100 factor matemático

Se evaluaron de forma adicional, otros parámetros de calidad como son la densidad relativa, índice de refracción y pH.

#### **2.4.2. Determinación de pH.**

Se ajustó el equipo con la solución reguladora adecuada al rango en que se realizará la determinación del valor del pH de la muestra (entre 4 y 7). Se introdujo directamente el detector del pH-metro en la muestra y se realizó la lectura a una temperatura determinada. Se realizaron 2 réplicas en cada caso. La determinación se realizó a una temperatura de 27.5°C.

#### **2.4.3. Determinación del índice de refracción.**

Se colocó sobre el prisma de medición del refractómetro una gota de agua destilada, utilizando para ello un gotero. Se ajustó el instrumento seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual. El ajuste se realizó moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro. A continuación, se realizó la lectura de una gota de la muestra de ensayo. Se realizaron 2 réplicas. La determinación del índice de refracción ( $n$ ), se realizó a una temperatura de 27.5°C.

#### **2.4.4 Determinación de la densidad relativa.**

Se determinó la densidad relativa ( $\rho$ ) de la muestra de ensayo con el densitómetro digital, anteriormente calibrado con agua destilada a una temperatura determinada (27.5°C).

RESULTADOS

24

DISCUSIÓN

### **3. Resultados y Discusión.**

#### **3.1. Consideraciones generales en el diseño del estudio.**

La tintura de propóleo elaborada en los Centros de Producción Local (CPL) de Villa Clara, presenta alta demanda en la población por sus usos terapéuticos como antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria e inmunomoduladora. En la actualidad, se han presentado dificultades en la calidad de las tinturas obtenidas, específicamente en el contenido de sólidos totales (inferior al 10%).

Atendiendo a una solicitud de la Empresa Provincial de Farmacias y ópticas de Villa Clara, se desarrolló la optimización de la tecnología de elaboración de la tintura según el método de Pichansky. El mismo incluye la utilización como disolvente de un menstro hidroalcohólico al 70%, un tiempo de maceración de 10 a 14 días y el empleo de calor moderado (temperatura entre 50-55°C). Teniendo en cuenta las condiciones materiales de los CPL donde no es posible el control de la temperatura, en la presente investigación se mantuvo el proceso extractivo a temperatura ambiente.

Se describe en la literatura que la mayor parte de los principios activos del propóleo no son solubles en agua y se concluye que para un mejor aprovechamiento de las propiedades terapéuticas se recomienda que el disolvente sea de naturaleza alcohólica. Los disolventes más utilizados son etanol absoluto, metanol y mezclas hidroalcohólicas (etanol o metano/agua).(4, 31, 40)

Estudios recientes han demostrado que otros factores como la temperatura, concentración del disolvente y el tiempo de extracción, también pueden influir notablemente en la extracción de compuestos bioactivos, especialmente los compuestos fenólicos. En otros procesos de elaboración de las tinturas descritos en la literatura, se emplea el etanol a concentraciones superiores al 70%.(4, 40, 65)

De igual forma la maceración es un proceso de extracción que según se reporta en la bibliografía, puede realizarse en un período de tiempo entre (7 y 14 días).(4, 40, 60, 61) Específicamente, en el método de Pichansky, se establece un tiempo de maceración entre 10 y 14 días. En los CPL actualmente se desarrolla dicho procedimiento durante 7 días.

La coloración de los propóleos es heterogénea pudiendo presentar tonos castaños o rojizos característicos de propóleos cubanos, y en otras ocasiones se manifiestan pardos o negros. Las diferencias en el color pueden estar relacionadas con la composición química de cada variedad.(26)

En la presente investigación se emplearon dos tipos de propóleo de diferente coloración (castaño-rojizo y pardo) (Fig. 1 y 2)



Fig. 1. Imagen del propóleo castaño-rojizo (A)



Fig. 2. Imagen del propóleo pardo (B)

Se conoce que las características organolépticas y la composición química del propóleo, dependen directamente de la flora circundante, zona geográfica y de la época de recolección.(4, 41). En la presente investigación no se pudo precisar a partir de la fuente suministradora (Apicultura, Villa Clara) los diferentes productores por localidad, lo cual impidió arribar a conclusiones al respecto.

