

Introducción a metodologías de extracción de compuestos bioactivos del propóleo

En el marco del proyecto “Generación de valor agregado de propóleos, en la cadena productiva Apícola Antioqueña”

Proyecto 1216-805-63102

Ejecutado por la Universidad CES y Universidad EAFIT

Con apoyo de Minciencias y Gobernación de Antioquia

2021

Introducción a metodologías de extracción de compuestos bioactivos del propóleo

Juan Camilo Barrientos Lezcano¹, Luz Deisy Marín Palacio¹, Santiago Builes¹

¹ Departamento de Ingeniería de Procesos. Universidad EAFIT

El propóleo, también conocido como pegamento de abeja, es un producto resinoso y pegajoso que es recolectado por las abejas de diversos exudados vegetales y llevado a la colmena, para ser usado en muchas operaciones como protección, defensa y pulido de las secciones del panal. (Miguel y Figueiredo, 2017; Ecem Bayram., et al, 2020). Esta sustancia puede tener color variable que va desde el color café, amarillo oscuro, naranja, marrón o incluso verde y un aroma intenso y muy distintivo. (Pobiega., et al, 2019). Es un producto químicamente complejo y el potencial del componente bioactivo varía según la flora vegetal, el tiempo de recolección, la raza de abejas en el área donde se recolecta (Ecem Bayram., et al, 2018) y, por lo tanto, con las condiciones geográficas y climáticas (Bankova., et al, 2014).

Está principalmente compuesto de 50% de resina, 30% de cera, 10% aceites esenciales, 5% de otros compuestos orgánicos, así como 5% de polen (Gómez-Caravaca., et al, 2006). Se han establecido más de 250 compuestos individuales como constituyentes del propóleo, que incluyen resinas, bálsamos y aldehídos fenólicos (polifenoles), ceras, ácidos grasos, aceites esenciales, polen, otros compuestos orgánicos y minerales. Se ha demostrado que los ácidos fenólicos, los ésteres y los flavonoides son responsables de la composición más importante del propóleo (Najafi., et al, 2007) y gracias a estas sustancias, el propóleo se caracteriza por una amplia gama de actividades biológicas como: efectos antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios, antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorios, entre otros (Pasupuleti., et al. 2017; Al-Ani., et al, 2018; Pobiega., et al, 2019).

El propóleo no puede consumirse directamente como material crudo. Debe extraerse con disolventes adecuados, para separar el material no deseado como la cera, y proteger los compuestos bioactivos. El método de extracción más común es la extracción por solventes usando solventes orgánicos. El etanol es el solvente más comúnmente usado, aunque existen otros solventes orgánicos que también se han explorado que incluyen propilenglicol, metanol, acetato de etilo, forma de cloro y n-hexano, agua y aceite de oliva (Fachri., et al, 2020). No solo el tipo de solvente influye en la eficiencia de la extracción, otros parámetros involucrados pueden ser la concentración de solvente, la temperatura, el tiempo de extracción y el tamaño de las partículas de propóleo (Sawaya., et al, 2011).

Los extractos de propóleo son preparados principalmente por maceración, método que requiere mucho tiempo (mínimo 3 días) de extracción (Sawaya., et al, 2011). Otro método que ha sido utilizado en la extracción de compuesto bioactivos es la extracción asistida por ultrasonido considerada un proceso de alta eficacia demostrada en la extracción de diferentes compuestos antioxidantes por el mayor rendimiento de recuperación en comparación con los métodos convencionales, es un método que ahorra tiempo y proporciona una buena selectividad de los compuestos objetivo (Oroian., et al, 2020). Adicionalmente, la extracción asistida por ultrasonido ayuda en la aceleración de varios pasos,

como la homogenización y la transferencia de masa entre fases inmiscibles en los procesos de separación y extracción (Asfaram., et al, 2017).

