

## ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL EXTRACTO BIOACTIVO DE POLEN

**Autores:** Gisela Valdés González, Dámarys Suárez Gómez, Rosalina García, Leyanis Sánchez, Teresa Giral Rivera

Centro de Investigaciones Apícolas

### RESUMEN.

Una de las posibilidades de incorporar el polen a una gama de productos es con la utilización de Extracto Bioactivo de Polen (EBIOP).y este trabajo se realizó con el objetivo de conocer el comportamiento del EBIOP en las condiciones de obtención fijadas, la eficiencia o rendimiento y la temperatura de conservación no definidas en trabajos anteriores, determinar la calidad microbiológica, parámetros físico-químicos y organoléptica, así como la vida útil del mismo.

Obteniéndose como resultado que al cabo de los 7 días de maceración los extractos con y sin agitación aportaron un contenido de sólidos solubles prácticamente iguales, que la primera filtración bajo las condiciones establecidas no resultó eficiente fue necesario una segunda filtración por gravedad donde se obtuvo un rendimiento promedio de un 55 % del extracto (EBIOP) para una merma del un 45 %.

No hubo agotamiento total de los componentes del polen en la primera maceración y la segunda extracción aportó un extracto con un contenido de sólidos solubles entre 6 y 9%.

El EBIOP no presentó efecto antibacteriano frente a las cepas empleadas, en el estudio de forma acelerada a 37 °C por 7 días presentó óptima la calidad microbiológica y organoléptica mientras que los conservados a temperatura ambiente en el tiempo presentaron una vida útil solo hasta los 6 meses de elaborado.

El proceso de enfriamiento a -20 °C durante 5 días no afectó el color, aspecto y olor y su conservación a – 20 °C proporciona una vida útil de 2 años.

### INTRODUCCIÓN

Muchos trabajos han sido dedicados a investigar las propiedades nutricionales y curativas del polen apícola que corroboran la acción eficaz de su consumo por el hombre, lo que permite justificar los esfuerzos encaminados para su explotación pero con la dificultad de que el producto obtenido contiene un alto contenido de humedad y una elevada carga microbiana que lo invalida para su consumo en su forma natural.

El exceso de humedad provoca durante su almacenamiento la descomposición del polen y el desarrollo de hongos, bacterias, ácaros, etc, indeseables. Esto ha motivado la realización de estudios dedicados a obtener un polen más seco y libre de impurezas. (Valdés y col, 1991 a y b).

Los trabajos iniciales para dar solución a la utilización del polen para el consumo

humano fue dado por Pérez y col, 1990 con la obtención de un producto a partir del polen apícola llamado Pan de Abejas Industrial (PAI, polen acidificado) que permitió obtener un producto con calidad microbiológica aceptables para ser empleado (Valdés y colb, 1993), pasando en ese entonces a ser utilizado como un ingrediente de las mezclas apícolas (Apiasmin, Propoforte y Pan miel).

Posteriormente del Risco y col. (2012), con el objetivo de controlar la fermentación de los silos y obtener mayor reproducibilidad de las características del producto final, identifican y seleccionan las bacterias ácido lácticas presentes en el pan de abejas y con los aislados más promisorios optimizan la fermentación del polen apícola a escala de laboratorio. Estos investigadores logran también obtener un producto con calidad microbiológica aceptable y además, con menor porcentaje de humedad.

Como parte del interés de ampliar la utilización del polen en otras formas fue determinado obtener sus componentes de un extracto fluido para cremas de belleza (APIQUEN) con la calidad sanitaria requerida para su empleo y es precisamente el objetivo de este trabajo determinar y evaluar el proceso de maceración del polen apícola, características microbiológicas, organolépticas y físico químicas, así como condiciones de almacenamiento y vida útil del Extracto Bioactivo de Polen (EBIOP).

## MATERIALES Y METODOS

El polen apícola empleado fue obtenido de trampas de polen OAC modificado (trampas en posición inferior) húmedo y sin beneficiar que se mantuvieron en congelación (-20°C)

Para la elaboración del EBIOP se tomaron 20 kg de polen y 40 litros de alcohol etílico clase A al 70 %, que fueron distribuidos en 4 tanquetas plásticas a razón de 5 kg de polen con 10 litros de alcohol etílico al 70 % para una relación de 1:2, que fueron homogenizadas manualmente para obtener el mayor rompimiento o mezclado posible, 2 tanquetas fueron sometidas a una agitación manual 2 veces al día, mientras que las 2 restantes se mantuvieron sin agitación durante todo el proceso de maceración que se estableció de 7 días.