No se tuvo en consideración la evaluación de la influencia del tamaño de partícula en la eficacia del proceso de extracción aplicado, atendiendo a las condiciones materiales existentes en los CPL.

### **3.2. Optimización de la tecnología de elaboración de las tinturas, según método de Pichansky modificado.**

Atendiendo a las consideraciones referidas en el acápite 3.1, se consideró el empleo como disolvente de una mezcla hidroalcohólica en dos concentraciones (70 y 96%); dos tiempos de maceración (7 y 14 días) y dos variedades de propóleo de diferente intensidad de color (A: castaño-rojizo y B: pardo).

### 3.3. Caracterización física-química de las tinturas.

El único parámetro que se establece en la Norma Ramal # 312 para el control de la calidad de la tintura de propóleo es el % de sólidos totales donde se refiere como límite inferior permisible un 10%.

- **Determinación de sólidos totales**

Los resultados obtenidos en la cuantificación de los sólidos totales de las 8 formulaciones y sus réplicas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados obtenidos de sólidos totales (%) para cada variante analizada.

Formulación	Concentración de etanol(%)	Tiempo de maceración (días)	Variedad de propóleos (intensidad de color)	% sólidos totales (media±SD)
1	96	14	A	24.10 ± 0.169
2	96	7	A	23.02 ± 0.113
3	70	14	A	12.84 ± 0.142
4	70	7	A	8.51 ± 0.009
5	96	14	B	10.12 ± 3.131
6	96	7	B	8.99 ± 0.586
7	70	14	B	7.78 ± 0.378
8	70	7	B	6.34 ± 0.902

Leyenda: A: castaño-rojizo (color más intenso); B: pardo (color menos intenso)

Como se aprecia en la Tabla # 3 la concentración de etanol es un factor determinante en el contenido de los sólidos totales obtenidos para cada formulación. A mayor concentración de etanol, mayor rendimiento de sólidos totales en ambas variedades, resultado lógico teniendo en cuenta que se logra una mayor solubilización de los componentes presentes. Lo anterior coincide con lo descrito en la bibliografía.(4, 40, 65)

El tiempo de maceración influye de forma directa con relación al contenido de sólidos totales, siendo mayoritario el resultado obtenido a los 14 días de maceración para ambas variedades evaluadas.

Un análisis de la variedad de propóleo permite concluir que en la A se obtienen los mayores valores de sólidos totales para una misma condición. Esta variedad, se caracteriza por presentar una coloración castaño-rojizo, distinguida por una mayor concentración de metabolitos, lo cual coincide con lo descrito en la literatura.(19, 25, 26, 66)

#### **Análisis estadístico de los resultados.**

Como resultado del análisis de varianza del % de sólidos totales se concluye que todos los factores son altamente significativos (concentración de etanol, variedad de propóleo y tiempo de maceración). Además, se aprecia que solo la interacción entre el factor concentración de etanol y la variedad de propóleo es altamente significativa (Tabla #4).

Tabla #4. Análisis de varianza para el % de sólidos totales.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Conc	236.644	1	236.644	159.55	0.0000
B:Time	15.962	1	15.962	10.76	0.0095
C:Var	310.508	1	310.508	209.35	0.0000
INTERACTIONS					
AB	3.16573	1	3.16573	2.13	0.1780
AC	107.905	1	107.905	72.75	0.0000
BC	2.01002	1	2.01002	1.36	0.2743
RESIDUAL	13.3488	9	1.4832		
TOTAL (CORRECTED)	689.545	15			

En el Grafico #1 se describe la interacción entre los factores, concentración de etanol y variedad de propóleo. Se observa que a niveles pequeños de concentración existen diferencias significativas entre los porcentos de solidos totales entre las variedades A y B, donde la A muestra mayores rendimientos que la B, aunque estos valores nunca bajan significativamente del 10%. En el caso de la variedad B sus valores si se alejan significativamente del 10%. A niveles altos de concentración, se observan mayores diferencias entre los rendimientos de las variedades.