EXTRACCIÓN DEL PROPÓLEO

En las últimas décadas, la extracción con dióxido de carbono supercrítico (SCO₂) se ha utilizado para la extracción de aromas, fragancias y componentes activos de productos naturales (Capuzzo., et al, 2013). El dióxido de carbono es un solvente ideal para la extracción de materiales lipofílicos porque no es tóxico, no es explosivo, está fácilmente disponible y es fácil de eliminar del producto final, eliminando así el problema del solvente residual en los extractos. El SCO₂ del propóleo es atractivo debido a la naturaleza resinosa del producto (De Zordi., et al, 2014). Adicionalmente la extracción con fluido supercrítico presenta características deseables como alta flexibilidad al ajustar el poder del solvente y la selectividad del proceso; alta calidad del producto debido al bajo uso de solventes orgánicos contaminantes; y costos reducidos de la eliminación de solventes (Reverchon y De Marco, 2006).

A continuación, se presentan en detalle algunas de estas técnicas utilizadas en la extracción de compuestos a partir de materiales vegetales que se han utilizado en la obtención de extractos de propóleo.

Maceración.

Los principios y mecanismos generales implicados en la maceración para la extracción de compuesto son los mismos que para la extracción de constituyentes solubles de materiales sólidos utilizando disolvente, mediante un proceso denominado lixiviación. Los procesos de lixiviación pueden implicar una simple solución o disolución física. Los procedimientos de extracción se ven afectados por la velocidad de transporte del disolvente al material sólido, la velocidad de solubilización de los constituyentes solubles por el disolvente y la velocidad de transporte de la solución fuera del material insoluble. La extracción de compuesto se puede favorecer principalmente aumentando la superficie del material a extraer y disminuyendo las distancias radiales atravesadas entre los sólidos, lo cual se puede lograr mediante reducción del tamaño de partícula (Singh, 2008).

En el proceso de maceración el material vegetal (grueso o en polvo) se coloca en un recipiente tapado con el solvente a temperatura ambiente por un período mínimo de 3 días con agitación frecuente hasta que la materia soluble se haya disuelto. El procesado tiene como objetivo ablandar y romper la pared celular de la planta para liberar los fitoquímicos solubles. Después de 3 días, la mezcla se prensa y los líquidos combinados se clarifican por filtración o decantación después de reposar. La elección de los disolventes determinará el tipo de compuesto extraído de las muestras (Azwanida, 2015).

Extracción asistida por ultrasonido.

Los ultrasonidos son ondas sónicas que generan deformaciones mecánicas en un medio sólido, líquido o gaseoso. El ultrasonido se caracteriza por su rango de frecuencia (de 20 kHz a 10 MHz), que permite diferenciar dos tipos de ultrasonido: (1) ultrasonido diagnóstico con frecuencias entre 1 MHz a 10 MHz

e intensidad ultrasónica por debajo de 1 W cm^{-2} y (2) ultrasonido de potencia, con frecuencias entre 20 kHz y 1 MHz, e intensidad ultrasónica superior a 1 W cm^{-2} . El ultrasonido de potencia se utiliza en el rango de baja frecuencia. A medida que la onda de sonido se propaga en un medio elástico, induce un desplazamiento longitudinal de partículas, lo que resulta en una sucesión de fases de compresión y descompresión. Los efectos provocados por el ultrasonido en los medios de extracción se atribuyen a los fenómenos de cavitación (Rombaut., et al, 2014). El efecto mecánico de la cavitación acústica del ultrasonido aumenta el contacto superficial entre los disolventes y las muestras y la permeabilidad de las paredes celulares. Las propiedades físicas y químicas de los materiales sometidos a ultrasonidos se alteran y rompen la pared celular vegetal; facilitando la liberación de compuestos y mejorando el transporte masivo de los disolventes hacia las células vegetales. El procedimiento es una tecnología simple y de relativamente bajo costo que se puede utilizar tanto en pequeña como en gran escala de extracción fitoquímica (Azwanida, 2015).