Finalizado este tiempo de maceración establecido se procedió a homogenizar manualmente y filtrar con bomba de vacío empleando embudo busner colocando sobre el embudo papel de filtro de filtración rápida y encima una malla de nylon de diámetro 0.1 mm, cambiando el papel de filtro y eliminando el residuo acumulado en la malla por raspado cuando se obstruía o disminuía la filtración. (Primera filtración)

El filtrado obtenido mantuvo una determinada turbidez y se procedió a realizar una segunda filtración con empleo de la bomba de vacío que a pesar de emplear más de un papel de filtro, el filtrado obtenido no se mostraba transparente por lo que se procedió a filtrar por gravedad a través de papel de filtro de filtración rápida y de esta forma finalmente fue lograda la transparencia deseada.

Se procedió a determinar la eficiencia de la extracción (EBIOP I) midiendo el volumen del filtrado obtenido y además el agotamiento de la materia prima realizando una

segunda maceración a razón de 1:2, para ello se pesaron 250 g del residuo de polen (de cada una independiente) y se añadió 500 ml de alcohol etílico al 70 % en frascos ámbar y se sometieron a agitación por 6 horas, posteriormente fueron filtrados (EBIOP II) por gravedad con papel de filtro de filtración rápida. Para ambas extracciones fue realizada la determinación del % de Sólidos solubles totales (PNO 0-105-023).

Para los estudios que se describen a continuación se conformo una mezcla de los 4 extractos (pull) que fue distribuido en la cantidad de muestras a estudiar. .

El comportamiento o afectación del enfriamiento a -20 °C fue realizado distribuyendo el pull en 10 frascos de cristal que se colocaron bajo esas condiciones durante 5 días al cabo de las cuales se les realizó la observación de la apariencia (opalescencia o transparencia y color).

La determinación del límite microbiano fue realizada primeramente la prueba preliminar para descartar la presencia de acción inhibitoria del crecimiento. (2 réplicas) frente a *Salmonella typhi* ATCC 725, *Escherichia coli* ATCC 259221, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (USP 25, 2002, USP 29, 2006 y USP 32, 2009).

Fueron sometidas 3 replicas del pull para determinar de forma acelerada la existencia de un deterioro colocando las muestras de tiempo 0 a una incubación a 37 °C por 7 días y determinándoles los parámetros de determinación del Limite microbiano (Número más probable de microorganismo aerobios mesófilos viables. (NMP m.o/mL), Conteo de hongos filamentos (ufc/g), Conteo de levaduras viables (ufc/g), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* en 0.1 g y *Salmonella sp* en 25 g. (USP 25, 2002).y además características organolépticas (aspecto, olor y sabor)

Para el estudio de caracterización y estabilidad fue empleado el pull y las muestras fueron envasadas en frascos ámbar estériles de 120 ml, colocadas a temperatura ambiente y en la oscuridad las que fueron retiradas de esas condiciones en los tiempos previstos (tiempo 0, 1 mes, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses) y otras fueron conservadas en congelación y analizadas al cabo de 1, 1.5 y 2 años.

Los aspectos estudiados fueron en organolépticos: olor, sabor y aspecto, como parámetros físicos- químicos: % de sólidos solubles, pH y acidez (NC ISO 750, 1998 y NC ISO 1842: 1991) y la calidad microbiológica Número más probable de microorganismo aerobios mesófilos viables, Conteo de hongos filamentos, Conteo de levaduras viables, determinación de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp* (USP 25, 2002).

A los resultados del volumen obtenido de la primera maceración, el % de recuperación y el contenido de sólidos solubles (%) de cada una de las condiciones (agitación o estático) fue realizado u test T-students aplicando el Statgraphics Plus y con transformación de 1/x (para % de recuperación y el contenido de Sólidos solubles totales)

## RESULTADOS Y DISCUSION

En los resultados del volumen obtenido de los filtrados de la primera maceración (EBIOP I) no hubo diferencias significativas para un nivel de confianza del 95% en cuanto al volumen, en ambos casos tanto agitación como estático a los 7 días se recuperó entre 5.2 y 5.89 litros que representan una recuperación del 52 al 58.9. Bajo las condiciones en que se desarrollo esta maceración el % de recuperación o eficiencia fue con un del 55.25% (Ver la tabla No. 1).