La variedad A alcanza niveles superiores al 20% de sólidos totales y la variedad B no alcanza niveles superiores al 10%. Esto confirma el planteamiento de que los propóleos de color castaño-rojizo poseen según la literatura un mayor contenido de componentes activos.(19, 25, 26, 66)

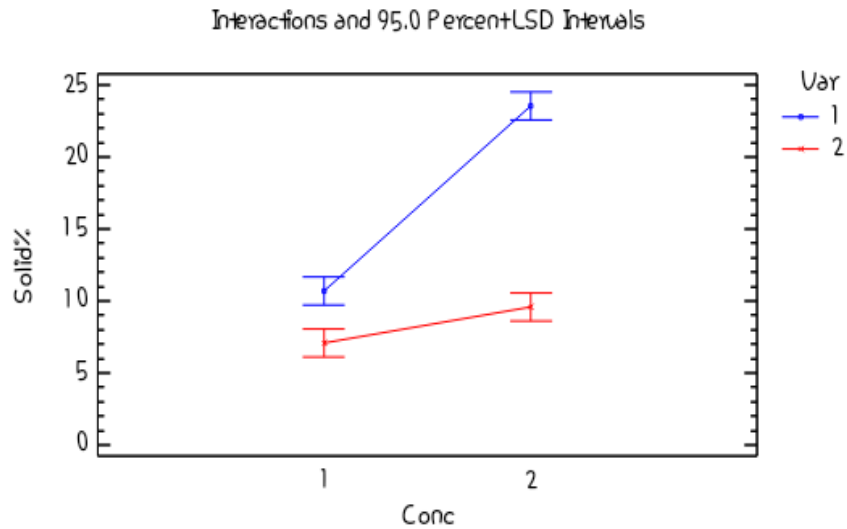


Grafico # 1. Influencia de la concentración de etanol y variedad de propóleo en el contenido de sólidos totales.

Leyenda: Concentración 1 (70%); Concentración 2 (96%)

Variedad 1 (A); Variedad 2 (B)

En el caso del factor tiempo de maceración se observa que a medida que aumenta este factor aumentan significativamente los rendimientos de sólidos totales. (Grafico # 2). No obstante, teniendo en cuenta que a los 7 días el rendimiento de los sólidos totales es superior al 10%, se decidió proponer en la presente investigación su utilización en la tecnología de elaboración de la tintura. Este ahorro de tiempo implica una optimización del proceso productivo de la tintura y por consiguiente de otras formulaciones derivadas de la misma (cremas y ungüentos) .(19) Este procedimiento resultaría menos laborioso para los operarios.

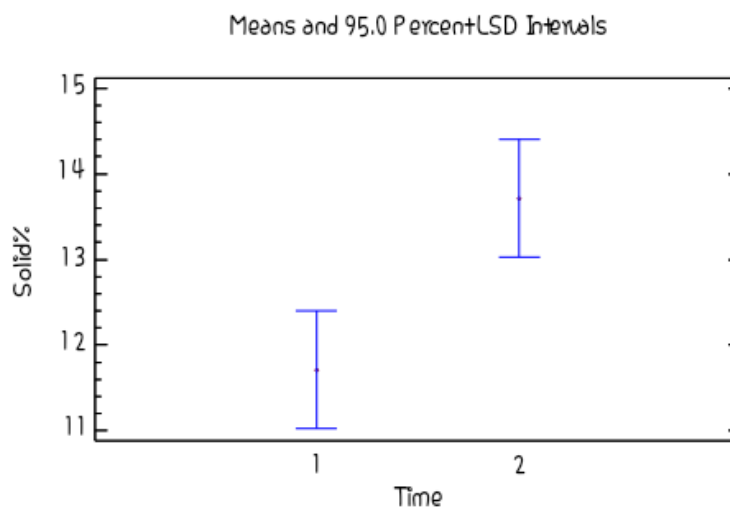


Grafico # 2. Influencia del tiempo de maceración en el contenido de sólidos totales.

