

Propuesta de un método para la elaboración de la tintura de propóleos

Proposal of a Method for the Elaboration of Propolis Tincture

Miguel Ángel Alba de Armas¹ <https://orcid.org/0000-0002-4183-789x>

Yanelis Saucedo Hernández¹ <https://orcid.org/0000-0001-5146-5164>

Lietsy Sotolongo Moya¹ <https://orcid.org/0000-0002-4610-9728>

Oswaldo Norman Montenegro² <https://orcid.org/0000-0001-5132-4556>

Melissa Lliliam Gómez Saucedo¹ <https://orcid.org/0000-0001-5155-495x>

María Elisa Jorge Rodríguez¹ <https://orcid.org/0000-0002-1786-9840x>

Caridad de los Ángeles Calero Pérez³ <https://orcid.org/0000-0002-0224-6667>

¹Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Facultad de Química–Farmacia, Departamento de Farmacia. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

²Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Centro de Bioactivos Químicos. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

³Laboratorio de Producción de Medicamentos, Centro de Producción Local Santa Clara. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

*Autor para la correspondencia: malba@uclv.edu.cu

RESUMEN.

Introducción: La tintura de propóleos elaborada en los centros de producción local de Villa Clara presenta una alta demanda por su diversidad de usos, y en su control de calidad se obtuvo un contenido de sólidos totales variable e inferior al 10 %.

Objetivo: Evaluar factores independientes en la tecnología de elaboración de la tintura de propóleos en los centros de producción local de Villa Clara.

Métodos: Se realizó el análisis de la tecnología de elaboración de la tintura empleada en los centros de producción local de Villa Clara y se propuso una nueva

metodología para garantizar un producto que cumpla con los requerimientos de calidad establecidos. Se realizó un diseño de experimentos factorial 2^3 cuyos factores independientes y niveles fueron tipo de disolvente (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 propóleos (color pardo nivel bajo y color castaño rojizo nivel alto). Las variables respuestas fueron el contenido de sólidos totales, fenoles y flavonoides totales. Se evaluaron la densidad relativa, índice de refracción y pH como otros índices de calidad.

Resultados: Con la tecnología de elaboración evaluada se obtuvo un elevado contenido de sólidos totales (23,02 %), de fenoles y flavonoides totales (278,87 (EAG mg/g ESP) y 89,40 (ER mg/g ESP), en la cual se empleó el propóleo de color castaño rojizo, etanol al 96 % como disolvente y tiempo de extracción de 7 días. El pH, índice de refracción y densidad relativa de la tintura fueron similares a los reportados en las normas oficiales para tinturas y extractos vegetales.

Conclusiones: La concentración del disolvente, variedad de propóleos y el tiempo de extracción utilizados influyeron de manera significativa en el contenido de sólidos, fenoles y flavonoides totales.

Palabras clave: tintura; propóleos; tecnología de elaboración; índices de calidad.

ABSTRACT.

Introduction: The propolis tincture elaborated in the local production centers of Villa Clara presents a high demand due to its diversity of uses, and in its quality control a variable total solids content and lower than 10 % was obtained.

Objective: To evaluate independent factors in the processing technology of propolis tincture in the local production centers of Villa Clara.

Methods: The analysis of the processing technology of the dye used in the local production centre's Villa Clara was carried out and a new methodology was proposed to guarantee a product that complies with the established quality requirements. A 23 factorial experiment design was carried out, whose independent factors and levels were type of solvent (low level 70% ethanol and high level 96%

ethanol), extraction time (7 days low level and 14 days high level) and variety of propolis (brown colour low level and reddish-brown colour high level). The response variables were total solids, phenols and total flavonoids. Relative density, refractive index and pH were evaluated as other quality indexes.

Results: With the processing technology evaluated, a high content of total solids (23.02 %), total phenols and flavonoids (278.87 (EAG mg/g ESP) and 89.40 (ER mg/g ESP) was obtained, in which reddish-brown propolis, 96 % ethanol as solvent and extraction time of 7 days were used. The pH, refractive index and relative density of the tincture were similar to those reported in the official standards for tinctures and plant extracts.

Conclusions: The solvent concentration, propolis variety and extraction time used significantly influenced the content of solids, phenols and total flavonoids.

Keywords: tincture; propolis; processing technology; quality indexes.

Recibido: 03/11/2024

Aceptado: 18/11/2024

Introducción

El *propóleo* es una mezcla de sustancias de apariencia resinosa muy útil principalmente en medicina tradicional desde la antigüedad debido a sus diversas propiedades biológicas antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, inmunomoduladora y antioxidante, entre otras.^(1,2)

Las características organolépticas del propóleo (olor, color y sabor) dependen de varios factores como la composición química, la fuente botánica circundante, la zona geográfica y la época de recolección, etc.⁽³⁾

A partir del propóleo en bruto se obtienen extractos concentrados, con los que se elaboran diferentes formas de dosificación como cremas, ungüentos y tinturas. Las tinturas son soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas que se obtienen extrayendo

los principios útiles de drogas animales o vegetales por lixiviación, maceración, solución o disolución. Los menstros empleados en las tinturas oficiales son alcoholes diluidos en varias concentraciones o mezclas de alcohol, agua y glicerina.⁽⁴⁾

En Cuba existen tres variedades de propóleos que difieren en su color (amarillo, pardo y rojo) y por tanto en su composición química.⁽⁵⁾ En los centros de producción local (CPL) de Villa Clara se dispone de las variedades de color rojo y pardo provenientes de los diferentes apiarios de la provincia. La tecnología de elaboración oficial para la tintura de propóleos según el método de Pichansky en la norma ramal # 312 de Salud Pública⁽⁶⁾ (1991), establece el empleo de etanol al 70 %, a una temperatura entre 50 y 55 °C de 3 a 5 horas y maceración entre 10 y 14 días con agitación periódica.

Dentro de los ensayos de control de calidad reportados para las tinturas derivadas de productos naturales se encuentran la caracterización organoléptica, la determinación del índice de refracción, el pH, la densidad relativa, el contenido alcohólico, el porcentaje de acidez y la determinación de sólidos, fenoles y flavonoides totales.^(6,7)

En el caso de la tintura de propóleo en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos⁽⁴⁾ (2017), este solo refiere como índice de calidad el contenido de sólidos totales, el cual debe ser superior a 10 %. Mientras que el contenido de sólidos totales de las tinturas de propóleo elaboradas en los CPL de Villa Clara, presenta un comportamiento variable e inferior al 10 % por lo que el estudio tuvo como objetivo evaluar los factores independientes en la tecnología de elaboración de la tintura de propóleo en los centros de producción local de Villa Clara.

Métodos

El procedimiento experimental se desarrolló 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.

Recolección y preparación de propóleos

Se emplearon dos variedades de propóleo (uno de tonalidad castaño rojizo y otro de tonalidad parda), ambos colectados en diferentes apiarios de la provincia de Villa Clara en los meses de febrero a marzo del 2021. Los propóleos contaron con el certificado de calidad emitido por el Ministerio de Agricultura de la provincia, lo que avaló su uso farmacéutico.

Elaboración de las tinturas según método de Pichansky modificado

Para la elaboración de las tinturas según el método de Pichansky modificado se pesaron 250 g de propóleo bruto en balanza técnica digital, el que fue homogenizado disminuyendo el tamaño de partícula de forma manual y se transfirió a un vaso de precipitado de 1000 mL, en el que se humectó con un volumen de 500 mL de mensturo hidroalcohólico. El propóleo fue macerado en el vaso de precipitado tapado durante un tiempo determinado y con agitación periódica (cada 2 h).

El extracto obtenido se coló con gasa y se almacenó en frascos de vidrio ámbar con tapa de bakelita a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

Se realizó un diseño de experimentos factorial 2^3 en el cual se tuvo en cuenta la posible incidencia en la calidad tecnológica de la tintura de factores independientes como concentración de etanol (70 y 96 %), tiempo de maceración (7 y 14 días) y variedad de propóleos (castaño-rojizo y pardo).

Como factores respuesta se consideraron el porcentaje de sólidos totales y el contenido de fenoles y flavonoides totales. Se obtuvieron un total de ocho formulaciones y sus réplicas, para su evaluación fisicoquímica (tabla 1).

Las tinturas fueron elaboradas al azar, para garantizar la aleatoriedad de los ensayos, según la matriz del diseño experimental.

Tabla 1 - Niveles empleados para cada factor independiente en el diseño factorial 2³

F	Contenido de etanol (%)	Tiempo de maceración (días)	Variedad de propóleos
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: F: Formulación; A: castaño-rojizo (color más intenso); B: pardo (color menos intenso).

Caracterización físicoquímica de las tinturas

Se cuantificó el porcentaje de sólidos según se establece en la norma ramal de Salud Pública # 312 y se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales. Se evaluaron otros parámetros de calidad como las características organolépticas, densidad relativa, índice de refracción y pH, de acuerdo con las exigencias de la norma ramal. Se realizaron tres réplicas en cada ensayo.

Determinación del contenido de fenoles totales

Se determinó el contenido total de compuestos fenólicos en las tinturas de propóleos desarrolladas mediante el empleo de la reacción de Folin-Ciocalteu (FCR), según el método de Pekal (2014) con modificaciones con el uso de ácido gálico como compuesto fenólico de referencia.

La cantidad de compuestos fenólicos se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración del ácido gálico, la cual se expresó como miligramos de contenido fenólico equivalentes a ácido gálico por gramo de extracto de propóleo seco (mg EAG/g EPS).⁽⁸⁾

Determinación del contenido total de flavonoides

El contenido total de flavonoides de las tinturas de propóleo se determinó empleando el reactivo cloruro de aluminio (AlCl_3), según el método propuesto por Messaoud⁽⁹⁾ con ligeras modificaciones utilizando la rutina como el compuesto flavonoide patrón. La cantidad de compuestos flavonoides se determinó en mg de flavonoides equivalentes a rutina por gramo de extracto de propóleo seco (ER mg/g ESP), utilizando la ecuación obtenida de la curva de calibración de rutina.

Análisis estadístico

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

Resultados

Caracterización físicoquímica de las tinturas

Cuantificación de sólidos, fenoles y flavonoides totales

Los resultados en la cuantificación de los sólidos, fenoles y flavonoides totales de las 8 formulaciones (F) permitieron apreciar que, a mayor concentración de etanol, mayor rendimiento de sólidos, fenoles y flavonoides totales en ambas variedades de propóleo (tabla 2).

Tabla 2- Resultados obtenidos de sólidos, fenoles y flavonoides totales para cada variante analizada.

F	CE (%)	TM (días)	Variedad propóleos	Sólidos totales (media \pm SD) %	Concentración fenoles totales (EAG mg/g ESP)	Concentración flavonoides totales (ER mg/g ESP)
1	96	14	A	24,10 \pm 0,169	287,83 \pm 0,723	90,83 \pm 0,057
2	96	7	A	23,02 \pm 0,113	278,87 \pm 0,080	89,40 \pm 0,103
3	70	14	A	12,84 \pm 0,142	202,83 \pm 0,472	59,40 \pm 0,100
4	70	7	A	8,51 \pm 0,009	198,76 \pm 0,057	54,83 \pm 0,049

5	96	14	B	10,12 ± 0,131	275,2±0,100	87,46±0,05
6	96	7	B	8,99 ± 0,586	263,55±0,180	74,33±0,15
7	70	14	B	7,78 ± 0,378	195,40±0,100	54,20±0,100
8	70	7	B	6,34 ± 0,902	193,13±0,152	52,74±0,056

Leyenda: CE: concentración de etanol. TM: tiempo de maceración

Determinación de otros parámetros de calidad

Otros parámetros de calidad medidos fueron los índices de calidad cuyos resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 - Índices de calidad de tinturas de la variedad A
(7 días de maceración en etanol al 96 % como disolvente).