En cuanto al contenido de sólidos solubles correspondiente a estas misma condiciones de maceración los valores estuvieron entre el 19.69 y 23.9 %, donde estos dos valores límites correspondieron precisamente a los extractos en agitación, esto pudiera deberse a que el proceso de homogenización del polen para conformar el trabajo no quedó lo suficientemente mezclado y en estos casos el polen empleado estuvo algo diferente uno del otro, no obstante se obtuvo como promedio numérico de estos 4 extractos un valor de 22.15 % pero del pull conformado de mezclar los mismos el valor real fue del 21.71, no obstante no se encontró diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%.

Los resultados de la determinación del agotamiento de la materia prima (residuo) con la elaboración del una segunda maceración dio como resultado (ver tabla 2) que el EBIOP II obtenido presentó un contenido de sólidos solubles de 6.13 y 7.23 % para los que procedían de las condiciones de agitación mientras que para los estáticos de 6.85 y 9.14%, no encontrándose diferencias significativas entre las medias para un nivel de confianza del 95%.

Por otro lado fue evidente que no ocurrió una extracción total de los componentes en la primera maceración quedando incluso cantidad suficiente de sólidos solubles como para ser utilizado este extracto en la elaboración de productos (Cremas APIQUEN) que llevan en su formulación la presencia de EBIOP a concentraciones inferiores a las encontradas.

Con respecto a la influencia del proceso de enfriamiento a -20 °C en que se mantuvo el estudio (5 días) en cuanto su apariencia se mantuvo su estado liquido pero si con la presencia de una opalescencia, que al atemperarse recobró su estado original de líquido viscoso transparente de coloración amarilla por lo que se considero que estas condiciones de almacenamiento en primera instancia no afectaban la transparencia y color del producto.

En la determinación de la prueba preliminar para descartar la presencia de acción inhibitoria del crecimiento se obtuvo como resultado que no presentó efecto inhibitor del crecimiento por lo tanto esto permitió por un lado afirmar que este EBIOP I no presenta este efecto antibacteriano frente a ninguno de los microorganismos empleados y por otro lado pasar directamente a efectuar la determinación del Limite microbiano sin la utilización de aumentar la dilución de trabajo o el empleo de inactivadores de esta acción

Del estudio para determinar de forma acelerada la existencia de un deterioro de las muestras de tiempo 0 incubadas a 37 °C por 7 días (ver tabla No. 3) se encontró que los valores de los parámetros de determinación del NMP (m.o/mL), Conteo de hongos filamentosos (ufc/g) y Conteo de levaduras viables (ufc/g) estuvieron por debajo de lo permisible y tampoco hubo presencia de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella* sp, es decir las condiciones establecidas para determinar posible deterioro aportaron un producto que mantuvo calidad microbiológica con valores o límites permisibles de aceptación para su consumo según NC 585:2008. Por otro lado las características organolépticas se corresponden a lo deseado y esperado de este producto.

Se encontró que los resultados del estudio de límite microbiano, calidad microbiológica y/o la estabilidad sanitaria del EBIOP I (pull) en el tiempo conservados a temperatura ambiente (ver tabla 4) estuvieron dentro de los límites permisibles de aceptación para el consumo o utilización del producto como ingrediente de formulaciones alimenticias (según NC 585:2008) durante los 12 meses que fueron estudiadas, sin embargo en cuanto a sus parámetros organolépticos específicamente en el Aspecto, los tiempos de 1, 3 y 6 meses presentaron una suspensión de coloración amarilla no detectada en el tiempo 0 y a los 9 meses paso a ser más intensa, algo parda que continuo intensificándose y ya es evidente a los 12 meses, por lo que se considero que el producto desde el punto de vista organoléptico conservado a temperatura ambiente comienzan a ocurrir cambios en el 1 mes y ya a los 9 meses esta deteriorado.

Se decidió no continuar realizando el estudio de estabilidad al EBIOP conservado a temperatura ambiente hasta los 2 años como estaba previsto por los cambios organolépticos, específicamente en el aspecto con la presencia de una coloración parda detectada en el estudio correspondiente al 9 mes de elaborado

Los resultados del estudio de estabilidad del EBIOP I conservados a – 20 °C durante 1, 1.5 y 2 años (ver Tabla No. 5) se encontró que la calidad microbiológica tuvo un comportamiento estable en el tiempo y con valores por debajo de aceptación para su utilización según NC 585:2008. De igual forma los parámetros organolépticos tuvieron y se mantuvieron dentro de las características originales del extracto, no presenciando alteración alguna de los mismos.

Con respecto a los parámetros físico-químicos, el contenido de sólidos solubles tuvo un decremento en el tiempo, esto pudiera deberse a que ocurrió incorporación de humedad provocada por la no hermeticidad del envase empleado, aspecto que quedaría por dilucidar en estudios posteriores, no obstante es importante el resultado obtenido ya que este aspecto solo afectaría la cantidad de EBIOP I a utilizar en la formulación en que se va a emplear y en el caso de la acidez hubo un ligero incremento, mientras que el pH puede decirse que se mantuvo estable.

Por el análisis de los resultados obtenidos el EBIOP I conservados a – 20 °C mantuvo estabilidad en el tiempo, pudiéndose considerarse que tiene una vida de anaquel de 2 años bajo estas condiciones de almacenamiento.



## CONCLUSIONES.

1. Con 7 días de maceración los extractos con y sin agitación aportaron un contenido de sólidos solubles prácticamente iguales.
2. La primera filtración, bajo las condiciones descritas no resultó eficiente.
3. Para obtener un líquido transparente es necesario someterlo a una segunda filtración por gravedad a través de papel de filtro.
4. Se obtiene una media de un 55 % de EBIOP con una merma del 45 %.
5. En la primera maceración no hubo agotamiento total de los componentes del polen
6. Una segunda maceración aporta un extracto con cantidad suficiente de sólidos solubles (EBIOP II) como para ser utilizado en la elaboración de productos cuya formulación requiera un % de estos componentes entre 6 y 9%.
7. El proceso de enfriamiento a -20 °C durante 5 días no afectó el color, aspecto y olor.
8. El EBIOP I no presentó efecto antibacteriano frente a las cepas empleadas.
9. El EBIOP I en el estudio de forma acelerada a 37 °C por 7 días presentó óptima la calidad microbiológica y organoléptica.
10. El estudio de estabilidad de EBIOP I conservados a temperatura ambiente presentó una vida útil hasta los 6 meses de elaborado.
11. El EBIOP I conservados a - 20 °C presentó una vida útil de 2 años.

## BIBLIOGRAFÍA

- Del Risco Ríos CA, Pérez Piñeiro A, Álvarez Rivera VP, Rodríguez Castro G, Leyva Castillo V, Puig Peña Y, García Neninger R. Bacterias ácido lácticas para ensilar polen apícola. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2012; 43(1): 17 – 21.
- Norma Cubana. ISO 750: Productos de Frutas y Vegetales. Determinación de la Acidez Valorable. 1. Edición. Diciembre 2001 (ISO 750: 1998, IDT).
- Norma Cubana. ISO 1842: 2001. Productos de Frutas y Vegetales. Determinación de pH. 1. Edición. Diciembre 2001 (ISO 1842: 1991, IDT)
- Norma Cubana 585:2008. Contaminantes microbiológicos en alimentos – Requisitos Sanitarios.
- USP 25-NF 20 Supplement 2, 2002. Microbial limit tests—nutritional supplements.
- USP 29-NF24 No de registro 34455. <61> Pruebas de Límite Microbiano.
- USP 32-NF 27, 2009. <61> Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests
- Pérez, A.; G, Valdés; M, Ruíz y M, Martín. Procedimiento para la elaboración de pan de abejas o polen fermentado acidificado. Solicitud de patente 1990.
- PNO 0-105-023. Determinación de la concentración de Sólidos Solubles Totales
- Valdés, G; O, García; M, Martín; T, Giral. Evaluación de las condiciones higiénicas del polen. I Taller Internacional sobre Apiterapéuticos. II Simposio de Apiterapia. III Simposio sobre propóleos. La Habana, Cuba, 1991a.
- Valdés, G; M, Martín; O, García; M. Ruiz y T, Giral. Evaluación de la calidad sanitaria de diferentes modelos de trampas de polen. I Taller Internacional sobre Apiterapéuticos. II Simposio de Apiterapia. III Simposio sobre propóleos..La Habana, Cuba, 1991b.
- Valdés, G, Valera, L, Martín, M y Ruíz, M.3. Evaluación de la calidad microbiológica del polen apícola y el polen acidificado XXXIII Congreso Internacional de Apimondia. Bélgica. 1993.

Tabla No. 1. Resultados obtenidos del volumen del extracto, % de recuperación y concentración de sólidos solubles.

Tanqueta	Sistema de extracción	Cantidad de extracto obtenido (litros)	Recuperación %	Sólidos solubles (%)
1	Agitación	5.89	58.9	19.69
2	Agitación	5.2	52.0	23.9
3	No agitación	5.2	52.0	22.54
4	No agitación	5.8	58.0	22.5
Pull	Mezcla de las 4 tanquetas	Por sumatoria 22.09 litros	55.2	21.71 (real)

Tabla No. 2. Resultados obtenidos de los Sólidos Solubles Totales de la segunda maceración (EBIOP II).

Sistema de Extracción	Muestra	Sólidos solubles totales (%)
Agitación	1	6.13
	2	7.23
No Agitación	3	6.85
	4	9.14

Tabla No. 3. Resultados del estudio acelerado del deterioro del EBIOP I

Límite microbiano		Muestras		
		1	2	3
Número más probable de microorganismo aerobios mesófilos viables. (m.o/mL).		4 x 10	< 2.3	4 x 10
Conteo de hongos filamentos (ufc/g)		0.5 x 10	< 10	< 10
Conteo de levaduras viables (ufc/g)		2 x 10	2 x 10	< 10
Determinación de Staphylococcus aureus en 0.1 g		Ausencia	Ausencia	Ausencia
Determinación de Pseudomonas aeruginosa en 0.1 g		Ausencia	Ausencia	Ausencia
Determinación de Escherichia coli en 0.1 g		Ausencia	Ausencia	Ausencia
Determinación de Salmonella sp en 25 g		Ausencia	Ausencia	Ausencia
Organolépticos (3 réplicas)				
Aspecto	Líquido algo viscoso y transparente de coloración amarilla.			
Olor	Alcohólico y algo floral			
Sabor	Alcohólico			



Tabla No. 4. Resultados obtenidos del estudio de estabilidad de EBIOP I conservados a temperatura ambiente.

Limite Microbiano	Tiempo (meses)					
	0	1	3	6	9	12
NMP (m.o/ml).	< 2.3	$1.5 \times 10^{-2}$	< 2.3	< 2.3	46.5	<10
Conteo de hongos filamentosos (ufc/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Conteo de levaduras viables (ufc/g)	<10	<100	<10	<10	<10	<10
Determinación de Staphylococcus aureus en 0.1 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Determinación de Ps. aeruginosa en 0.1 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Determinación de Escherichia coli en 0.1 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Determinación de Salmonella sp en 25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Organoléptico	Tiempo (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Aspecto	Líquido algo viscoso y transparente de coloración amarilla.	Líquido algo viscoso, presencia de suspensión de coloración amarilla.	Líquido algo viscoso, presencia de suspensión de coloración amarilla	Líquido algo viscoso, presencia de suspensión de coloración amarilla	Líquido algo viscoso, presencia de suspensión de coloración casi parda.	Líquido algo viscoso, presencia de suspensión de coloración pardo-oscuro

Olor	Alcohólico y algo floral	Alcohólico y algo floral	Alcohólico y algo floral	Alcohólico y algo floral	Alcohólico y algo floral	Alcohólico y algo floral
Sabor	Alcohólico	Alcohólico	Alcohólico	Alcohólico	Alcohólico	Alcohólico
Parámetros Físico-Químicos	Tiempo (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Sólidos Solubles Totales (%)	21.71	NR	24.6545	21.94	17.53	9,55
Acidez	NR	NR	5.0	5.5	5,5	5,8
pH	NR	NR	4.3	4.3	4,0	4,1

Leyenda: NR: No realizado

Tabla No. 5. Resultados obtenidos del estudio de estabilidad del EBIOP I conservados a – 20 °C.

Limite Microbiano	Tiempo (años)		
	1	1.5	2
NMP (m.o/ml).	< 2,3 x 10	23 x 10	2 x 10 <sup>2</sup>
Conteo de hongos filamentos (ufc/g)	<10	1 x 10 <sup>2</sup>	< 10
Conteo de levaduras viables (ufc/g)	<10	< 10	< 10
Determinación de Staphylococcus aureus en 0.1 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Determinación de Pseudomonas aeruginosa en 0.1 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Determinación de Escherichia coli en 0.1 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Determinación de Salmonella sp en 25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Parámetros Organolépticos	Tiempo (años)		
	1	1.5	2

Aspecto	Líquido viscoso, presencia de suspensión de coloración amarilla.	Líquido viscoso, presencia de suspensión de coloración amarilla.	Líquido viscoso, presencia de suspensión de coloración amarilla.
Olor	Alcohólico y algo floral	Alcohólico y algo floral	Alcohólico y algo floral
Sabor	Alcohólico	Alcohólico	Alcohólico
Parámetros Físico-Químicos	Tiempo (años)		
	1	1.5	2
Sólidos Solubles Totales (%)	21.235	20.691	19.027
Acidez	4.4	4.7	5.2
pH	4.44	4.54	4.6