Leyenda: Tiempo 1 (7 días); Tiempo 2 (14 días)

Un análisis integral de los resultados obtenidos, permite concluir que cuando se somete la variedad A a un tiempo de maceración de 7 días, empleando como menstruo el etanol al 96% se obtiene un elevado contenido en sólidos totales (23,02 %  $\pm$  0,113) (Tabla #3). El resultado anterior duplica el límite permisible de sólidos totales según la Norma Ramal de Salud Pública # 312.

La reducción del tiempo de maceración en este procedimiento optimizado simplifica el proceso de elaboración de la tintura siendo más productivo. De igual forma, resulta menos laborioso para los operarios.

A pesar de que en la Norma Ramal de Salud Pública #312 solo se refieren los sólidos totales como parámetro de control de calidad de las tinturas de propóleo, en el presente estudio se proponen otros criterios de calidad (pH, índice de refracción y densidad relativa), los cuales aparecen descritos para otras tinturas de origen natural en la literatura especializada.(19, 20, 67).

Teniendo en cuenta que a los 7 días de maceración y 96% de etanol como disolvente, se obtiene un contenido de sólidos totales superior al 10% (duplica este valor) para la variedad A y muy cercano al 10% para la B, se decidió determinar los restantes

parámetros de calidad (pH, índice de refracción y densidad relativa) a las tinturas obtenidas de cada variedad bajo esta condición.

### 3.3.1. Determinación de parámetros de calidad (pH, índice de refracción y densidad relativa).

Los resultados obtenidos en la determinación de los índices de calidad de las formulaciones para cada variedad y sus réplicas se muestran en las Tablas # 5 y 6.

Tabla #5. Resultados obtenidos de los índices de calidad para las tinturas recién elaboradas (7 días) (Variedad A).

<b>Variedad de propóleo (A) (castaño-rojizo)</b>			
<b>Parámetros de calidad</b>	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>(Media <math>\pm</math>SD)</b>
Índice refracción	1.404	1.402	1.403 $\pm$ 0.001
Densidad relativa	0.912	0.859	0.885 $\pm$ 0.037
pH	4.632	4.642	4.637 $\pm$ 0.007

Tabla #6. Resultados obtenidos de los índices de calidad para las tinturas recién elaboradas (7 días) (Variedad B).

<b>Variedad de propóleo (B) (pardo)</b>			
<b>Parámetros de calidad</b>	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>(Media <math>\pm</math>SD)</b>
Índice refracción	1.381	1.387	1.384 $\pm$ 0.004
Densidad relativa	0.864	0.868	0.866 $\pm$ 0.003
pH	4.470	4.780	4.625 $\pm$ 0.219

Al analizar los resultados obtenidos para ambas variedades bajo la condición analizada, se obtiene en la variedad B una ligera disminución de los valores de los parámetros de calidad. Dichos resultados, se encuentran acorde con lo planteado en la literatura que describe que la coloración del propóleo es indicativa de la concentración de componentes activos presentes en este.(19, 25, 26, 66)

La variedad B atendiendo a su coloración parda sugiere una menor concentración de componentes activos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para los parámetros de calidad (índice de refracción y densidad relativa). La tintura de propóleo

se considera una matriz compleja de origen natural, donde se encuentran presentes metabolitos de una amplia diversidad estructural que aportan a los valores absolutos de los parámetros de calidad. Lo anterior justifica los resultados obtenidos ligeramente superiores para la variedad A.

Teniendo en cuenta que la variedad A presentó los mejores resultados de todos los índices de calidad bajo la condición de extracción referida, se decidió realizar un estudio de estabilidad preliminar (7 meses), considerando todos los parámetros de calidad.

### 3.4. Estabilidad físico química preliminar de las tinturas elaboradas con la variedad A.

Los resultados obtenidos en dicho estudio de estabilidad se reportan en la Tabla # 7.