Parámetros de calidad	Variedad de propóleos (A) (castaño-rojizo)
	(Media ±SD)
Características organolépticas	Líquido transparente, castaño-rojizo, olor característico
Índice refracción	1,403±0,001
Densidad relativa (g.cm ⁻³)	0,885±0,037
pH	4,637±0,007
Concentración de fenoles totales (EAG (mg)/g de ESP)	278,88±0,08
Concentración de flavonoides totales (ER (mg)/g de ESP)	89,4±0,1

Discusión

Los resultados se consideraron lógicos cuando a mayor concentración de etanol y mayor solubilización de los componentes presentes, estos resultaron coincidentes con los resultados de Cuesta⁽¹⁰⁾ y otros. El tiempo de maceración influyó de forma directa en el contenido de sólidos, fenoles y flavonoides totales, no obstante, se debe resaltar que a los 7 días el contenido de los sólidos totales fue superior al 10 % (límite permisible).

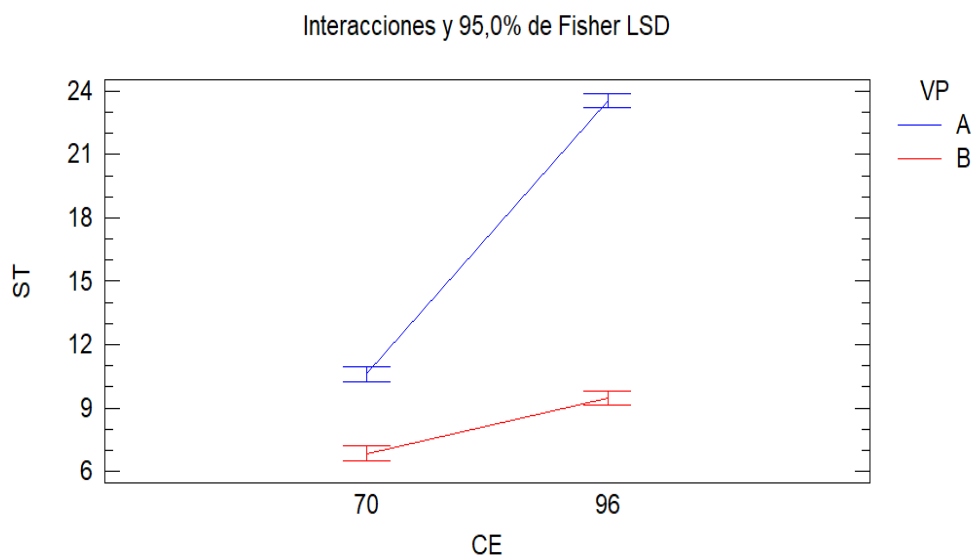
Los mayores valores de sólidos, fenoles y flavonoides totales se alcanzaron para la variedad A y confirma el planteamiento de *Troya*⁽⁵⁾ de que los propóleos de color castaño-rojizo poseen un mayor contenido de componentes activos e indican la elección de la condición que emplea etanol al 96 %, tiempo de maceración de 7 días y variedad de propóleo A (castaño rojizo) para la elaboración de la tintura de propóleo. Mientras que para los requisitos organolépticos, pH, índice de refracción y densidad relativa, estos son similares a lo reportado por *Leonor*⁽⁴⁾ para otras tinturas de origen natural.

Análisis estadístico de los resultados

El análisis de varianza del porcentaje de sólidos totales concluyó que todos los factores fueron altamente significativos [concentración de etanol ($p = 0,0001$), variedad de propóleo ($p = 0,0095$) y tiempo de maceración ($p = 0,0001$)]. Además, se apreció que solo la interacción entre el factor concentración de etanol y la variedad de propóleo resultó altamente significativa ($p = 0,0001$).

La influencia de los factores independientes en el contenido de los sólidos totales es mostrada en la figura 1 y 2.

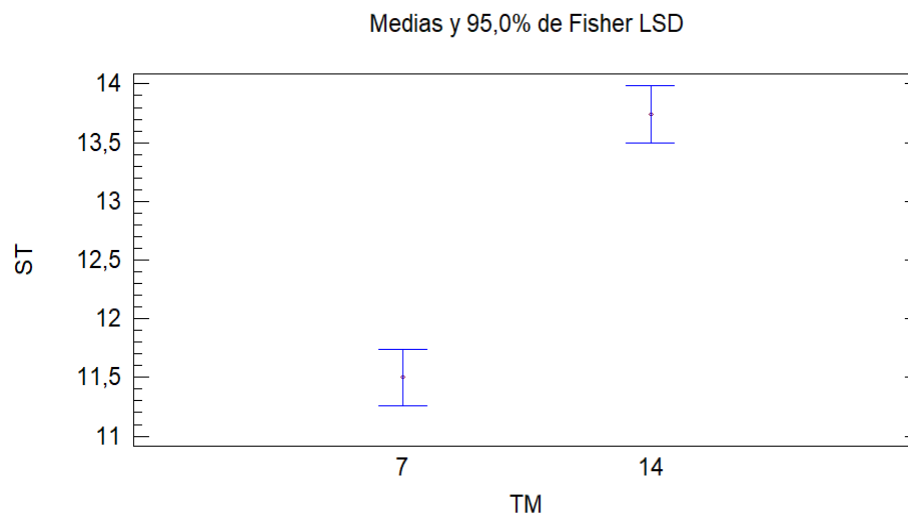
En la figura 1 se describe la interacción entre los factores concentración de etanol y variedad de propóleo y se puede observar que en ambos niveles de concentración de etanol existen diferencias significativas entre los porcentajes de sólidos totales entre las variedades A y B, en la que, A muestra en todos los casos, mayores rendimientos que la B.



Leyenda: CE: Concentración de etanol [CE 1: (70 %), CE 2: (96 %)]; VP: Variedad de propóleos [A: castaño-rojizo (color más intenso); B: pardo (color menos intenso)]; ST: Sólidos totales.

Fig. 1. Influencia de la concentración de etanol y variedad de propóleo en el contenido de los sólidos totales.

En el caso del tiempo de maceración se observó que a medida que aumentó este factor aumentaron significativamente los rendimientos de sólidos totales (fig. 2).



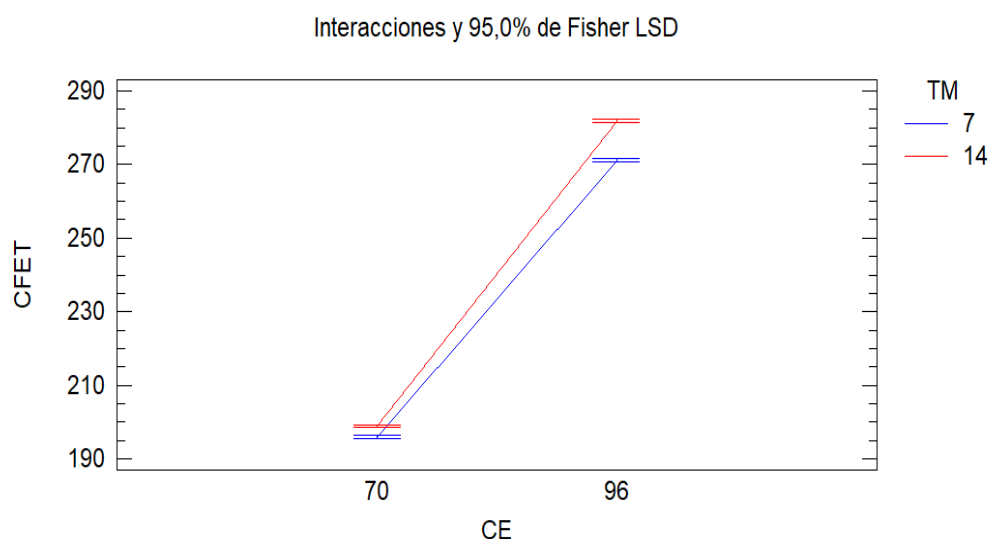
Leyenda: TM: Tiempo de maceración [TM1: (7 días); TM2: (14 días)]; ST: Sólidos totales.

Fig. 2. Influencia del tiempo de maceración en el contenido de los sólidos totales.

No obstante, es de destacar que a los 7 días de maceración en etanol al 96 % el rendimiento de los sólidos totales para la variedad A fue muy superior al 10 %.

El análisis de varianza mostró que en la concentración de fenoles totales solo influyeron de manera significativa aquellas interacciones que incluyeron el etanol como disolvente. ($p = 0,0001$). Lo anterior justifica la condición propuesta.

La figura 3 muestra la interacción entre el etanol y el tiempo de maceración, y como se puede apreciar cuando el etanol se utilizó a una concentración de 96 % las concentraciones de fenoles totales se incrementaron significativamente tanto a los 7 días como a los 14 días.



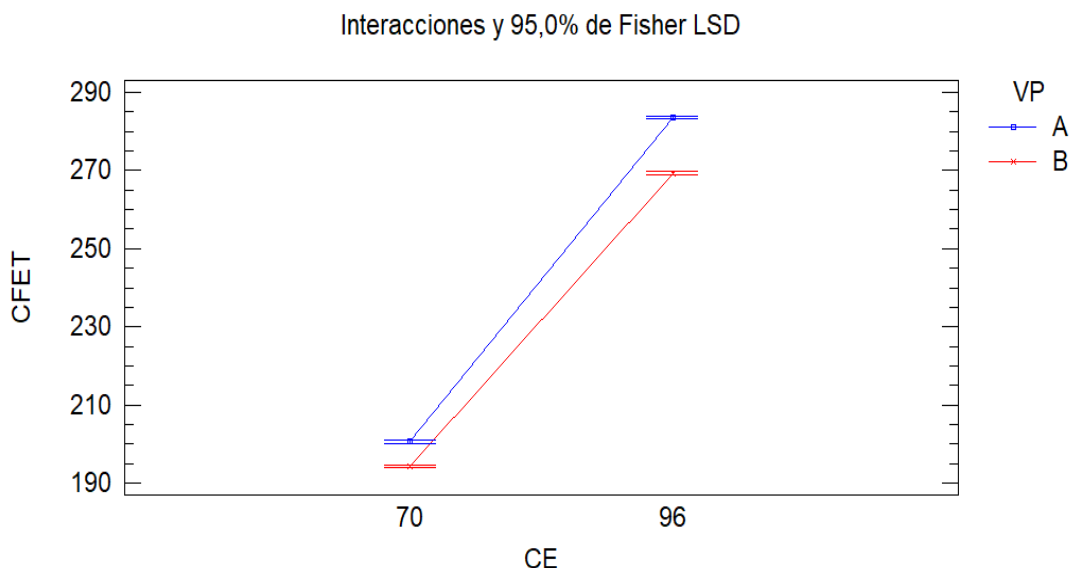
Leyenda: CE: Concentración de etanol [CE 1: (70 %), CE 2: (96 %)]; TM: Tiempo de maceración [TM 1: (7 días); TM 2: (14 días)]; CFET: Concentración de fenoles totales (EAG mg/g ESP)

Fig. - 3. Influencia de la interacción entre los factores etanol y tiempo de maceración en la concentración de fenoles.

Las mayores concentraciones de fenoles totales se obtuvieron al emplear etanol al 96 % y la variedad A de propóleos. La tintura obtenida a partir de la variedad de propóleos A (castaño-rojizo) a los 7 días de maceración en etanol al 96 % presentó el mayor contenido de sólidos, fenoles y flavonoides totales y

sus parámetros de calidad (índice de refracción, densidad relativa y pH) a partir de la condición propuesta, se consideran aceptables.

En la figura 4 se observa la interacción entre el etanol y la variedad de propóleos, y como se puede apreciar las concentraciones de fenoles totales de la variedad A son significativamente superiores a los de la variedad B.



Leyenda: CE: Concentración de etanol [CE 1: (70 %), CE 2: (96 %)]; VP: Variedad de propóleos [A: castaño-rojizo (color más intenso); B: pardo (color menos intenso)]; CFET: Concentración de fenoles totales (EAG mg/g ESP)

Fig. - 4. Influencia de la interacción entre los factores etanol y variedad de propóleos en la concentración de fenoles.

Estos resultados constituyen las premisas para el establecimiento futuro de los límites de especificación de calidad de la tintura de propóleo y permite concluir que la concentración del disolvente, variedad de propóleos y el tiempo de extracción utilizados influyeron de manera significativa en el contenido de sólidos, fenoles y flavonoides totales.

Referencias bibliográficas

1. Carrasco L, Cepeda N. Caracterización química y actividad antioxidante de tres muestras de propóleos ecuatorianos [trabajo de diploma]. [Ecuador, Machala]: Universidad Técnica de Machala; 2020. [acceso 06/07/2022] Disponible en: https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/16269/1/T-3902_CARRASCO%20MAXI%20LESLIE%20MALENI.pdf
2. Bankova V, Bertelli D, Borba R, Conti BJ, Da Silva IB, Danert C, *et al.* Standard methods for Apis mellifera propolis research. Journal of Apicultural Research. 2019;58(2):1-49. DOI: [10.1080/00218839.2016.1222661](https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661)
3. 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. DOI: [10.21577/0100-4042.20160136](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160136)
4. Leonor EM. Derivados del Propóleos En: Pública MdS Fd, editor. Formulario Nacional Fitofármacos y Apifármacos. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2017. [acceso 06/07/2022] 129-40. Disponible en: [Formulario nacional de fitofármacos y apifármacos. Segunda edición \(año 2017\)](#)
5. Troya A. Predicción de la actividad antitumoral del propóleo pardo cubano contra el melanoma [tesis en opción de Máster en Farmacología]. Cuba, La Habana: Universidad de La Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos; 2023. [acceso 06/07/2022] Disponible en: <https://accesoabierto.uh.cu/s/scriptorium/item/2151816>
6. Ministerio de Salud Pública. Medicamentos de origen vegetal. Extractos Fluidos y Tinturas. Norma Ramal de Salud Pública 312 (NRSP 312). La Habana, Cuba, 1991.
7. Mangas R, Gutiérrez, I, González A, Scull R, Delgado R, Monzote L, *et al.* Estudio químico y potencialidades biológicas de especies vegetales que crecen en Cuba. Anales de la academia de Ciencias de Cuba. 2021. [acceso 06/07/2022];11(1). Disponible en: https://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttex/pid=S2304-01062021000100011/ING=es/tlng=es

8. Matute C, Tello A. Determinación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos del extracto etanólico del rizoma de (*Smilax purhampuy* R.) [tesis opción del grado de Químico y Farmacéutico]. [Ecuador, Guayaquil]: Universidad de Guayaquil; 2020 DOI: [10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244](https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244)
9. Dailen G. Evaluación de diferentes extractos de propóleos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2022 [acceso 06/07/2022];53(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24502022000300243&lng=es&nrm=iso
10. 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. DOI: [10.1016/j.fitote.2017.06.016](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.06.016) [Get rights and content](#)

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Miguel Ángel Alba de Armas, Yanelis Saucedo Hernández.

Curación de datos: Osvaldo Norman Montenegro, María Elisa Jorge Rodríguez.

Análisis formal: Osvaldo Norman Montenegro.

Investigación: Miguel Ángel Alba de Armas, Yanelis Saucedo Hernández, Lietsy Sotolongo Moya, Melissa Lliliam Gómez Saucedo, Caridad de los Ángeles Calero Pérez.

Metodología: Miguel Ángel Alba de Armas, Yanelis Saucedo Hernández.

Supervisión: Miguel Ángel Alba de Armas, Yanelis Saucedo Hernández.

Redacción – borrador original: Miguel Ángel Alba de Armas, Yanelis Saucedo Hernández, Lietsy Sotolongo Moya.

Redacción – revisión y edición: Miguel Ángel Alba de Armas, Yanelis Saucedo Hernández, Lietsy Sotolongo Moya.