Este método de extracción asistido por ultrasonido para la obtención de compuestos bioactivos del propóleo, utiliza etanol como medio de extracción para facilitar la rotura de las células de propóleo. En el proceso por ultrasonido, una solución que contiene el material vegetal (grueso o en polvo) y el etanol se coloca en el equipo de ultrasonido por un corto período de tiempo para lograr que el material soluble del propóleo se transfiera a la solución del etanol. Los parámetros que pueden afectar la eficiencia son: amplitud ultrasónica, concentración de etanol, temperatura y tiempo (Calavaro., et al. 2019). Sin embargo, los tiempos de extracción para la obtención de compuestos activos de propóleo para esta técnica no superan los 40 min de tiempo de extracción, encontrándose tiempos de 30 min (Oroian., et al. 2020) y 20 min (Calavaro., et al. 2019) como suficientes para la recuperación de compuestos activos.

Extracción con fluido supercrítico (SFE)

Se considera que un fluido está en su estado crítico cuando se calienta por encima de su temperatura crítica y se presuriza por encima de su presión crítica. La extracción mediante fluidos supercríticos es una extracción sólido-fluido y la especificidad de los fluidos supercríticos radica en sus propiedades físicas, que pueden ser moduladas por cambios en la presión o temperatura, por encima de sus valores críticos. Los fluidos supercríticos tienen una densidad cercana a los líquidos, lo que induce un poder de solvatación cercano a los líquidos. La viscosidad, cercana a los gases y una difusividad intermedia entre líquidos y gases, conduce a un aumento de la velocidad de extracción al aumentar la tasa de transferencia de masa. Estas propiedades permiten ajustar la selectividad del disolvente de un fluido supercrítico hacia un compuesto objetivo, lo que es particularmente interesante en el caso de la extracción (Rombaut., et al, 2014).

El CO_2 supercrítico es el fluido más utilizado en SFE, debido a su bajo costo, estabilidad química, abundancia y su volatilidad a condiciones atmosféricas. La implementación del proceso se facilita debido a las relativamente bajas condiciones críticas del CO_2 ($31 \text{ }^\circ\text{C}$ y 7.38 MPa). Su volatilidad a presión atmosférica implica que después de la despresurización los extractos están libres de solventes. Como el CO_2 es un solvente no polar, para mejorar la extracción de sustancias polares, se puede mezclar con una pequeña cantidad de un modificador polar (por ejemplo, etanol, metanol) a las condiciones de temperatura y presión de la extracción (Rombaut., et al, 2014).

Las principales ventajas del proceso de extracción por CO₂ supercrítico son (Singh, 2008): (1) la extracción de componentes se hace a bajas temperatura, lo que evita daño por calor de los compuestos activos; (2) el extracto queda sin residuos de solventes; y (3) es un procedimiento de extracción respetuoso con el medio ambiente.

CARACTERIZACIÓN DEL PROPÓLEO

Para la separación y cuantificación de los compuestos químicos de los extractos de propóleos obtenidos por diferentes metodologías de extracción se pueden utilizar diferentes técnicas analíticas entre las que se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC), técnicas que proporcionan resultados válidos pero puede ser complejas de implementar, porque requieren de equipos y personal especializado, por lo cual no son apropiadas para procedimientos de rutina ni para hacer seguimiento a los procesos de extracción (Popova., et al. 2004). Para procedimientos frecuentes se utilizan métodos espectrofotométricos o colorimétricos que son relativamente rápidos y simples de emplear. Estos métodos están enfocados principalmente a la determinación de flavonoides totales y fenoles totales (Hernández., et al. 2018, Popova., et al. 2004), que son las sustancias del propóleo que se caracterizan por una amplia gama de actividades biológicas. Cada procedimiento utiliza componentes específicos como compuestos de referencia para construir las respectivas gráficas de calibración. Por ejemplo, el contenido total de flavonoides se puede medir usando un ensayo espectrofotométrico basado en la formación del complejo de cloruro de aluminio. Las soluciones metanólicas de quercetina se utilizan como referencias para obtener un gráfico de calibración (Bag., et al. 2015) y para la determinación del contenido de fenoles totales se puede utilizar el método de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como referencia.