Tabla # 7. Resultados obtenidos de los índices de calidad para las tinturas elaboradas con la variedad A a los 7 meses de almacenamiento.

<b>Variedad de propóleo (A) (castaño-rojizo)</b>			
<b>Parametros de calidad</b>	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>(Media ±SD)</b>
Índice refracción	1.389	1.394	1.392±0.004
Densidad relativa	0.917	0.924	0.921±0.005
pH	5.04	5.19	5.115±0.106

El valor ligeramente superior de la densidad relativa absoluta de las tinturas a los 7 meses de elaboradas se considera lógico teniendo en cuenta la posible degradación de los metabolitos presentes que puede generar un mayor número de moléculas en el medio con sus correspondientes densidades.

El ligero incremento de los valores de pH de las tinturas a los 7 meses de elaboradas es indicativo de la posible formación de moléculas con mayor carácter básico.

Al analizar los límites permisibles de los parámetros de calidad evaluados para otras tinturas de origen natural descritos en la literatura,(19) se observa que los valores obtenidos en el presente estudio cumplen con los criterios de aceptación, tanto en las tinturas recién elaboradas como a los 7 meses de almacenadas (Tabla # 8).

Tabla # 8. Parámetros de calidad evaluados en otras tinturas de origen natural.

<b>Parámetros de calidad</b>			
<b>Tinturas</b>	<b>Índice refracción</b>	<b>Densidad</b>	<b>pH</b>
Ají picante	1.360±0.010	0.800±0.500	5.5±1.0
Guacamaya francesa	1.360±0.010	0.900±0.010	5.5±1.0
Guayaba	1.365±0.008	0.901±0.009	5.6±0.3
Hierba buena	1.363±0.017	0.906±0.005	5.9±0.3
Naranja agria	1.370±0.010	0.858±0.101	5.2±1.0
Toronjil de menta	1.360±0.010	0.890±0.020	5.3±1.0

Las plantas medicinales referidas en la Tabla # 8 presentan composición química similar al propóleo (compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos), lo cual justifica los valores obtenidos.

Los resultados de los parámetros de calidad de las tinturas de propóleos se consideran aceptables y constituyen las premisas iniciales para el establecimiento en estudios posteriores de los límites de especificación de calidad de las formulaciones.

*CONCLUSIONES*

## **Conclusiones**

- La tecnología de elaboración de la tintura de propóleo a través del método de Pichansky modificado simplifica el proceso de obtención siendo más productivo y menos laborioso.
- La concentración de etanol, el tiempo de maceración, la variedad de propóleo y la interacción concentración de etanol y variedad de propóleo, son factores que influyen significativamente en el rendimiento de los sólidos totales de la tintura.
- La tintura obtenida a partir de la variedad de propóleo A (castaño-rojizo) a los 7 días de maceración y 96% de etanol presentó el mayor contenido de sólidos totales (duplica el límite permisible).
- Los resultados obtenidos para los parámetros de calidad (índice de refracción, densidad relativa y pH) de las tinturas obtenidas a partir de la variedad A (7 días y 96% de etanol, tanto recién elaboradas como a los 7 meses de almacenadas), se consideran aceptables y constituyen las premisas para el establecimiento futuro de los límites de especificación de calidad de la tintura de propóleo.

*RECOMENDACIONES*

**Recomendaciones.**

1. Se sugiere evaluar en estudios futuros la influencia del tamaño de partícula del propóleo y la temperatura de extracción en el rendimiento de los sólidos totales.
2. Establecer en investigaciones posteriores los límites de especificaciones de calidad de los parámetros de calidad (índice de refracción, pH y densidad relativa).

## Referencias bibliográficas.

1. Maldonado L, Borelli R, Salomon V, Alvarez A, Sayago J, Isla M, et al. Clasificación geográfica de propóleos de Tucumán utilizando parámetros físicoquímicos y análisis quimiométrico. *Rev Investig Agropecuarias*. 2018;44(3):324-32.
2. Delgado M, Andrade J, Ramírez C. Caracterización físicoquímica de propóleos colectados en El Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Rev Mex Cienc Forestales*. 2018;6(28):74-97.
3. Ozdal T, Sari G, Mutlu E, Boyacioglu D, Capanoglu E. Evaluation of turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity, anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line. *Journal of Apicultural Product Research*. 2018;57(5):627-38.
4. Carrasco L, Cepeda N. Caracterización química y actividad antioxidante de tres muestras de propoleos ecuatorianos [Trabajo de Diploma]. Machala: Universidad Técnica de Machala; 2020.
5. Sánchez F. Perfil químico y evaluación de actividad antioxidante de propóleos recolectados en La Región Del Bajo Cauca Antioqueño [Tesis en opción al título de Magister en Ciencias Químicas]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; 2018.
6. Lopes M, Nunes LF, Falcão SI, Vilas M. Harmonização de metodologias de análise da própolis. *Rev Ciências Agrárias*. 2017;40(Spe):208-15.
7. Sosa AA, Cabrera MG, Álvarez MY. Parámetros físicos y características organolépticas de propóleos provenientes de la provincia de Misiones, Argentina. *J Selva Andin Biosph*. 2017;5(1):51-8.
8. Silva M, Torres A, Hoffmann W. Determinación de propiedades físicoquímicas de propóleos provenientes de cinco especies de abejas sin aguijón de Norte de Santander-Colombia. *Bistua Rev Fac Cienc Basic*. 2016;14(1):3-16.
9. Puerto NJ, Prieto GA, Castro SR. Análisis proximal y físicoquímico de propóleos (propolis) provenientes de apiarios boyacenses. *Rev Fac Cienc Basic*. 2016;14(2):126-40.
10. Salgueiro FB, Castro RN. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. *Quim Nova*. 2016;39(10):1192-9.
11. Campo M, Cuesta O, Montes R, Porto DO. Qualitative analysis of cuban propolis by thin layer chromatography. *Lat Am J Pharm*. 2008;27(3):380-6.
12. Bastos E, Guzman D, Figueroa J, Tello J, Scoaris DO. Caracterización antimicrobiana y físicoquímica de muestras de propóleos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) de la Región Andina Colombiana. *Acta biol Colomb*. 2011;16(1):175–84.
13. Anjum S, Ullah A, Khan K, Attaullah M, Khan H, Ali H, et al. Composition and functional properties of propolis. *Scienc Direct*. 2019;26(7):1695-703.
14. Bankova V, Bertelli D, Borba R, Conti BJ, Da Silva IB, Danert C, et al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *J Apicult Research*. 2019;58(2):1-49.
15. Fernández MC, Navarro ML, Blanco MT, Gómez C, Pérez C, Vadillo V. Chemical Profile and Antibacterial Activity of a Novel Spanish Propolis with New Polyphenols also Found in Olive Oil and High Amounts of Flavonoids. *molecules*. 2020;25(15):17.
16. Tomšić R, Heath D, Heath E, Markelj J, Kandolf A, Prosen H. Determination of Neonicotinoid Pesticides in Propolis with Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *molecules*. 2020;25(4):5870.
17. Severus D, Pasca C, Moise AR, Bobis O. Plant Sources Responsible for the Chemical Composition and Main Bioactive Properties of Poplar-Type Propolis. *plants*. 2020;10(3):20.

18. Da Cruz A, Da Silva M, Oliveira J, Kamiya R, Arruda R, Vieira DA. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. *Journal Pharmaceutical Analysis*. 2017;7(5):280-7.
19. Leonor EM. Derivados del Propóleos In: Pública MdS Fd, editor. *Formulario Nacional Fitofármacos y Apifármacos*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2010. p. 129-40.
20. Dehesa M. Control de calidad de los fitofármacos: Ecuador uso y comercio de plantas medicinales. Situación actual y aspectos importantes para su conservación. *Rev Cienc Social Humanas*. 2007;1(2):139-52.
21. Norma Ramal de Extractos Fluidos y Tinturas 312, (1991).
22. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Parque YK. Recent progress of propolis for its biological and Chemicals compositions and its botanical origin.: PubMed; 2014.
23. Rufatto LC, Dos Santos DA, Marinho F, Henriques JA, Roesch M, Moura S. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacif J of Trop Biomedic*. 2017;7(7):591-8.
24. Vargas RD, Torrescano GR, Sánchez A. El propóleos: Conservador potencial para la industria alimentaria. *Intercienc*. 2013;38(10):705-11.
25. Martínez J. Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño [Tesis de Maestría]. Medellín: Universidad Nacional de Colombia sede Medellín; 2009.
26. Campo M. Estudio Químico de Propóleos Rojos Cubanos [Tesis Doctoral]. La Habana: Universidad de La Habana; 2007.
27. Palomino LR, García CM, Gil J, Rojano BA, Durango DL. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia). *Fac Ciencias Agrar*. 2009;63(1):388-95.
28. Al M. Propolis and its direct and indirect hypoglycemic effect. *J Fam Community Med*. 2011;18(3):152-4.
29. Kuropatnicki AK SE, Krol, W. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-based Comp Alt Med*. 2013:1-11.
30. Soto MR. Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. In *Cresc*. 2015;6(2):22-32.
31. Dos Santos DC, David JM, Pereira JD. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. *Quim Nova*. 2017;40(2):171-5.
32. Pobiega K, Kraśniewska K, Derewiaka D, Gniewosz M. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *Sci Technol*. 2019;56(12):5386-95.
33. Nogueira K, Rodriguez E, De Franca M. Propolis and Its cosmetic applications: a technological prospection. *Journal of Young Pharmacists*. 2019;11(4):350-2.
34. Morales J, Landa M, García S, Lavoignet M. Técnicas de recolección inteligente de productos apícolas aplicadas en colmenas de la región de Misantla. *Rev Ingeniantes*. 2019;3(2):5-6.
35. Martínez G, Garcia CM, Durang DL, Gil JH. Caracterización de propóleos provenientes del Municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *MVZ Cordoba*. 2012;17(1):17.
36. Noriega V. El propóleo, otro recurso tereapéutico en la práctica clínica [Trabajo de Diploma]: Universidad de Cantabria; 2014.
37. Cuenca JJ. Comparación de dos tipos de mallas plásticas en la producción de propóleos con abejas Apis Mellifera en la parroquia Olmedo Del Cantón Olmedo [Tesis de grado]. Ecuador: Universidad Nacional de Loja 2015.

38. Belfar ML, Lanez T, Rebiai A, Z G. Evaluation of antioxidant capacity of propolis collected in various areas of Algeria using electrochemical techniques. *Int J Electrochem Sci.* 2015;10(1):9641-51.
39. Hernández MS, Abraham MR, Cerón A, Ozuna C, Gutiérrez AA, Segoviano JJ, et al. Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Sci Technol.* 2018;38(2):210-5.
40. Moncayo M, Moreno A, Galván G, Reyes J, Carrillo M. Antibacterial activity and phenolic content of propolis extracts obtained by different extraction methods. *Nova Scientia.* 2018;10(20):397-412.
41. De Souza EC, Da Silva EJ, Cordeiro HK, Lage NM, Da Silva FM, Dos Reis DL, et al. Chemical compositions and antioxidant and antimicrobial activities of propolis produced by *Frieseomelitta longipes* and *Apis mellifera* bees. *Quim Nova.* 2018;41(5):485-49.
42. Palomino LR, Martínez J, García CM, Durango DL, Gil JH. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Rev Fac Nac Agron Medellín.* 2009;63(1):5373-83.
43. Cuesta O, Campo M, Márquez I, Jaramillo C, González V, Montes R, et al. Chemical profile and antileishmanial activity of three ecuadorian propolis samples from Quito, Guayaquil and Cotacachi Regions. *Fitoterapia.* 2017;120:177-83.
44. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento, (2017).
45. Rengifo RA. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. *Revista Farmaciencia.* 2013;2(Spe).
46. Cano TM, Cano EJ, Ortiz CP, Godínez JE, Barrientos M, Saravia JM, et al. Evaluación de la capacidad de tinción de los tintes obtenidos de dos especies forestales guatemaltecas, en el proceso de teñido de fibras, lana y maguey. [Trabajo de Diploma]. Guatemala: Universidad De San Carlos De Guatemala; 2006.
47. Monedero JM. Identificación y caracterización de flavonoides por espectrometría de masas en melazas residuales de un ingenio azucarero [Trabajo de Diploma]. Santiago de Cali: Universidad ICESI; 2016.
48. Cabral IS, Oldoni TL, Prado A, Bezerra RM, De Alencar SM, Ikegaki M, et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis Vermelha Brasileira. *Quim Nova.* 2009;32(6):1523-7.
49. Araújo KS, Dos Santos JF, Sato MO, Finco FD, Soares IM, Barbosa R, et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (*Meliponinae*) and *apis* from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amaz.* 2016;46(1):61-8.
50. Tolosa EL. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *ARS Pharm.* 2002;43(1).
51. Monzote L, Sariego I, García M, Cuesta O, Márquez I, Campo M, et al. Activity of cuban propolis extracts on *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. *Nat Prod Commun.* 2011;6(7):973-6.
52. Silva R, Baltazar F, Almeida C. A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-based Compl Alt Med.* 2015:1-29.
53. FRITZ JA. Caracterización química del propóleo chileno [Tesis de Grado]. Valdivia-Chile: Universidad Austral de Chile; 2011.
54. Oršolić N. A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *Journal of ApiProduct & ApiMedical Science* 2010;2(1):1-20.

55. Salim EI, Abd AD, Farara KM, Maria DS. Antitumoral and antioxidant potential of egyptian propolis against the PC3 prostate cancer cell line. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(17): 7641-51.
56. Ang ES, Pavlos NJ, Chai LY, Qi M, Cheng TS, Steer JH, et al. Caffeic acid phenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the suppression of RANKL-Induced NF-KB and NFAT activity. *J Cell Physiol.* 2009;221(3):642-9.
57. Chen MJ, Chang WH, Lin CC, Liu CY, Wang TE, Chu CH, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreat.* 2008;8(6):566-76.
58. Xiang D, Wang D, He Y, J. X, Zhong Z, Li Z, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the  $\beta$ -catenin/t-cell factor signaling. *Antic Drugs.* 2006;17(7):753-62.
59. Cuesta O, Campo M, Márquez I, Rosado A, Piccinelli A, Rastrelli L. Nuevas benzofenonas preniladas en propóleos cubanos. *Rev Cuba Quim.* 2005;17(3):238.
60. Felton L, editor. Remington. 22 ed. London: Pharmaceutical Press; 2012.
61. Fullerton E, Martin E. *Farmacia Práctica de Remington.* 20 ed. México: Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana de México; 2005. 297-9 p.
62. Rok T, Heath D, Heath E, Markelj J, Kandolf A, Prosen H. Determination of Neonicotinoid Pesticides in Propolis with Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *molecules.* 2020;25(24):12.
63. Schmidt EM, Stock D, Chada FJG, Finger D, Frankland CH, Eberlin MN, et al. A Comparison between Characterization and Biological Properties of Brazilian Fresh and Aged Propolis. *BioMed Research International.* 2014:10.
64. Ruwida O, John O, T. Z, Gray A, Ebiloma G, Clements C, et al. The Chemical Characterization of Nigerian Propolis samples and Their Activity Against *Trypanosoma brucei* SCIENTIFIC REPORTS. 2017;7(2):9.
65. Park YK, Ikegaki M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *BiosciBiotechnolBiochem.* 2007;62(11):2230-2.
66. Peña R. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Cienc Inv Agr.* 2008;35(1):17-26.
67. Bullaín M, Avilés Y, Viera Y, Guardia Y, Estrada E. Control de calidad de la tintura al 20 % de hojas de *Faramea occidentalis* (L.) A. Rich. (Nabaco). *Rev Cubana Plant Med.* 2016;21(2):157-67.