Referencias

- Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. (2018). Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines*. 5(2): 17 pages. <https://doi.org/10.3390/medicines5010002>
- Asfaram A., Ghaedi M, Purkait M.K. (2017). Novel synthesis of nanocomposite for the extraction of sildenafil citrate (Viagra) from water and urine samples: process screening and optimization. *Ultrason. Sonochem.* 38, 463–472, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.045>
- Azwanida NN (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants* 4: 196. doi:10.4172/2167-0412.1000196
- Bag G. C., Devi P. G., and Bhaigyabati T. (2015). Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three hedychium species of manipur valley. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 30 (28): 154–159
- Bankova V, Popova M. & Trusheva B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*. 8, 28 <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-28>
- Cavalaro R I, Gonçalves da Cruz R, Dupont S, Juliana Leite M, Ferreira de Souza T Maria. (2019). In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food Chemistry: X* 4 100054: 8 pages. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100054>.
- Ecem Bayram N, Sorkun K, Öz G.C, Salih B, Topçu G. (2018). Chemical characterization of 64 propolis samples from Hakkari, Turkey. *Rec. Nat. Prod.* 12(6), 569 <http://doi.org/10.25135/rnp.78.16.12.585>
- Capuzzo A., Maffei M.E., Occhipinti A. (2013). Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. *Molecules*. 18(6): 7194-7238. <https://doi.org/10.3390/molecules18067194>
- De Zordi, N, Cortesi A, Kikic I, Moneghini M, Solinas D, Innocenti G, Portolan A, Baratto G, Dall'Acqua S. (2014). The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from Propolis: A central composite design approach. *The Journal of Supercritical Fluids*. 95: 491-498. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.10.006>
- Ecem Bayram N., Gerçek Y.C., Bayram S. et al. (2020). Effects of processing methods and extraction solvents on the chemical content and bioactive properties of propolis. *Food Measure* 14: 905–916 <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00340-z>
- Fachri B. A, Sari P, Yuwanti S, Subroto E. (2020.) Experimental study and modeling on supercritical CO2 extraction of Indonesian raw propolis using response surface method: Influence of pressure, temperature and CO2 mass flowrate on extraction yield. *Chemical Engineering Research and Design*. 153: 452-462 <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.11.014>
- Gomez-Caravaca A. M, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, & Fernandez-Gutierrez A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4),1220–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.002>
- Hernández, M S, Abraham, M, Cerón, A, Ozuna C, Gutiérrez, A J, Segoviano, J Nezahualcóyotl, & Avila, F . (2018). Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Science and Technology*. 38(2): 210-215. <https://doi.org/10.1590/fst.29916>
- Miguel M.G, Figueiredo A.C. (2017) Propolis and Geopropolis Volatiles. In: Alvarez-Suarez J. (eds) Bee Products - Chemical and Biological Properties. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_6
- Najafi M.F, Vahedy F, Seyyedini M, Jomehzadeh H.R & Bozary K. (2007). Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology*. 54: 49–56 <https://doi.org/10.1007/s10616-007-9067-2>
- Oroian M, Dranca F. & Ursachi, F. (2020). Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *J Food Sci Technol*. 57: 70–78. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04031-x>

Oroian M, Ursachi F, Dranca F. (2020). Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. *Ultrasonics - Sonochemistry* 64. 105021: 10 pages. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105021>.

Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017: 21 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>

Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D. et al. (2019). Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *J Food Sci Technol* 56: 5386–5395 <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04009-9>

Popova M, Bankova V, Butovska D, Petkov V, Nikolova.Damyanova B, Sabatini A G S,2 Marcazzan G L, Bogdanov S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal.* 15: 235–240. <https://doi.org/10.1002/pca.777>

Reverchon E, De Marco I, (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *The Journal of Supercritical Fluids*. 38 (2): 146-166. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>

Rombaut N, Tixier A-S, Bily A, Chemat F. (2014). Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 8(4): 530-544. <https://doi.org/10.1002/bbb.1486>

Sawaya, A.C.H.F, Barbosa da Silva Cunha, I. & Marcucci, M.C. (2011). Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal* 5 (27): 10 pages. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-27>

Singh J. (2008). Maceration, Percolation and Infusion Techniques for the Extraction of Medicinal and Aromatic Plants. En Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants.* (67-82). Italy: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology.