

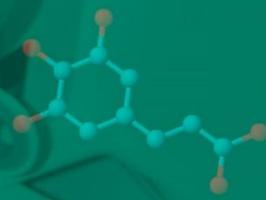
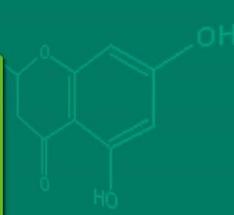
Propóleos

caracterización y normalización
de propóleos argentinos

revisión y actualización de
composición y propiedades



Enrique Bedascarrasbure
Luis Maldonado
Walter Fierro Morales
Alejandro Alvarez



INTA
Instituto Nacional
de Tecnología Agropecuaria

Agencia Nacional
de Promoción Científica y Tecnológica



Enrique L. Bedascarrasbure
Apicultor desde los 6 años,
Prof. Titular de la FCV-UNCPBA,
Técnico de INTA EEA Famaillá,
responsable de la elaboración
y coordinador del PROAPI.
Ha aprendido de las abejas
a favorecer las sinapsis
que promueven
la conformación de redes
y equipos de trabajo.



Walter Fierro Morales
Médico desde 1984,
apicultor desde 1981.
Investigador en productos
de la colmena y apiterapia.
Presidente de la Sociedad
Apícola Uruguaya.
Docente Facultad de Química.
Asesor Ministerio Salud Pública
del Uruguay y del PROAPI.
Consultor internacional,
dictando conferencias en 4
continentes.



Luis M. Maldonado
Ingeniero Químico desde 1987.
Investigador del INTA
EEA Famaillá
en el área de Agroindustrias,
integrante del equipo
técnico del PROAPI,
como responsable
de caracterización y
desarrollo de productos.



Alejandro R. Álvarez
Ingeniero Químico (1991),
especialista en Aseguramiento
de la Calidad (1999).
Investigador de INTA,
integrante del equipo técnico
del PROAPI y docente
de Química Analítica Instrumental
Facultad de Ciencias Exactas
y Tecnología de la
Universidad Nacional de Tucumán

Ilustraciones de la tapa

Apiario en Río Turbio – Santa Cruz

Partes aéreas de *Zuccagnia punctata* – Amaicha del Valle – Tucumán

Abeja en flor de anís – Cafayate – Salta

Grupo de pequeños apicultores – Cachi – Salta

Apiario de la Coop. “Flor de Garabato” – El Galpón – Salta

Todas las imágenes pertenecen al Banco de imágenes de PROAPI – INTA EEA Famaillá y no pueden ser reproducidas sin autorización.

Datos de los autores:

Enrique Bedascarrasbure, bedascarrasbure.e@inta.gob.ar

Luis Maldonado, maldonado.luismaria@inta.gob.ar

Walter Fierro Morales, wfierro@mednet.org.uy

Alejandro Alvarez, alvarez.alejandro@inta.gob.ar

Julio de 2006

Queda hecho el depósito que prescribe la Ley 11.723

ISBN 987-9390-70-9

Este libro no puede ser reproducido total o parcialmente sin la previa autorización de los autores.

Ediciones Magna

Tel: (0381) 4232208

S.M. de Tucumán, Tucumán, Argentina.

E-mail: editmagna@hotmail.com – info@edicionesmagna.com.ar

www.edicionesmagna.com.ar

INDICE

Agradecimientos	8
Prologo	9
Introducción	10

Capítulo I – El propóleo

El propóleo	18
Origen botánico de los propóleos	20
Propóleos en ambientes templados	
Propóleos en ambientes subtropicales y tropicales	
Propóleos Argentinos	
Recolección y elaboración por parte de las abejas	25
La recolección	
La elaboración	
Factores que condicionan la producción de propóleos por parte de las abejas	26
Métodos de producción	29
Algunos mitos y muchas preguntas	29
Referencias	30

Capítulo II - Composición química y propiedades biológicas del propóleo

Composición química de propóleos	33
Propóleos de Uruguay	
Propóleos de Brasil	
Propóleos de El Salvador	
Propóleos de Honduras	
Propóleos de Guatemala	
Propóleos de las Islas Canarias	
Propóleos de Israel, Reino Unido y Estados Unidos	
Propóleos de Croacia.	
Propóleos de Turquía	
Propóleos de China	
Propóleos de Nueva Zelanda	
Propiedades biológicas del propóleo	57
¿Medicina Natural vs. Medicina Convencional?	57
Apiterapia	60

Propiedades terapéuticas del propóleo	60
Propiedades antimicrobianas	
Capacidad antibacteriana	
Estafilococo Dorado	
Propóleos y antibióticos	
Capacidad Antiviral	
Herpes Simple	
Condilomas acuminados	
Herpes Zoster	
Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	
Cicatrizante y antiinflamatorio	
Reacciones locales adversas	
Acciones sobre el sistema inmunológico – Inmunomodulador	
Estudios toxicológicos sobre el propóleo	
Antioxidantes de la dieta en patología cardiovascular.	
Investigaciones con propóleos	
Antioxidante y antineoplásico	
Nuevas fronteras del conocimiento, supresión de la expresión genómica	79
Referencias	80

Capítulo III – Producción de propóleos argentinos

Origen botánico de los propóleos argentinos	87
Incidencia de la flora introducida	93
Factores que condicionan la producción	95
Métodos de producción y cosecha	97
1. Método artesanal o de raspado	
2. Método de mallas	
Mallas matrizadas.	
Mallas de tejido mosquitero plástico.	
Características de los propóleos de diferentes regiones de Argentina	99
Región NOA	
Región NEA	
Región de Cuyo	
Región Central	
Provincia de Buenos Aires	
Región Patagónica.	
Diferencias y similitudes entre las regiones	

Ensayos de producción en diferentes zonas de la República Argentina. Evaluación de métodos de recolección y cosecha	108
Ensayo en Leales – Tucumán	
Ensayo de Calingasta – San Juan	
Ensayo en Río Turbio – Santa Cruz.	
Ensayo en el Valle de Uco – Mendoza	
Ensayo en el Delta del Paraná – Buenos Aires.	
Ensayo en Gualeguaychú - Entre Ríos.	
Limpieza, almacenamiento, conservación y transporte	117
Procesamiento industrial	119
Principales contaminantes	123
Evaluación del efecto del método de cosecha sobre el contenido de plomo.	
Determinación de Arsénico	
Referencias	126
Capítulo IV – Metodología Analítica	
I. Análisis de propóleos en bruto	129
1. Preparación de la muestra	
2. Humedad	
3. Cenizas	
4. Determinación de ceras	
5. Determinación de resinas	
6. Determinación de impurezas mecánicas	
7. Determinación de compuestos fenólicos totales	
8. Determinación de flavonoides totales	
9. Determinación del índice de oxidación	
10. Determinación del espectrograma de absorción en el UV	
11. Determinación de plomo en propóleos en bruto	
12. Determinación de arsénico en propóleos en bruto	
II. Análisis de extractos de propóleos	146
1. Preparación de la muestra	
2. Determinación de extracto seco	
3. Determinación de ceras	
4. Determinación de compuestos fenólicos totales	
5. Determinación de flavonoides totales	
6. Determinación del índice de oxidación	
7. Determinación del espectrograma de absorción en el UV	
8. Determinación de plomo	
9. Determinación de Arsénico	
Referencias	155

Conclusiones	157
---------------------------	-----

ANEXO

Compuestos fenólicos	161
Ácidos fenólicos	
Flavonoides	
Clasificación y nomenclatura	
Propiedades físicas	
Química de los flavonoides	
Espectroscopia UV	
Fluorescencia	
Reacción con los metales pesados	
Toxicidad aguda de los flavonoides	
Potencial de oxidación – Reducción de los flavonoides	
Los flavonoides y su mecanismo de acción	
Datos epidemiológicos: enfermedades cardiovasculares y alimentación. Los flavonoides previenen enfermedades	
Los flavonoides reducen la disfunción endotelial	
La Hipótesis oxidativa de aterogénesis	
Normativas sobre propóleos y extractos de propóleos	189
Normativas de Rusia	
Normativa de Japón	
Normativa de Brasil	
Normativas de Argentina	
Esquema 1 de Norma IRAM-INTA 15935-1	
Requisitos sensoriales	
Requisitos físico químicos	
Esquema 1 de Norma IRAM-INTA 15935-2	
Requisitos sensoriales	
Requisitos físico químicos	
Referencias	196
Símbolos, unidades, abreviaturas y acrónimos	200

AGRADECIMIENTOS

Quienes trabajamos para obtener la información y compendiarla en esta obra pensamos como Norbert Lechner, que escribir un libro es nuestra forma de agradecer. Por eso queremos dejar expresamente planteado nuestro más profundo agradecimiento:

- A las abejas, que sin saberlo dan motivo a nuestras vidas y permiten que cada día nos levantemos felices de enfrentar una nueva jornada de trabajo.
- A nuestras familias y seres queridos, que como todos los entornos de gente apasionada con su trabajo, no solo nos brindan su comprensión sino que nos alientan a seguir.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, que creyó en nosotros brindándonos a través del FONTAR y FONCyT el apoyo económico para llevar adelante el trabajo. Pero por sobre todas las cosas que con los consejos de evaluadores y personal técnico nos ayuda a ser mejores.
- Al INTA que nos permite formar parte de una institución fuertemente comprometida con la competitividad, equidad y salud ambiental.
- A la red de promotores e investigadores del PROAPI, que pusieron dedicación y esmero con el solo objetivo de aportar su granito de arena para la construcción de una apicultura mas competitiva y equitativa.
- A la Unidad Académica de Río Turbio de la Universidad Nacional de Patagonia Austral y a la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán, que se sumaron al equipo de investigadores del PROAPI para hacer sus aportes.
- Al Ingeniero Víctor Groppa, quien desde la empresa REINO S.A. nos estimuló en nuestro trabajo.
- A la Cooperativa Norte Grande, que es agradecer a los pequeños apicultores del olvidado Norte Argentino, a los que sueñan y trabajan por un futuro mejor para sus hijos.

PROLOGO

Pese a tratarse de un producto utilizado desde hace mas de 2.000 años y a la abundante literatura específica disponible, el propóleos es un producto bastante desconocido. Incluso para los investigadores existen todavía muchas preguntas por responder, desde el comportamiento de forrajeo por parte de las abejas hasta los factores que condicionan la calidad en función de su utilización al servicio del hombre, plantas o animales. En ese contexto comenzamos a trabajar dentro del PROAPI conformando un equipo interinstitucional que involucró, además del INTA a las Universidades Nacionales Patagonia Austral, del Centro, de Santiago del Estero y de Tucumán, a empresas como Reino S.A., Cooperativa Norte Grande, Abeja Dama; a organismos como la Sociedad Apícola Uruguaya y muchos apicultores de todo el país que prestaron una valiosa colaboración.

El presente trabajo pretende, en el marco de los conocimientos disponibles, aportar los datos mas relevantes generados por nuestro equipo en los últimos años, compendiando la información, experiencia, capacidades y comunicaciones científicas producidas durante la ejecución de los proyectos FONTAR PMT FL 3/21 y PICT 08-03862, evaluados y financiados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

El libro incursiona en la Caracterización físico química de los propóleos argentinos introduciendo a sus fuentes de variabilidad, presenta una acabada revisión sobre propiedades biológicas del propóleos y su aplicación desde la experiencia del Dr. Walter Fierro, hace mención al desarrollo y validación de técnicas analíticas simples y presenta las primeras aproximaciones de normalización a nivel de productos, técnicas y procesos como herramientas tendientes a la estandarización y adecuado control de calidad, indispensables para que el propóleos alcance el lugar que merece dentro del mercado.

Quienes trabajamos para generar, compendiar y ordenar la información que aquí presentamos; aspiramos a que sirva como un aporte no solo para profundizar el conocimiento de este valioso producto, permitiendo que mayor cantidad de gente se beneficie con su utilización, sino también para mejorar la competitividad del sector apícola argentino, verdadero ejemplo de esfuerzo cooperativo.

Los autores

Introducción

Introducción

Considerando el potencial productivo y los estudios preliminares que indicaban que el propóleo argentino es de calidad similar o superior a los de otros países y que Japón tradicionalmente ha importado propóleos en el orden de algunos cientos de millones de dólares por año, Argentina debería aspirar a captar una significativa porción de dicho mercado, lo que permitiría incrementar los ingresos del sector. Realizar esta tarea, considerando las normas establecidas por uno de los países más exigente en términos de calidad y que normalmente se encuentra a la vanguardia en la utilización de propóleos, resultaba indispensable para aprovechar las oportunidades que se abren para la apicultura argentina en este terreno.

La estructura de la apicultura argentina dominada por microempresas y la estrategia de intervención del PROAPI, diseñada para propender a la equidad productiva en todo el país, garantizan que los ingresos obtenidos lleguen a manos de los pequeños productores.

Con este marco, se presentó un proyecto conjunto entre el PROAPI (INTA EEA Famaillá), el CEDIA (UNSE), la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNCPBA) y el ITA (INTA Castelar) a la convocatoria PITC '98 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, que luego de ser evaluado resultó seleccionado para ser financiado (1). Entre sus principales objetivos se encontraban la caracterización físico química del propóleo producido en diferentes zonas del país, obtenido a partir de diversos métodos de recolección y en especial la cuantificación de sustancias biológicamente activas.

Metodología implementada:

Se diseñó una estrategia para la obtención y análisis de muestras, provenientes de dos fuentes:

1. de ensayos diseñados e implantados en todo el país, a los efectos de evaluar la cantidad y calidad de propóleos obtenido usando diferentes métodos de producción y recolección.
2. de apiarios de productores, acompañadas con una ficha de datos.

El protocolo para la realización del ensayo comenzó a delinear en reuniones previas del equipo de investigadores del PROAPI, de las cuales participó el Ing. Víctor Groppa (REINO S.A.) y terminó de definirse en un Taller de unificación de criterios, realizado en INTA Famaillá, entre el 26 y el 30 de julio de 1999.

El ensayo consistió de tres tratamientos, cada uno de los cuales se aplicó sobre 10 colmenas como unidad experimental, en un diseño de bloques completamente aleatorizado:

- Tratamiento 1. Producción utilizando cuñas separadoras y recolección por raspado.
- Tratamiento 2. Producción y recolección utilizando mallas mosquiteras plásticas.
- Tratamiento 3. Producción y recolección utilizando mallas plásticas matrizadas.

Tratamiento 1: Se utilizaron cuñas de madera, de 2,5 mm de espesor, las que se colocaron en: cámara de cría, alzas y entretapa. Cada vez que las colmenas se revisaron, se raspó el propóleo utilizando palancas de acero inoxidable. En las colmenas pintadas se evitó el raspado profundo (hasta tocar la madera) para no incorporar pintura que podría contener plomo. La frecuencia de las revisiones fue la habitual en cada zona.

Tratamiento 2: Se utilizaron mallas plásticas tipo mosquiteras que se colocaron en la entretapa. Cada 15 días, la malla fue retirada y reemplazada por otra vacía. Si antes de ese período, las abejas propolizaron el espacio libre entre los cabezales de los cuadros, la malla se acomodó de manera de dejar al descubierto las zonas vacías. Una vez retiradas, se congelaron para facilitar el desprendimiento del material. Lo cosechado en cada una se recogió por separado sobre un papel blanco.

Tratamiento 3: Las abejas depositaron el propóleo en las ranuras estampadas en la placa plástica. Para la cosecha, preparación y envío de la muestra se siguió el mismo procedimiento que en el Tratamiento 2.

En todos los casos, el propóleos cosechado se colocó en bolsas de polietileno, que se cerraron e identificaron con un rótulo. Las muestras, acompañadas con las planillas de relevamiento de datos, se enviaron al INTA EEA Famaillá para la determinación de las características físicas, químicas y organolépticas. Los ensayos se implantaron en 18 localidades del país, llegando a zonas tan australes como Río Turbio y estuvieron a cargo de la red de promotores del PROAPI, quienes fueron los responsables de la implementación, puesta en marcha, recolección de muestras, llenado de planillas de datos y envío al Laboratorio de Agroindustrias del INTA Famaillá.

Tabla 1. Ubicación de los ensayos y responsables en cada caso

Provincia	Localidades	Responsable(s)
Buenos Aires	Campana - Delta del Paraná	Dra. Laura Gurini
Catamarca	Andalgalá	Ing. Orlando Pérez
Entre Ríos	Guauguaychú	Ing. Daniel Primost
La Rioja	Olta	Lic. Fabián Ciocchini
Mendoza	General Alvear Valle de Uco	Ing. Mario Vicente
Misiones	Apóstoles	Ing. Miguel Genbarowsky
Neuquén	Alto Valle El Bolsón	Ing. Nancy García Ing. César Massaccesi
Río Negro	Río Colorado Valle Medio	Ing. Patricio Ciolino
San Juan	Calingasta	Lic. Fabián Ciocchini
Santa Fé	Ceres	Ing. Javier Caporgno
Santiago del Estero	San Pedro de Guasayán La Banda	Ing. Ana Chazarreta
Tucumán	Leales Valle Calchaquí	Vet. Andrés van der Horst Ing. Carlos Segura
Santa Cruz	Río Turbio	Ing. Rodolfo Christiansen

Implementación y puesta en marcha del ensayo:

Para facilitar la tarea se diseñó un kit que fue distribuido entre los promotores y en el cual se encontraba todo el material necesario para la realización del ensayo, recolección e identificación de muestras y packaging para envío. Los elementos que lo componían fueron:

- Cuñas separadoras de madera para el Tratamiento 1.
- 20 mallas mosquiteras plásticas a emplearse en el Tratamiento 2, cortadas y con los bordes termosellados para evitar deshilachamiento.
- 20 mallas plásticas matrizadas para el Tratamiento 3.
- Bolsas de polietileno para recolección de muestras.
- Rótulos identificatorios para las muestras contenidas en las bolsas.
- Cajas para envíos mensuales de muestras y planillas.
- Rótulos para envío de cajas.
- Cinta para embalar.
- Instructivo de utilización y registro.
- Diskette con archivos para reimpresión de planillas y rótulos, personalizado para cada ensayo.

De esta manera, se logró uniformar el material a utilizar y la información a recolectar. El ensayo se dio por iniciado en el momento que el promotor implementó el ensayo.



Foto 1. kit con los elementos para el ensayo

Recepción y Análisis de Muestras – Registro de resultados:

Una vez recibidas las muestras en INTA Famaillá, se ejecutó el siguiente protocolo:

- a) Registro de los datos de origen consignados en la planilla de relevamiento.
- b) Peso de cada muestra y cálculo del total cosechado.
- c) Caracterización organoléptica.
- d) Toma de submuestra para análisis: Humedad, Cera, Resinas, Impurezas mecánicas, Cenizas, Fenoles Totales, Flavonoides totales y espectrograma UV-VIS.
- e) Registro de resultados.
- f) Guardado y registro de contramuestras.
- g) Registro provisorio en la base de datos.
- h) Emisión del informe parcial de la muestra para uso interno.
- i) Envío de muestras a otras unidades de la red de laboratorios.
- j) Recepción de resultados.
- k) Registro definitivo en la base de datos.
- l) Emisión del informe final de la muestra a distribuir entre los responsables de cada ensayo.

Resultados obtenidos:

Durante su ejecución, el proyecto permitió obtener una gran cantidad de información, que se presenta en este libro. Se capacitó a técnicos de organismos nacionales y extranjeros (El Salvador, República Dominicana, Honduras, Ecuador) en metodologías analíticas y se transfirió tecnología a varias empresas. Mediante el relacionamiento con REINO S.A. se llevó a cabo la promoción de las características de los propóleos argentinos en diversas ferias internacionales bajo el slogan "Argentine propolis: the way of quality" y se organizó el Congreso Internacional de Propóleos en el año 2000 (<http://www.apinetla.com.ar/congreso>), reuniéndose a los principales investigadores nacionales e internacionales, con una concurrencia estimada en mas de 700 personas, lo cual demuestra el interés sobre este producto. Una de las conclusiones a las que se arribó es la necesidad de tipificar y estandarizar adecuadamente "los propóleos", con el fin de posicionarlos para su mejor empleo.

En el marco de éste evento se organizó una reunión del equipo técnico y promotores responsables de los ensayos para evaluar los avances y efectuar los ajustes necesarios. Con posterioridad a la finalización del Congreso se organizó un Workshop del que participaron integrantes del equipo técnico del PROAPI e investigadores de Brasil, Uruguay, El Salvador, Egipto y Japón presentándose el proyecto con mayor nivel de detalles y debatiéndose y consensuando la metodología analítica a utilizar para el análisis físico químico a nivel exploratorio y comercial.

Por otro lado, mediante la integración al Subcomité de Productos Agroalimentarios del NOA, dentro del Grupo de Trabajo de Miel Regional – Subgrupo de Trabajo Propóleos, y en respuesta a la convocatoria efectuada por IRAM e INTA, se elaboraron las Normas IRAM-INTA 15935-1 “Propóleos en bruto” y 15935-2 “Extractos de propóleos”, actualmente en esquema 1, previo a su aprobación final. En este sentido cabe aclarar que estas normas son de cumplimiento voluntario y apuntan a distinguir con un sello a las partidas de propóleos o extractos que alcancen o superen los valores de referencia fijados, con lo cual se podrá acceder a precios o mercados diferenciales que requieran y reconozcan la calidad.

Referencias:

1. Bedascarrasbure, E. Caracterización físico – química de propóleos argentinos y sus extractos. Congreso Internacional de propóleos. 1 y 2 de septiembre de 2000. Buenos Aires. Argentina.

Capítulo I

El Propóleos

EL PROPÓLEOS

Las abejas elaboran el propóleos mezclando sustancias activamente secretadas o exudadas por heridas de ciertos vegetales (1), con ceras, sus secreciones salivares y otras sustancias en proporciones variables. Lo utilizan para barnizar el interior de la colmena (incluyendo los panales) con fines desinfectantes, para cerrar grietas, reducir vías de accesos y para consolidar los componentes estructurales. También lo emplean para recubrir los cadáveres de animales que se pueden haber introducido en la colmena (escarabajos, roedores, lagartijas, etc.) y son muertos por las abejas quedando embalsamados y evitando su descomposición. Esta propiedad ya era conocida por los egipcios y los sacerdotes lo utilizaban para embalsamar los muertos.



Figura 1. Propóleos depositado en un cuadro.

La composición química, además de compleja es variable. Lejos de constituirse en un inconveniente, esto ha incentivado a numerosos investigadores de todo el mundo que han venido tratando de desentrañar los secretos más íntimos de la composición química de este producto. Desde un punto de vista macroscópico y general, podemos asumir que el propóleos está constituido de la siguiente manera:

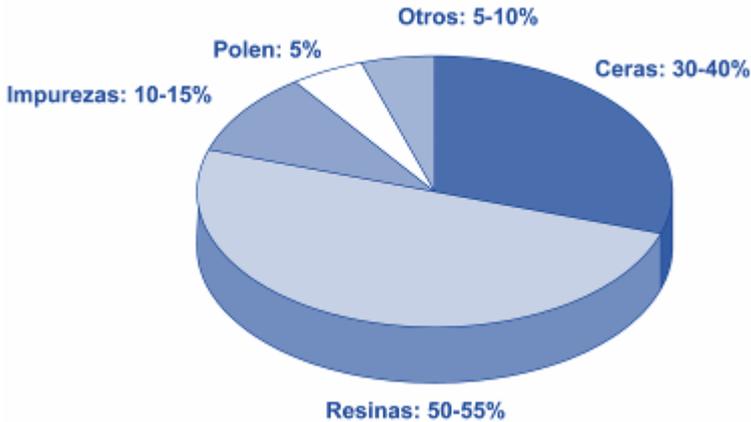


Figura 2. Composición genérica del propóleo

Estos parámetros están influenciados por varios factores tales como: el medio ambiente, la época del año, el método de recolección, zona de la colmena de donde se extrajo (2), el tipo de abejas (3).

La fracción denominada “Ceras” (cera de abejas) es insoluble en agua y alcohol en frío, pero muy soluble en n-hexano o éter de petróleo y normalmente es considerada como inerte. Por su parte, las “Resinas” son altamente solubles en etanol, metanol, cloroformo y prácticamente insolubles en agua, dependiendo del origen botánico del propóleo. De acuerdo a numerosas investigaciones realizadas en todo el mundo esta fracción es de gran interés por haberse encontrado en ella compuestos del tipo fenólico, con intensa actividad biológica que en muchos casos explican las propiedades del propóleo. Se puede encontrar además otros compuestos con actividad biológica como aceites esenciales (compuestos volátiles), los cuales se pueden degradar (principalmente por oxidación) ya sea por acción del tiempo y de las temperaturas altas. Debido a estas características, se ha propuesto como un indicador de “frescura” de los propóleos (4).

Las “Impurezas” (o Impurezas mecánicas) están constituidas por restos vegetales y minerales adicionados por las abejas con el objeto de otorgarle la consistencia necesaria de acuerdo a la función que tendrá en la colmena.

:

Para ilustrar la variación respecto del origen geográfico podemos considerar resultados analíticos de muestras de propóleos en bruto correspondientes a diferentes regiones de la República Argentina:

Tabla 1. Valores medios por regiones

Región	Promedio (%)		
	Ceras	Resinas	Imp.Mec.
NOA	45,17	35,48	14,61
NEA	57,83	19,29	17,06
Cuyo	24,60	65,56	5,28
Centro	64,64	19,62	12,14
Bs.As.	24,54	64,96	6,06
Patagonia	69,10	21,13	4,95

Las provincias que integran las regiones son:

NOA: Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Santiago del Estero.

NEA: Chaco, Formosa, Misiones, Corrientes, Entre Ríos.

Cuyo: La Rioja, San Juan, Mendoza.

Centro: Córdoba, Santa Fé, San Luis, La Pampa.

Bs.As.: Buenos Aires.

Patagonia: Río Negro, Chubut, Santa Cruz.

ORIGEN BOTANICO DE LOS PROPÓLEOS

Habiendo definido el producto como una mezcla donde intervienen principalmente partes vegetales (tipo resinosas) y animales (cera y enzimas), resulta claro que la composición de la fracción resinosa del propóleo estará muy relacionada con la de las plantas que lo originaron. En realidad esta relación es muy estrecha y en principio la mayoría de los compuestos exudados por las plantas son incorporados en el propóleo sin alteración. Sin embargo es posible que algunos glicósidos se hidrolicen por acción enzimática ya sea cuando las abejas los están recolectando o durante la adición de cera para elaborar el propóleo (5).

Se han realizado numerosos estudios relacionados con la composición del propóleo y de la vegetación originaria en ambientes templados y muy pocos en climas subtropicales o tropicales. Una de las principales características determinadas a través de las investigaciones, es su gran variabilidad desde el punto de vista químico, al analizar propóleos de diferentes orígenes geográficos (6), Si bien esta variabilidad constituye una dificultad a los efectos de su estandarización, le otorga amplias posibilidades de utilización.

Propóleos en ambientes templados

Mediante Cromatografía Gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS) se ha podido determinar que en el caso de propóleos provenientes de Europa, la principal fuente de exudados la constituyen los brotes de álamos (en especial de *Populus nigra*) (2) y mediante otros métodos experimentales se determinó que los propóleos de la ex URSS se originarían a partir de exudados de abedul (5).

Los álamos (*Populus sp.*) pertenecen a la familia *Salicaceae* al igual que los sauces (*Salix sp.*) provienen en su mayoría del hemisferio Norte y se encuentran ampliamente difundidos en casi todo el mundo. Se han logrado una gran variedad de hibridaciones y poseen la ventaja de clonarse (propagarse agámicamente a través de estacas).

En un estudio realizado en Universidad de Oxford (4) se analizaron propóleos de diferentes países: Austria, Ecuador, Alemania, Israel, Reino Unido y Estados Unidos. Excepto en el caso de Ecuador, las muestras analizadas provenían de países en los cuales los álamos forman parte de su vegetación nativa y están ampliamente distribuidos. Se identificaron solamente compuestos característicos de los exudados de yemas de álamos junto a cantidades variables de cera y azúcares que agregaron las abejas. En algunos casos fue posible relacionar directamente la composición de las resinas del propóleo con la de los exudados de ciertas especies o clones de álamo. Notaron además que aún dentro del género *Populus*, parece haber preferencia por determinadas especies. Las muestras de propóleos que analizaron contenían compuestos típicos de los álamos de la sección *Aigeiros* y de híbridos resultantes del cruce de estas especies.

En esta sección se encuentran *Populus nigra* y *P. deltoides*, junto a otras especies relacionadas con este último tales como *P. freemontii*. Los exudados de otras especies de *Populus* ampliamente distribuidas (*P. balsamifera* L., *P. trichocarpa* Torr. y Gray, principales miembros de la sección Tacamahaca) parecen no ser utilizados por las abejas, ya que los componentes principales de sus exudados contienen terpenoides y dihidrochalconas que raramente fueron encontrados en las muestras de propóleos que analizaron.

Trabajando con 6 muestras provenientes de diferentes zonas de Turquía (7) y mediante TLC se determinó que el origen botánico predominante corresponde a *Populus nigra*, en tanto que para una muestra era *P. euphratica*.

En otras áreas donde los álamos no son plantas nativas, como por ejemplo en Australia, Sud América y en la mayoría de las regiones ecuatoriales, las abejas utilizan otras plantas para recolectar exudados con los cuales elaborar el propóleos. De estas áreas analizaron muestras de propóleos del Ecuador producidas por abejas nativas sin aguijón y por *Apis mellifera*.

Determinaron que la composición del propóleos producido por las abejas nativas sin aguijón no se asemejaba al de ninguna muestra de Europa o América del Norte y contenía compuestos no comunes en el propóleos europeo. El único compuesto fenólico identificado fue el ácido 3,5 dihidroxibenzoico. De acuerdo a los autores los exudados incorporados por estas abejas podrían provenir de flores de *Dalechampia spp.* y *Clusia spp.* las cuales poseen estructuras que secretan una resina muy atractiva para las abejas, aunque esto último no fue comprobado.

El propóleos de *Apis mellifera* en cambio contenía algunos flavonoides característicos de los exudados de álamos, pero como componentes minoritarios y la mayoría de los componentes son completamente diferentes. Aparentemente las colonias de *Apis mellifera* intentaron ubicar los álamos y ocasionalmente encontraron alguna especie introducida. Esto confirmó que si *Apis mellifera* no puede encontrar su fuente preferida de exudados (por ejemplo álamos) los colecta de otras especies y los incorpora al propóleos.

Propóleos en ambientes subtropicales y tropicales

Por otro lado, mediante HPLC y GC-MS se analizó la composición de tinturas etanólicas para establecer los principales compuestos del propóleo de Nueva Zelanda (4,5), la cual posee una flora única como consecuencia de su aislamiento geográfico, que conviven junto con especies introducidas como: Abedul blanco, Olmo, Pino, Roble, Sauce y Acacia.

Los principales flavonoides determinados fueron pinocembrina y pinbanksina-3-acetato y no se observaron variaciones significativas entre regiones. Cualitativamente, se puede decir que los flavonoides encontrados fueron similares a los de los propóleos correspondientes a zonas templadas de Europa y Norte América, por lo que se pudo inferir que los propóleos de Nueva Zelanda se originarían a partir de vegetación introducida (por ejemplo álamos), aunque no se pueden descartar los probables aportes de las especies nativas sin posteriores investigaciones.

En zonas con clima tropical, ni los álamos ni los abedules son especies autóctonas y por lo tanto las abejas deben buscar fuentes alternativas de material resinoso para elaborar propóleos. A través de la identificación de los principales flavonoides en el propóleo proveniente de zonas con clima casi tropical, donde los álamos no siempre están presentes, Martos y col. encontraron que los exudados de hojas de *Cistus spp.* eran las plantas originarias de los propóleos en Túnez. En forma análoga, en el Desierto de Sonora, *Ambrosia deltoidea* fue la planta originaria. A partir de muestras de propóleos de Venezuela, Barberán y col. aislaron benzofenonas poliisopreniladas, compuestos éstos que son los principales componentes de las resinas exudadas por las flores de algunas especies de *Clusia* y basándose en la comparación cromatográfica demostraron que *Clusia mayor* y *Clusia menor* (Guttiferae) fueron las principales fuentes para el propóleo en la región considerada. Existen estudios químicos sobre las plantas originarias de propóleos en Australia (*Xanthorrhoea spp.*) y Brasil (*Araucaria spp.*, *Baccharis spp.*) pero en estos casos no hay suficiente comparación directa entre los propóleos y las plantas. (6,7)

Para identificar las plantas originarias del propóleo de Brasil, Kamazawa y col. observaron el comportamiento de las abejas en Minas Gerais. Las obreras mastican pequeños trozos de *Baccharis dracunculifolia* ("alecrim do campo" o "vasourinha"), lo colocan en las cestas de polen y lo trasladan a la colmena donde se utiliza para producir propóleos, conocido como "green propolis" (propóleo verde). Los autores recolectaron hojas de *B.dracunculifolia* y propóleos para comparar sus componentes utilizando Cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS), no encontrándose diferencias entre la composición química de los extractos etanólicos de *B.dracunculifolia* y la del propóleo (8,9). Estos resultados fueron corroborados por otros autores, utilizando GC-MS (10). El análisis de las resinas de alecrim indicó que posee bajo contenido de flavonoides y alto de terpenoides. (11). Posteriormente, Salatino (12) demostró que podía presentarse una gran variación en la composición química del green propolis, lo cual sugiere que además otras especies nativas pueden estar aportando sus resinas. Estableció además que los principales componentes de la resina de *B. dracunculifolia* eran derivados prenilados del ácido cinámico, en tanto que los terpenoides (di, sesqui y pentacíclicos) estaban presentes en muchas muestras de propóleos, pero no en todas.

Trabajando con muestras de Uruguay, Bonvehi y col. determinaron que el origen botánico correspondía a: *Eucalyptus globules*, *Populus sp.*, *Betula sp.* y *Salix sp.* (13)

Propóleos Argentinos

En el marco del Proyecto "Caracterización físico química de propóleos argentinos y sus extractos" se realizó un trabajo en dos zonas de la República Argentina, para verificar la preferencia de las abejas para forrajear resinas desde ciertos vegetales. Los detalles del trabajo y resultados se presentan en el Capítulo III.

RECOLECCIÓN Y ELABORACIÓN POR PARTE DE LAS ABEJAS

La recolección

Como ya se mencionó, las resinas que dan origen al propóleo, son sustancias activamente secretadas o exudadas por heridas de ciertos vegetales (1). Si bien el comportamiento de forrajeo de estas resinas ha sido escasamente estudiado, Manrique y Egea (14) reportan que solo pocas abejas colectan propóleos. Según Santos y col. (15) las colonias africanizadas en ambientes tropicales presentan un mayor número de forrajeras de resinas entre las 10 y 14 hs. y la recolección cesa por debajo de los 21 C o por encima de los 28 C. Sin lugar a dudas la temperatura ambiente juega un papel muy importante desde el punto de vista de la maleabilidad de las resinas facilitando la actividad de forrajeo por parte de las abejas.

Las pecoreadoras de *Apis mellifera* recolectan resinas utilizando las mandíbulas y el primer par de patas, durante este proceso participa además el ácido 10- hidroxidecenoico secretado por las glándulas mandibulares (16,17,18). De ese modo extraen las resinas formando pequeños gránulos que son trasladados a los sacos corbiculares para transportarlos hasta la colonia. Según Leuenberger (citado por Frisch (19)) las abejas no colocan las resinas recolectadas en el fondo plano de las cestillas sino en los pelos que las bordean. Tanto García et al. (20), como Gojmerac (Citado por Martínez y Egea (21)) reportan que durante el proceso de recolección las abejas agregan cera por ellas secretada, pero es muy poco probable que la incorporación de cera se produzca en esta etapa del proceso.

La elaboración

En colmenas de observación se ha visto que las pecoreadoras, al llegar a la colonia, se dirigen al lugar donde el propóleo es utilizado y suelen esperar allí pacientemente entre una y siete horas hasta ser liberadas de su carga; durante este tiempo no tratan de extraer las resinas de sus patas por ellas mismas, pero si ayudan a las abejas (aparentemente pecoreadoras) encargadas de realizar esa tarea (19).

Respecto de la localización de las resinas y flujo de información dentro de la colonia, existen todavía muchos aspectos desconocidos, pero Meyer y Milum (Citados por Frisch (19)) reportan danzas realizadas por las recolectoras de resinas, similares a aquellas observadas en las pecoreadoras de néctar y polen.

Si bien estas danzas fueron descritas pero no estudiadas en profundidad, aportan evidencias que permiten deducir un papel decisivo en la ubicación de las fuentes de resina y reclutamiento de pecoreadoras en esa dirección.

La procedencia del propóleo se discute desde hace más de 2.300 años, cuando Aristóteles filosofaba sobre el tema. Originalmente se le asignaba un origen “externo” donde la calidad del producto resultante estaba exclusivamente influenciada por la calidad de las resinas recolectadas (Rosch, Evenius y Berlopech, citados por Del Cueto (22)).

Pero posteriormente se vio que en los propóleos aparecían algunos componentes no presentes en las resinas y comenzó a hablarse de un “origen interno”. Esta teoría fue enunciada originalmente por Kustenmacher en 1907 (citado por Del Cueto (22)) quien hacía referencia al “bálsamo” originado en la digestión e hidrólisis láctica de los granos de polen; si bien explicaría la presencia de granos de polen (o sus exinas), esta teoría fue luego descartada en función de la composición química del propóleo, que nada tiene que ver con los productos de la digestión del polen. Además existen una cantidad de aspectos relacionados a la anatomía y fisiología de *Apis mellifera* que permiten descartar la tesis del origen interno.

Si bien está claro que el propóleo tal como es conocido desde antes de Cristo tiene un importante aporte de sustancias elaboradas por las abejas (5) y que quizá sean abejas adultas las que participan en su elaboración; su origen probablemente se explique por una posición intermedia entre estas dos teorías. Pero es evidente que el origen botánico tiene una incidencia decisiva sobre el producto resultante, constituyéndose en la principal fuente de variabilidad entre diferentes muestras de propóleos (23). Maidana (2) encontró que el propóleo de piso y piquera tenía mayor proporción de impurezas mecánicas, que podía deberse a la función que las abejas le asignarían al propóleo en esa posición; para la que necesitarían mayor resistencia estructural y agregarían más sustancias inertes.

Factores que condicionan la producción de propóleos por parte de las abejas

El comportamiento de forrajeo de resinas y consecuente producción de propóleos por parte de las abejas se encuentra condicionado por innumerables factores externos e internos, entre esos factores podemos destacar:

- **Ubicación del apiario**

La ubicación del apiario juega un rol fundamental en relación a la producción de propóleos por parte de las abejas sobre todo desde el punto de vista de la presencia de especies productoras de resinas dentro del área de forrajeo.

- **Época del año**

Tradicionalmente se afirmaba que las abejas recolectan el propóleo durante el otoño, preparando la habitación para la futura invernada. Se ha reportado que en el Norte de Europa las abejas lo recogen desde finales de Julio hasta el fin de la temporada de vuelo, pero en Italia lo hacen en la primavera temprana (17).

La información obtenida por el PROAPI ha demostrado que el pico de recolección de resinas y elaboración de propóleos con destino al sellado de grietas de la colonia se produce en diferentes momentos de acuerdo a la zona. Si bien en ambientes templado fríos efectivamente la mayor recolección se produce en general hacia el otoño, se ha visto que en ambientes subtropicales se produce durante el verano y en condiciones extremas como las del punto de muestreo de Río Turbio en Santa Cruz (probablemente el punto de ensayo mas austral del mundo) prácticamente no hay producción de propóleos con ese destino en ningún momento del año.

En el caso del Pedemonte de la Selva Tucumano Oranense en Tucumán y región oriental del Parque Chaqueño Argentino, el pico de recolección se produciría, luego del flujo principal de néctar y antes del receso estivo otoñal (24) (ver Capítulo III).

Todavía no está suficientemente claro si el pico de recolección de resinas y producción de propóleos responde a factores internos de la colonia, como su mayor demanda, mayor capacidad exploratoria al caer la entrada de néctar, etc.; o a factores externos, como la oferta de resinas, temperatura u otros factores ambientales.

Sean cuales fueren los factores que la condicionan, es indispensable conocer la curva de ingreso de resinas a la colonia y producción de propóleos en cada zona para lograr una cosecha eficiente. Se debe considerar que la colocación de mallas en momento inoportuno no solo reduce la eficiencia del proceso sino que además aumenta el contenido de cera con la consiguiente reducción del rendimiento industrial.

- **Fortaleza de la colonia**

Si bien, como se concluirá mas adelante, todavía quedan muchas zonas grises y aspectos por dilucidar respecto del comportamiento de forrajeo y dinámica de los propóleos dentro de la colonia; evidentemente la fortaleza de la colonia afecta la recolección de resinas. En general se acepta que el forrajeo de propóleos produce gran desgaste a las abejas que deben ser adecuadamente alimentadas o tener néctar a su disposición para una adecuada recolección. Por ahora solo estamos en condiciones de consignar la relación que la fortaleza de la colonia tiene sobre el comportamiento global de forrajeo, en relación no solo a la proporción de abejas forrajeras sino también el estado fisiológico interno de las mismas, que determina en gran parte el “home range” o área de forrajeo (25). Sin embargo Manrique y Egea (14) trabajando con abejas africanizadas no encontraron relación entre la población de la colonia y la cantidad de polen recolectado. Incluso los autores reportan que colonias mas pobladas colectaron menos propóleos que las menos pobladas independientemente de la región.

- **Tipo de abejas**

Es ampliamente reconocida la diferencia en la tendencia a la recolección de resinas por parte de diferentes razas geográficas. *Apis mellifera caucasica* se destaca como una de las subespecies más propolizadoras (26). En una completa revisión realizada en la década del 70, Ghisalberti (17) reportaba que tanto *Apis cerana*, como *Apis dorsata*, *Apis florea* y las subespecies africanas de *Apis mellifera* no utilizan el propóleos. Sin embargo Manrique y Egea (14) reportan que además de *Apis mellifera caucásica*, sus híbridos africanizados tienen la mayor capacidad de recolección de propóleos, pero los autores encontraron que menos del 50% de colonias presumiblemente africanizadas recolectaron propóleos en diferentes localidades.

Pero dentro de un mismo ecotipo existen amplias variaciones entre colonias (ver Capítulo III) de manera coincidente con otros autores (14,20) y que en general es reconocido por todos los apicultores en su trabajo diario. Lo anterior sugiere diferencias genéticas en la tendencia a recolección de propóleos que pueden deberse a diferentes “inputs” dentro de la colonia o simplemente al condicionamiento genético del comportamiento de forrajeo (27).

Métodos de producción

Los métodos de recolección se basan en la tendencia de las abejas a sellar grietas o fijar componentes de la colonia con propóleos; el más tradicional, utilizado hasta la actualidad, ha consistido en el raspado del material inerte en los lugares donde las abejas depositaron propóleos con esos fines. En la actualidad es ampliamente reconocido que este método afecta la calidad del producto obtenido (28). Pero se han desarrollado diversos métodos sobre todo gracias al trabajo e ingenio de apicultores, tecnólogos e investigadores brasileros, donde el propóleo ocupa un papel central en la ecuación económica de muchos apicultores. En el marco del trabajo que dio origen a la presente publicación se compararon tres métodos de recolección más difundidos en la región, que se describen en el Capítulo III.

Algunos mitos y muchas preguntas

Como se ha visto en este capítulo, tanto el proceso de recolección de resinas como la elaboración de los propóleos a partir de ellas, no han sido totalmente dilucidadas y muchos de los mecanismos involucrados se encuentran todavía bajo un manto de sombras. Algunos mitos van cayendo, por ejemplo aquel todavía vigente durante el Congreso Internacional de Propóleos realizado en Bs.As. en 2000 que hablaba de “Propóleos tipo Chino” “Propóleos tipo álamo” o “Propóleos tipo Europeo”, cuando hoy sabemos que la variabilidad se expresa entre regiones muy cercanas, en diferentes épocas del año y quizá entre diferentes colmenas (para mayor información, véase el Capítulo III).

Otro mito bastante difundido es tratar de relacionar la presencia de exinas de polen en el propóleo con su origen botánico o aquel que hablaba de que las colmenas producían propóleos preparándose para el invierno. Así podríamos continuar con una interminable lista, que tiende a reducirse a medida que se profundiza el conocimiento. Evidentemente lo que aún predominan en el proceso que va desde las resinas producidas en las yemas de los árboles hasta el producto que nos ocupa en este trabajo son las preguntas: ¿Cómo identifican las abejas las fuentes de resinas?, ¿Cómo informan al resto de las abejas para producir el reclutamiento?, ¿Cómo transmiten información respecto de la calidad de la fuente encontrada?, ¿Cómo se desencadena el “input” de recolección dentro de la colonia? Estas son algunas de las muchas preguntas que resta responder desde la investigación para un mejor conocimiento sobre la producción de propóleos.

Referencias

1. Crane E., *Beekeeping: Science, Practice and World Recourses*, Heinemann, London, 1988.
2. Maidana, J. Características físico químicas del propóleos de la República Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía y Zootecnia. UNT. 1995.
3. Manrique, Antonio José; Soares, Ademilson Espencer. Início de um programa de seleção de abelhas africanizadas para a melhoria na produção de própolis. Congreso Internacional de Propóleos. 1 y 2 de Septiembre de 2000. Buenos Aires – Argentina.
4. Woisky, Ricardo G.; Salatino, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37(2): 99-105 (1998). IBRA.
5. Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R., "The composition and plant origins of propolis: A report of work at Oxford". International Bee Research Association, *Bee World*. Vol 71 Nº3. 1990.
6. Markham K.R.; Mitchel K.A.; Wilkins A.L.; Daldy J.A; Lu Y. HPLC y GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, Vol 42 Nº 1. pp 205-211, 1996
7. Popova, M.; Silici, S.; Kaftanglu, O.; Bankova, V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytochemistry*. Article in press. Corrected proof.
8. Bankova, V., de Castro, S., Marcucci, C., "Propolis: recent advances in chemistry and plant origin". *Apidologie* 31 (2000) 3–15
9. Kumazawa S, Yoneda M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2003 Jun;51(6):740-2.
10. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R, Popov S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Z Naturforsch [C]*. 1999 May-Jun;54(5-6):401-5.
11. *Revista Minas Faz Ciência* Nº 9. Dez/2001 a Fev./2002 - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. Fapemig. <http://revista.fapemig.br/9/propolis.html>
12. Antonio Salatino, Érica Weinstein Teixeira, Giuseppina Negri and Dejair Message. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. Review. Advance Access Publication. *eCAM* 2005;2(1)33–38.

13. Bonvehi J., Coll F. Study on propolis quality from China and Uruguay. Z. Naturforsch. 2000. 55C, 778-784.
14. Manrique, A. y Egea S., A. 2002. Zootecnia Trop., 20(2): 235-246.
15. Santos M. Dos, D. Message y C. Cruz. 1996. Influência dos fatores climáticos na coleta de própolis em abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. Anais do XI Congresso Brasileiro de Apicultura, Teresina, Piauí, p. 372.
16. Nikolaev, A.B. 1978. Defending the bee town. In: A remarkable hive product: propolis, Apimondia, Bucarest, p.10.
17. Ghisalberti, E.L. 1979.- Propolis: a review. Bee World, Cardiff, v. 60, p. 59-84.
18. Asis, M. Los productos de colmena. Havana, Centro de Información y Documentación Agropecuario, 1988. 68 p.
19. Frisch, K. v. 1967.- The dance language and orientation of bees. Harvard University Press. 566 p.
20. Jocilaine Garcia, Leonardo Garcia Mommensohn, Lucimar Pontara Peres de Moura, Vagner de Alencar Arnaut. De Toledo, Selma Lucy Franco & Roberto Álvarez Produção de própolis em colônias de *apis mellifera* africanizadas pelas técnicas convencional de raspagem e coletor de própolis inteligente. <http://www.cca.uem.br/anu4700.htm>.
21. Manrique Antonio J. y Ademilson E. Egea S. 2002.- Selección de abejas africanizadas para producción de própolis. Zootecnia Trop., 20(2): 235-246.
22. Del Cueto Leiva, D. J. 1994.- Propóleos, el oro púrpura de las abejas. Vida Apícola N° 66. Julio – Agosto.
23. Gurini, L., Segura, C., Maldonado, L., Alvarez, A., Torné, C., Rodríguez, D. y Bedascarrasbure, E. Origen botánico de propóleos obtenidos en dos zonas de la República Argentina. 1º Encuentro Latinoamericano de apicultores y 1º Congreso Cubano de Apicultura. La Habana. Cuba. 6 al 9 de Septiembre de 2004.
24. Maldonado, L.M.; Bedascarrasbure, E.L. Evaluación de diferentes métodos de recolección de propóleos. XVII Seminario Americano de Apicultura. 7,8 y 9 de agosto de 2003. Aguascalientes. México.
25. Bedascarrasbure E. L. (1994) "La abeja en la polinización de los cultivos". An: IV Congreso Iberolatinoamericano de Apicultura. Ed. Min. Agr. Gan y Rec. Ren. pp39-48.
26. Mabus, B. 1972. The importance of propolis to honey bee. Brit. Bee J., v. 19, n. 8, p. 198-199.
27. Basualdo, M; E. Bedascarrasbure y D. de Jong. (2000) Africanized Honey bees have a greater fidelity to sunflowers than do European bees. Journal of Economic Entomology 93:304-307.
28. Bedascarrasbure E., Maldonado L. y Alvarez A. Preliminary results about method of harvest's effect on the propolis' content of lead. Honeybee Science (2004) 25(3): 129-131.

Capítulo II
Composición química
y propiedades biológicas
del propóleo

COMPOSICION QUIMICA DEL PROPOLEOS

Como ya se mencionó, la composición del propóleos es variable dependiendo de su origen geográfico entre otros factores. Para evidenciar este hecho, se presentan a continuación resultados de análisis de muestras de propóleos de diversos países del mundo, realizados en el INTA EEA Famaillá – PROAPI – Laboratorio de Agroindustrias, en el marco del proyecto “Caracterización físico química de propóleos argentinos y sus extractos”, complementados con una revisión bibliográfica actualizada.

Propóleos de Uruguay

La caracterización organoléptica y fisicoquímica de 5 muestras de Uruguay indica los siguientes resultados:

Tabla 1. Caracterización organoléptica de muestras de Uruguay.

Id.	Color	Olor	Sabor
189	Negro - Marrón	Inodoro	Picante
213	Marrón claro - Tintes castaño rojizo	Resinoso aromático	Picante
214	Marrón claro - Tintes castaño rojizo	Resinoso aromático	Picante
215	Marrón claro - Tintes castaño naranja	Resinoso aromático	Picante
235	Amarillo - Marrón verdoso amarillento	Resinoso aromático	Amargo - Picante

Fuente: INTA-EEA Famaillá – Laboratorio de Agroindustrias

En general presentaron un aspecto de trozos opacos irregulares de consistencia poco blanda. Las principales impurezas visibles fueron: virutas de madera, partes de abejas, restos vegetales, cera obrada y restos de pintura.

Tabla 2. Análisis físico químico de muestras de Uruguay.

Id.	Humedad [%]	Cera [%]	Resinas [%]	Impurezas mecánicas [%]	Cenizas [%]	Fenoles Totales [%]	Flavonoides Totales [%]
189	3,14	45,93	39,74	13,32	4,62	7,84	4,30
213	3,78	21,78	65,57	10,06	1,94	17,80	1,24
214	2,46	18,31	71,97	8,57	2,50	20,99	1,35
215	2,94	21,53	66,35	10,20	1,86	16,27	0,79
235	5,84	36,90	52,28	4,62	1,16	16,77	7,45

Fuente: INTA-EEA Famaillá – Laboratorio de Agroindustrias

El análisis espectrofotométrico en la zona UV mostró curvas similares a la de la Figura 1 con máximos de absorción variando entre 289 y 292 nm.

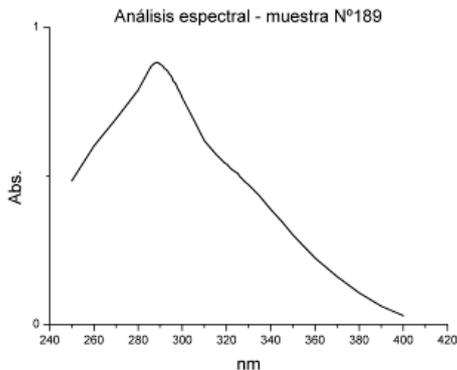


Figura 1. Espectrograma de propóleos de Uruguay

Bonvehí y Coll (1) trabajando con diferentes muestras, identificaron y cuantificaron compuestos fenólicos por HPLC usando detector UV y los resultados se muestran a continuación:

Tabla 3. Compuestos fenólicos en propóleos de Uruguay

	Muestras						promedio
	1	2	3	4	5	6	
Acido cafeico	0,10	0,08	---	0,08	0,11	0,16	0,11
Vainillina	1,18	1,23	1,08	0,95	1,56	1,28	1,21
Acido ferúlico	0,56	0,49	0,78	0,64	0,49	0,58	0,59
Acido sinápico	0,08	0,12	0,34	---	0,08	0,12	0,15
Acido m-cumárico	0,38	0,45	0,64	0,21	0,38	0,54	0,43
Naringenina	---	---	0,09	0,15	---	0,10	0,11
Rutina	2,34	1,89	2,89	3,08	3,21	2,86	2,71
Acido 4-hidroxibenzoico	0,10	0,16	0,26	---	0,08	0,23	0,17
Acido o-cinámico	---	0,08	0,13	---	0,21	0,14	0,14
Quercetina	1,37	1,28	0,96	0,76	1,07	1,38	1,14
Hesperetina	---	0,08	---	---	---	0,10	0,09
Pinobanksina	0,17	0,20	0,19	0,17	0,10	0,23	0,18
Kaempferol	0,48	0,56	0,72	0,39	0,87	1,07	0,68
Apigenina	4,08	3,89	4,56	5,08	4,56	3,89	4,34
Isoramnetina	1,28	2,08	1,65	1,07	1,49	1,22	1,47
Galangina	0,48	0,67	0,72	0,35	0,48	0,29	0,50
Crisina	0,15	0,08	---	0,26	0,08	---	0,14
Acacetina	5,87	4,87	6,28	4,93	5,64	6,08	5,61
Pinocembrina	2,56	1,76	1,45	0,97	2,20	2,43	1,90
Pinostrobrina	0,18	0,08	0,14	0,21	0,10	0,07	0,13
Tectocrisina	0,58	0,72	0,93	1,07	1,13	0,68	0,85
Ramnetina	0,56	0,78	0,35	0,26	0,34	0,19	0,41
TOTAL	22,50	21,55	24,16	20,63	24,18	23,48	22,80

Fuente: referencia (1)

Por otro lado, un grupo de investigadores japoneses (2) aislaron e identificaron 18 flavonoides (incluyendo dos compuestos nuevos), 4 ácidos carboxílicos aromáticos y 11 ésteres de ácidos fenólicos. Los nuevos compuestos fueron aislados e identificados como pinobanksina-3-(2-metil) butirato, pinobanksina-3-isobutirato y 2-metil-2-butenil ferulato.

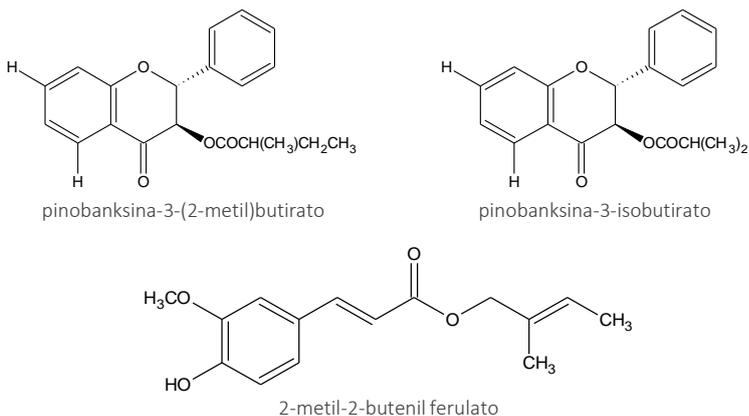


Figura 2. Nuevos compuestos aislados de propóleos uruguayos

Propóleos de Brasil

La caracterización organoléptica y físico química de 7 muestras de propóleos de Brasil se muestra a continuación:

Tabla 4. Caracterización organoléptica de muestras de Brasil.

Id.	Color	Olor	Sabor
101	Negro - Marrón oscuro	Resinoso suave	Insípido
102	Negro - Marrón oscuro	Resinoso suave	Amargo-Picante
103	Marrón claro - Amarillo	Resinoso suave	Insípido
104	Negro - Marrón oscuro	Resinoso suave	Amargo
141	Negro - Marrón oscuro	Resinoso suave	Amargo-Picante
211	Marrón claro-Marrón verdoso/amarillento	Resinoso aromático	Picante
250	Marrón claro- Marrón verdoso amarillento	Resinoso aromático	Picante

Fuente: INTA-EEA Famaillá – Laboratorio de Agroindustrias

El aspecto predominante fue de trozos opacos irregulares de consistencia blanda, semidura y dura. Las principales impurezas visibles fueron: virutas de madera, cera obrada y restos vegetales.

Tabla 5. Análisis físico químico de muestras de Brasil

Id.	Humedad [%]	Cera [%]	Resinas [%]	Impurezas mecánicas [%]	Cenizas [%]	Fenoles Totales [%]	Flavonoides Totales [%]
101	12,75	16,11	44,78	30,69	3,23	17,33	nd
102	5,63	12,15	75,38	12,75	1,54	15,14	nd
103	7,69	27,94	37,99	32,41	3,56	11,40	nd
104	5,87	26,74	39,98	33,95	1,99	12,96	nd
141	8,72	24,74	39,28	30,90	3,66	10,54	2,16
211	4,95	64,12	11,66	20,91	1,89	2,60	0,67
250	9,96	22,41	39,92	27,97	2,63	10,58	3,20

Fuente: INTA-EEA Famaillá – Laboratorio de Agroindustrias

Los espectrogramas obtenidos fueron similares al que se muestra, con una banda de absorción.

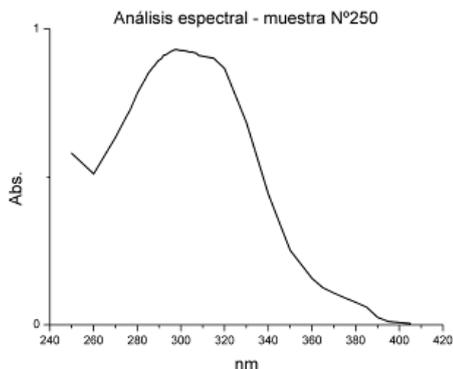


Figura 3. Espectrograma de propóleos Brasileños

Con el objeto de determinar algunas características químicas y biológicas de muestras de propóleos provenientes de la región subtropical de América del Sur, se analizaron muestras provenientes del Sur de Brasil (3), que de acuerdo a trabajos previos posee al menos 5 tipos diferentes de propóleos (4). Se determinaron compuestos fenólicos mediante HPLC, con los siguientes resultados:

Tabla 6. Concentración de compuestos fenólicos

Compuesto	[mg/g] de propóleos
Ácido cumárico	1,2
Ácido ferúlico	1,5
Pinobanksina	37,7
Kaempferol	5,1
Apigenina	7,9
Pinocebrina	22,8
Dimetil dialil ácido cafeico	9,9
Pinobanksina-3-acetato	36,4
Crisina	40,1
Galangina	33,8

Fuente: Referencia (3)

Por otro lado, se estudiaron muestras provenientes de Río de Janeiro y San Pablo (5) mediante la técnica de cromatografía gaseosa de alta temperatura y alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas (HT-HRGC-MS) y se determinaron compuestos polares identificados como: carbohidratos, derivados de ácidos fenólicos y ésteres de alcoholes grasos de cadena larga provenientes de la cera.

Tabla 7. Composición de extractos de propóleos por HT-HRGC-MS. Fuente: Referencia (5)

Compuesto	Muestras					
	A	B	C	D	E	F
Glicerol	2,1					
Ácido 2,3 dihidroxipropanoico	3,1	< 0,5	1,3		< 0,5	< 0,5
Fosfato	< 0,5	2,3	3,1		< 0,5	2,3
Ácido butanodioico		< 0,5	1,4			
Ácido benzenpropanoico	1,8	0,8				
Ácido málico		1,1	3,3		0,9	
Eritriol		< 0,5		< 0,5	< 0,5	1,0
Ácido trihidroxibuitírico (isómero)					< 0,5	
Ácido hidroxibenzoico	< 0,5					
Inositol	1,2		2,3			2,6
Ácido p-cinámico	6,7	3,5				< 0,5
Ácido hexadecanoico		1,2		4,4		
Ácido ferúlico				0,8		
Ácido isoferúlico				1,3		
Ácido octadecanoico				< 0,5		
Escaleno				< 0,5		
Ácido tetracosanoico					2,3	
Hexacosanol					1,0	
Octacosanol					< 0,5	
Ácido octacosanoico					< 0,5	
Triacontanol					< 0,5	
Ácido triacontanoico					< 0,5	
Dotriacontanol					< 0,5	
Ácido dotriacontanoico					< 0,5	

A través de los trabajos del Dr. Matsuno (6) se logró aislar e identificar una sustancia tumoricida que fue caracterizada como ácido 3-[4-hidroxi-3,5-bis(3-metil-2-butenil)fenil]-2-propenoico, denominada también Artepillin C que ha mostrado citotoxicidad preferencial in vitro sobre células tumorales.

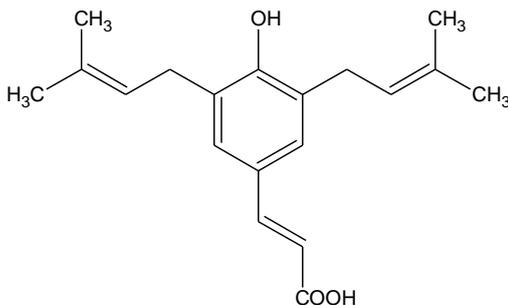


Figura 4. Artepillin C

Posteriormente lograron aislar un derivado benzo- γ -pirano denominado PM-3 con propiedades citotóxicas similares a Artepillin C (7), correspondiente al ácido 3-[2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)benzopirano]-6-propenoico.

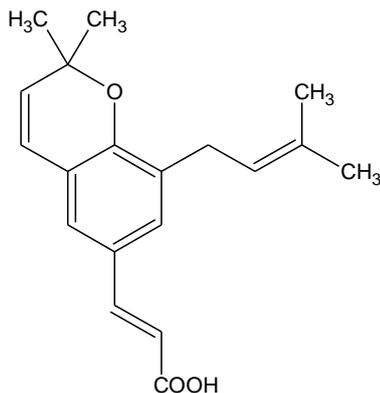


Figura 5. PM-3

Fracccionando extractos etanólicos de propóleos de Brasil, por HPLC (8), se aislaron e identificaron 2 isómeros de diterpenoides de fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_3$ que también poseen citotoxicidad preferencial sobre células tumorales. La elucidación de las estructuras permitió determinar que son isómeros de diterpenoides clerodane.

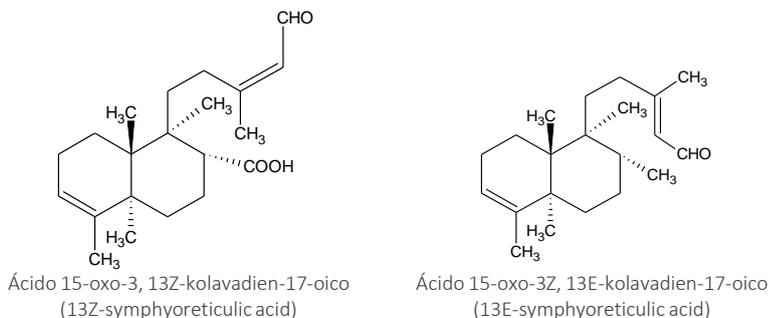


Figura 6. Isómeros de diterpenoides aislados de propóleos de Brasil

Propóleos de El Salvador

Se determinaron las características organolépticas y fisicoquímicas de 5 muestras obtenidas mediante el método de raspado. La flora predominante reportada en las zonas de recolección fue: Campanilla, Mango (*Mangifera indica*), Marañón, Eucaliptos (*Eucalyptus globulus*), Flor Amarilla, Morro (*Crescentia alata*), Conacaste (*Enterolobium cyclocarpum*), Pepeto (*Inga vera*) y Bálsamo (*Myroxylon balsamun*).

Tabla 8. Caracterización organoléptica de muestras de El Salvador

Id.	Color	Olor	Sabor
167	Negro - Marrón	Inodoro	Insípido
187	Negro - Marrón oscuro	Resinoso	Amargo
190	Negro - Marrón oscuro	Resinoso suave	Amargo
217	Negro - Marrón oscuro	Resinoso	Insípido
218	Negro	Resinoso suave	Insípido

Fuente: INTA-EEA Famaillá – Laboratorio de Agroindustrias

El aspecto principal fue el de trozos y masas irregulares con y sin brillo, de consistencia blanda, en tanto que las principales impurezas visibles fueron: virutas de madera, partes de abejas, cera obrada y restos vegetales.

Tabla 9. Análisis fisicoquímico de muestras de El Salvador

Id.	Humedad [%]	Cera [%]	Resinas [%]	Impurezas mecánicas [%]	Cenizas [%]	Fenoles Totales [%]	Flavonoides Totales [%]
167	2,22	65,54	12,89	21,19	1,48	0,86	0,15
187	6,67	62,79	6,17	24,77	3,69	0,66	0,22
190	4,65	67,51	7,66	18,46	3,47	1,57	0,21
217	5,67	67,36	6,40	21,47	3,39	1,38	0,10
218	4,01	44,09	32,31	21,93	3,68	5,87	0,21

Fuente: INTA-EEA Famaillá – Laboratorio de Agroindustrias

Si bien se observa que todos los casos se obtuvo un elevado contenido de cera e impurezas mecánicas y en consecuencia un bajo tenor de resinas, fenoles totales y flavonoides totales e índices de oxidación superiores a 120 segundos, esta característica no puede generalizarse al resto de los propóleos de El Salvador sin analizar un mayor número de muestras.

Los espectrogramas en el UV mostraron perfiles similares al de la Figura 7, con máximos de absorción variando entre 273 y 280 nm.

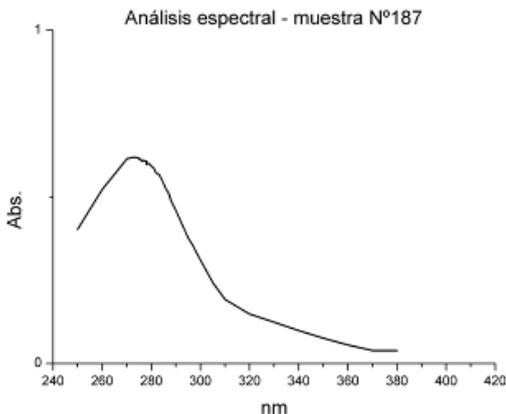


Figura7. Espectrograma de propóleos de El Salvador.

Propóleos de Honduras

La primera aproximación a las características fisicoquímicas del propóleos de Honduras se efectuó a partir del análisis de 12 muestras recolectadas de colmenas provistas de mallas plásticas en la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), ubicada al suroeste de Honduras, donde existe una vegetación variada y clima subtropical, con dos estaciones marcadas: verano (estación seca de noviembre a abril) e invierno (estación húmeda de mayo a octubre). (9)

La vegetación predominante en la zona de los apiarios fue: Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*), Ocote (*Pinus patula*), Araucaria (*Araucaria araucana*), Guanacaste (*Enterolobium cyclocarpum*), Guayacán (*Guaiacum officinale*), Acacia amarilla (*Acacia Xanthophloea*), Bursera (*Bursera cuneata*), Carreto (*Aspidosperma dugandii*) y Teca (*Tectona grandis*).

Tabla 10. Análisis físico químico de muestras de Honduras (valor medio \pm σ)

	Localidades donde se ubicaron los apiarios		
	EAP	Monte Redondo	Pantanal
Humedad [%]	4,89 \pm 0,65	7,59 \pm 3,20	8,10 \pm 1,08
Ceras [%]	29,65 \pm 3,3	63,54 \pm 13,70	38,36 \pm 24,84
Resinas [%]	42,59 \pm 5,12	13,42 \pm 9,60	35,14 \pm 18,7
Cenizas [%]	1,66 \pm 0,12	2,11 \pm 0,52	2,24 \pm 0,34
Índice de Oxidación [s]	1,48 \pm 0,33	40,66 \pm 48,00	3,48 \pm 4,36
Impurezas Mecánicas [%]	23,24 \pm 3,2	14,34 \pm 2,90	21,81 \pm 7,02
Fenoles Totales [%]	7,62 \pm 1,85	2,59 \pm 2,35	7,29 \pm 4,62
Flavonoides totales [%]	5,13 \pm 1,81	1,74 \pm 1,73	5,11 \pm 3,37

Fuente: INTA-EEA Famaillá – Laboratorio de Agroindustrias

Una particularidad de éstos propóleos es la de contar con una alta relación entre flavonoides y fenoles (>50%) a pesar de las variaciones en su contenido total.

Mediante un análisis estadístico se determinó que se presentaron diferencias significativas entre apiarios, a pesar de encontrarse a aproximadamente 2 km de distancia. Esto indica la variación que puede existir entre muestras y la necesidad de evaluar los propóleos a pesar de la similitud de ciertas condiciones (clima, genética, tipo de colmenas, manejo), ya que existen cambios en el contenido y esto se debe principalmente a la vegetación. (9)

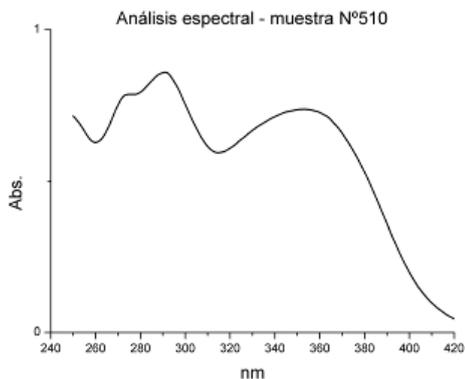


Figura 8. Espectrograma de propóleos de Honduras.

Propóleos de Guatemala

Una primera aproximación de las características de los propóleos de éste país se puede obtener a partir de los resultados de los análisis efectuados sobre 4 muestras .

Tabla 11. Características organolépticas de propóleos de Guatemala

Id.	Color	Olor	Sabor
270	Negro - Marrón oscuro	Resinoso suave	Insípido
271	Negro - Marrón oscuro	Resinoso suave	Amargo
276	Negro	Resinoso	Insípido
277	Negro	Resinoso	Insípido

Fuente: INTA-EEA Famaillá – Laboratorio de Agroindustrias

El aspecto predominante fue el de masas irregulares con brillo, consistencia blanda. Las principales impurezas visibles determinadas fueron: virutas de madera, partes de abejas y restos vegetales.

Tabla 12. Análisis físico químico de muestras de Guatemala.

Id.	Humedad [%]	Cera [%]	Resinas [%]	Impurezas mecánicas [%]	Cenizas [%]	Fenoles Totales [%]	Flavonoides Totales [%]
270	7,05	61,17	9,47	27,29	3,28	0,21	0,11
271	5,21	58,32	7,24	30,25	5,48	0,27	0,06
276	6,84	68,40	7,15	18,65	2,58	1,53	0,03
277	6,79	66,46	6,59	23,26	2,98	0,23	0,03

Fuente: INTA-EEA Famaillá – Laboratorio de Agroindustrias

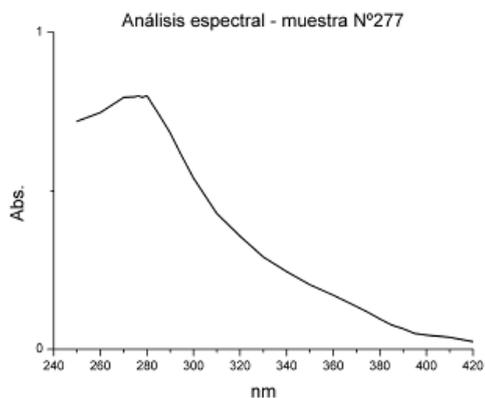


Figura 9. Espectrograma de propóleos de Guatemala.

Propóleos de las Islas Canarias

Buscando investigar la composición química de propóleos provenientes de zonas tropicales diferentes de las de Sudamérica y en las que no se encuentren álamos, Bankova y col. (10) analizaron 2 muestras provenientes de la Isla Gran Canaria mediante las técnicas de TLC y GC-MS aplicadas sobre extractos etanólicos preparados con las muestras, encontrando que ambas son similares desde el punto de vista de la composición química, pero difiriendo cuantitativamente.

Se identificaron carbohidratos, polioles y compuestos fenólicos, además de algunos compuestos reportados por primera vez, entre los que se encuentran: episesamina y metil xantoxilol, que son lignanos del tipo furofurano (2,6-diaril-3,7-dioxabicyclo[3,3,0] octanos) y que podrían ayudar a dilucidar el origen botánico de las muestras. A continuación se indican los resultados obtenidos:

Tabla 13. Composición química aproximada, expresada en % de los extractos etanólicos

Compuesto	Muestra 1	Muestra 2
<i>Ácidos</i>		
Palmítico	0,9	0,5
Estearico	0,1	0,1
Oleico	1,1	1,0
Metilmalónico (*)	< 0,1	< 0,1
Láctico	0,3	0,3
Málico	0,2	0,1
Dimetioxibenzoico	0,1	---
Fosfórico	1,5	0,9
<i>Azúcares</i>		
D-ribofuranosa	0,5	0,1
D-xilopiranososa	0,2	0,1
D-manopiranososa	13,0	2,0
D-sorbopiranososa	9,5	2,1
D-galactosa	1,2	0,4
D-fructosa	5,6	1,7
b-D-glucopiranososa	10,4	2,0
Sacarosa	1,6	0,7
Lactosa (*)	0,5	---
Maltosa (*)	2,4	0,3
Melibiosa (*)	0,5	0,2
<i>Polioles y ácidos</i>		
Eritriol (*)	0,1	0,1
Xilitol (*)	0,1	< 0,1
Inositol (*)	0,2	0,1
Mio inositol (*)	0,1	0,1
Ácido eritrárico (*)	0,1	---
Ácido 2-deoxieritropentárico (*)	0,1	0,1
Ácido tetrónico (*)	< 0,1	---
Ácido glucurónico (*)	0,3	0,1
<i>Ligananos</i>		
Episesamina (*)	2,0	7,4
Metil xantoxilol (*)	3,1	13,5
Otros ácidos diterpénicos	0,1	0,1

(*) la corriente de iones generada depende del compuesto y no es una verdadera cuantificación.

Fuente: Referencia (10)

Adicionalmente analizaron la composición química de la fracción volátil obtenida por destilación por arrastre de vapor y recolección del destilado sobre una mezcla de n-pentano y éter.

Tabla 14. Composición química aproximada, expresada en % de la fracción volátil

Compuesto	Muestra 1	Muestra 2
<i>Ácidos y ésteres</i>		
Acido mirístico	1,3	0,7
Acido cinámico	3,6	0,5
Palmitato de metilo (*)	0,7	0,4
Palmitato de etilo	4,3	1,1
Oleato de etilo	6,5	2,5
Benzoato de bencilo	0,7	1,2
Dihidrocinnamato de etilo	0,3	0,2
<i>Aldehídos</i>		
Benzaldehído	0,4	0,2
Piperonal (*)	0,4	0,2
<i>Monoterpenos</i>		
Linalil propionato (*)	---	0,5
Geraniol (*)	---	0,2
<i>Sesquiterpenos</i>		
Nerolidol	3,2	11,0
δ -cadineno	0,9	2,5
α -muroleno	0,7	0,9
α -calakoreno	0,5	0,7
T-murolol	1,2	2,2
β -selineno	0,2	0,8
Germacreno d (*)	0,2	0,5
α -copeno	0,5	0,2
Ledeno	1,5	1,3
Aromadendreno	0,3	2,8
Ledol	1,6	3,8
Espatuleno	3,2	8,4
Isoespatuleno (*)	1,2	0,8
Palustrol	0,2	0,8
β -cayofileno	2,4	1,7
α -humuleno	0,2	1,1
<i>Hidrocarburos alifáticos</i>		
<i>Hidrocarburos aromáticos</i>		

(*) la corriente de iones generada depende del compuesto y no es una verdadera cuantificación.

Fuente: Referencia (10)

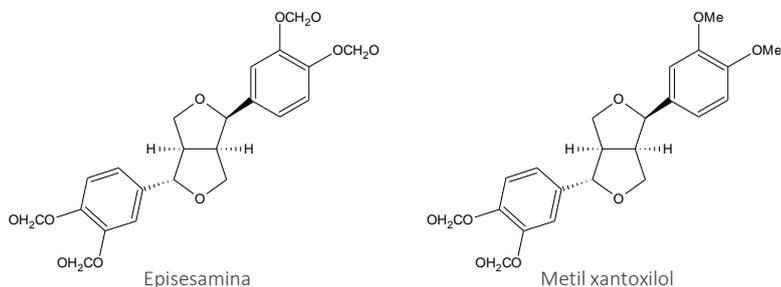


Figura10. Lignanos identificados en propóleos de Islas Canarias

Propóleos de Israel, Reino Unido y Estados Unidos

Trabajos realizados en la Universidad de Oxford (11), analizando propóleos de los países mencionados y comparándolos con la composición de exudados de plantas, determinaron solamente compuestos característicos de álamos, junto a cantidades variables de cera y azúcares que agregaron las abejas. Según los autores, en algunos casos es posible relacionar directamente la composición de la fracción balsámica de los propóleos con la de los exudados de una determinada especie o clon de álamo. Los compuestos identificados mediante GC-MS se indican en la Tabla a continuación:

Tabla 15. Compuestos identificados en propóleos por GC-MS

Nombre común	Origen	Nombre común	Origen
		Acetato de isopentilol	2
<i>Aminoácidos</i>		Acetato de isopentenilo	2
Acido piroglutámico	1	Acido palmítico	1
		Acido cerótico	1
<i>Acidos alifáticos y sus ésteres</i>		Acido montanito	1
Acido butírico	2	Acido esteárico	1
Acido 2 metil butírico	2	Acido oleico	1
Acido succínico	1	Acido linoleico	1
Acido protónico	2	Acido isobutírico	2
Acido angélico	2	Acido mirístico	1
Acido fumárico	1	Acido lignocérico	1
Acido docosanoico)	1		
Acido acético	2	<i>Acidos aromáticos y sus ésteres</i>	
Acetato de bencilo	2	Acido benzoico	1
Acetato de isobutilo	2	Benzoato de bencilo	1

Nombre común	Origen	Nombre común	Origen
Acido protocatéquico	1	α -glicerofosfato	1
Acido verátrico	1	Glicerol	1
Benzoato de etilo	1	Alcohol cinámico	1
Salicilato de metilo	2		
Salicilato de bencilo	1	<i>Aldehídos</i>	
Acido p-hidroxi benzoico	1	Benzaldehído	2
Acido vainilínico	1	Aldehído protocatéquico	1
Acido p-anísico	1	p-hidroxi benzaldehído	1
Benzoato de metilo	2	Vainillina	1
Benzoato de cinamoílo	1	Isovainillina	1
Acido hidroxicinámico	1	Aldehído caproico	2
Acido cinámico	1	2 Hexanal	2
Acido cafeico	1		
Cafeato de bencilo	1	<i>Chalconas</i>	
2 metil 2 butenil cafeato	1	Alpinetin chalcona	1
Prenil cafeato	1	Pinostrobin chalcona	1
3 metil 3 butenil cafeato	1	2',6', 7'-trihidroxi-4'-metoxi chalcona	1
Cafeato de cinamilo	1	Pinocembrin chalcona	1
Feniletil cafeato	1	Pinobaksin-3-acetato chalcona	1
Acido 3,4 dimetoxicinámico	1	Naringenin chalcona	3
3,4 dimetoxi cinamato de bencilo	1	Pinobanksin chalcona	1
Acido cumárico	1	Sakuretin chalcona	3
Cumarato de bencilo	1		
Prenil cumarato	1	<i>Dihidrochalconas</i>	
3 metil 3 butenil cumarato	1	2',6'-dihidroxi-4'-metoxi dihidrochalcona	1
Feniletil cumarato	1	2',4',6'-trihidroxi dihidrochalcona	3
Cumarato de cinamilo	1		
Acido isoferúlico	1	<i>Flavanonas</i>	
Isoferulato de bencilo	1	Pinostrobin	3
Isoferulato de 2 metil 2 butenil	1	Pinocembrina	1
Prenil isoferulato	3	Pinobanksina-3-acetato	1
3 metil 3 butenil Isoferulato	1	Pinobanksina-3-burtrato	3
Fenil etil isoferulato	1	Pinobanksina-3-hexanoato	3
Isoferulato de cinamilo	1	Pinobanksin-3-metil éter	3
Acido ferúlico	1	Pinobanksin-3-pentanoato	3
Ferulato de bencilo	1	Pinobanksin-3-pentenoato	4
Prenil ferulato	1	Pinobanksin-3-propanoato	3
3 metil 3 butenil ferulato	1	Sakuretina	3
Acido 4 metoxicinámico	1	Pinobanksina	1
		Naringenina	3
<i>Alcoholes</i>			
Hidroquinona	1		
Alcohol bencílico	1	<i>Flavonas</i>	
Alcohol prenílico	2	Tectocrisina	1
Isobutenol	2	Kaempferol-7-4'-dimetil éter	4
Alcohol Fenil etílico	1	Crisina	1
β -glicerofosfato	1	Galangina-3-metil éter	1

Nombre común	Origen	Nombre común	Origen
Apigenina-7-metil éter	4	<i>Cetonas</i>	
Galangina	1	Acetofenona	2
Kaempferol-4'-metil éter	4	p-acetofenol	1
Kaempferol-7-metil éter	1	<i>Terpenoides y otros compuestos</i>	
Apigenina	1	Cimeno	2
Kaempferol-3-metil éter	1	Limoneno	2
Quercetina-3,7-dimetil éter	3	α -copeno	2
Kaempferol	1	Estireno	2
Fisetina	4	1,8 Cineol	2
Rhamnetina	1	Naftaleno	2
Quercetina	3	Alcohol sesquiterpénico	1

Referencias:

1. Propóleos del Reino Unido
2. Compuestos volátiles
3. Propóleos de Rehoboth (Israel)
4. Propóleos del desierto de Sonora (USA)

Los principales grupos de componentes determinados fueron:

Aminoácidos: solamente identificaron el ácido piroglutámico. Si bien la técnica utilizada (GC-MS) no es la más indicada para pequeñas cantidades de aminoácidos, estos compuestos se encuentran en cantidades muy bajas. Por otra parte, no detectaron aminoácidos en los exudados de las plantas de origen, lo cual sugiere que las trazas encontradas provienen de las abejas.

Ácidos alifáticos y sus ésteres: los ácidos de cadena larga probablemente se originan en la cera pues no se encontraron en los exudados de las plantas. Por otra parte, suponen que los ácidos volátiles de cadena corta y sus ésteres provienen en su mayoría de los exudados de álamos.

Ácidos aromáticos y sus ésteres: se originan en los exudados de álamos y muchos de los ácidos y sus ésteres han mostrado poseer propiedades antibacterianas *in vitro*, aunque algunos actúan como alergénicos, como por ejemplo el prenil cafeato.

Alcoholes: probablemente tanto el α y como el β glicerofosfato derivan del metabolismo de la abeja, el glicerol de la cera de abeja y los otros componentes de los exudados de álamo.

Aldehídos: los que se han reportado provienen de los exudados, pero es muy probable que otros aldehídos, como aldehído cinámico, estén presentes y no hayan sido detectados por una limitación del método de análisis utilizado.

Chalconas: están relacionadas con las flavanonas y pueden ser que se formen durante la elaboración del propóleo y durante la preparación de las muestras para el análisis, sin embargo no se puede asegurar que las detectadas se encuentran naturalmente en el propóleo.

Dihidrochalconas: Están relacionadas estructuralmente con las chalconas. Son características de los bálsamos de álamo (sección Tacamahaca) y raramente las encontraron en las muestras de propóleos analizadas, sugiriendo que los bálsamos de álamo de esa sección no son seleccionados por las abejas como fuentes de exudados.

Flavonas: estos compuestos son frecuentemente identificados a través de cromatografía en papel o TLC y muchos de ellos se encuentran en el propóleo, sin embargo usando GC-MS las polihidroflavonas, como kaempferol y quercetina no pueden ser cuantificadas con exactitud y por lo tanto se pueden obtener resultados erróneos.

Hidrocarburos: en los exudados de álamo son muy comunes los hidrocarburos de C₂₅ a C₂₇ pero es probable que en el propóleo estos compuestos son derivados tanto del metabolismo de la abeja como de los exudados de álamo. Los hidrocarburos no han sido asociados con ninguna de las actividades biológicas reportadas para el propóleo.

Terpenoides y otros compuestos: pudieron identificar los terpenoides de menor peso molecular (C₁₀) con precisión pero los sesquiterpenoles de mayor peso molecular (C₁₅) son extremadamente difíciles principalmente debido a que poseen una estructura muy similar. Los terpenoides volátiles de C₁₀, como por ejemplo limoneno tienen un fuerte olor y este grupo de compuestos pueden ser los responsables de gran parte del olor de los propóleos.

Los azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa están frecuentemente presentes en el propóleo pero se sospecha que su presencia se debe a la contaminación con miel. También se han reportado un gran número de esteroides ya sea en el propóleo o en los exudados de álamos.

Propóleos de Croacia.

Mediante dos métodos espectrométricos se analizaron 20 muestras provenientes del norte de Croacia (12), cuantificándose flavonas y flavonoles (usando AlCl_3) como quercetina equivalente y flavanonas (usando 2,4 dinitrofenilhidrazina) expresadas como su equivalente en naringenina. Los resultados obtenidos indican muy poca variabilidad en el contenido de flavonas y flavonoles, en tanto que el de flavanonas fue muy variable.

Tabla 16. Contenido de flavonoides en propóleos de Croacia

Flavonas y flavonoles	Flavanonas
2,2 ± 0,3	20,72 ± 0,1
2,2 ± 0,1	15,1 ± 0,2
2,3 ± 0,4	13,8 ± 0,2
2,2 ± 0,4	10,3 ± 0,1
2,2 ± 0,1	20,6 ± 0,1
2,2 ± 0,2	20,3 ± 0,1
2,3 ± 0,2	12,4 ± 0,1
2,2 ± 0,2	23,8 ± 0,1
2,1 ± 0,1	22,2 ± 0,1
2,3 ± 0,1	13,1 ± 0,1
2,2 ± 0,3	19,4 ± 0,2
2,0 ± 0,4	11,6 ± 0,1
2,1 ± 0,1	14,4 ± 0,1
2,3 ± 0,2	20,6 ± 0,1
2,3 ± 0,4	17,8 ± 0,1
2,3 ± 0,2	17,9 ± 0,1
1,3 ± 0,3	3,9 ± 0,3
2,0 ± 0,2	13,1 ± 0,2
2,1 ± 0,2	17,8 ± 0,2
nd	10,6 ± 0,1

Nd: no detectado

Fuente: Referencia (12)

Propóleos de Turquía

Popova, Silici, Kaftanglu y Bankova (13) determinaron el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides que se indica a continuación:

Tabla 17. Porcentaje de los principales compuestos biológicamente activos en propóleos de Turquía

Nº-Procedencia	Fenoles totales (*)	Flavonoides	
		Flavonas – flavonoles (**)	Flavanonas – dihidroflavanonas (***)
1 – Yozgat	26,4	8,7	6,0
2 – Izmir	30,4	9,6	5,5
3 – Kayseri	27,5	5,6	4,8
4 – Adana	8,2	1,5	2,7
5 – Erzurum	10,5	2,0	1,5
6 – Artvin	14,5	2,0	3,0

(*) Utilizando reactivo de Folin-Ciocalteu y como referencia una mezcla estándar de pinocembrina-galangina (2:1). (**) Método espectrofotométrico por acomplejación con AlCl₃ en medio metabólico, usando galangina como referencia. (***) Método espectrofotométrico usando pinocembrina como referencia. Fuente: Referencia (13)

Mediante GC–MS aplicada sobre extractos etanólicos preparados con las muestras se determinaron los compuestos típicos de estos propóleos, encontrándose que las muestras contienen:

Flavonoides agliconas típicos de los álamos: pinocembrina, pinobanksina, pinobanksina 3-acetato, crisina y galangina.

Ácidos fenólicos: p-cumárico, ferúlico, cafeico.

Ésteres: pentenil cafeato, y los bencílicos y fenetílicos del ácido cafeico, ferúlico y p-cumárico, además de cinamil cinamato.

Ácidos diterpénicos: abiético, isopimárico.

Ácidos grasos hidroxilados: hidroxipalmítico, hidroxiesteárico.

Glicéridos fenólicos: ésteres gliceril, monoacetilglicerilos y diacetilglicerilos de los ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, además de 1,3 di-p-cumaril-2-acetil glicerol; 1,3 diferulil-2-acetil glicerol, 1-p-cumaril-3-ferulil-2-acetil-glicerol y 1-p-cumaril-3-cafeil-2-acetil-glicerol.

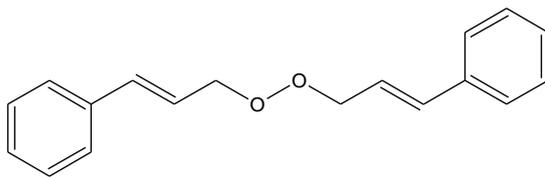


Figura 11. Estructura de cinamil cinamato

Trabajos previos realizados en la Universidad de Hacettepe (14), identificaron y cuantificaron mediante GC-MS, los principales componentes en muestras de propóleos recolectadas en diferentes regiones de Turquía (Bursa, Erzurum- Aşkale, Gümüşhane- Söğütağil and Trabzon- Çağlayan)

Tabla 18. Composición % de propóleos de la región de Bursa

Compuesto	Muestra I	Muestra II	Muestra III
Alcoholes	4,40	1,71	6,34
Ácidos alifáticos	2,75	2,22	6,41
Aminoácidos	mb	mb	mb
Esteres de ácidos aromáticos	mb	13,14	3,10
Ácidos aromáticos	7,54	1,52	18,15
Aldehídos aromáticos	3,91	---	1,86
Flavonas	47,40	31,8	37,55
Cetonas	11,20	24,74	6,95
Otros	20,88	20,87	10,09
Terpenoides	1,92	4,50	7,70
Vitamina A	---	---	1,84

Mb: muy bajo. Fuente: Referencia (14)

En esta zona, la flora consiste de especies nativas tipo Euro Siberiana y para el caso de la muestra II, la misma se obtuvo de lugares con abundancia de *Castanea sativa*.

Tabla 19. Composición % de propóleos de las regiones de Erzurum, Gümüşhane y Trabzon.

Compuesto	Erzurum	Gümüşhane	Trabzon
Alcoholes	21,73	11,30	15,03
Ácidos alifáticos	1,96	0,98	3,1
Aminoácidos	4,46	---	---
Esteres de ácidos aromáticos	31,86	5,52	5,12
Ácidos aromáticos	1,32	2,18	3,35
Flavanonas	4,72	50,55	43,55
Cetonas	8,19	11,11	21,30
Otros	22,45	14,36	8,82
Terpenoides	3,31	mb	mb

Mb: muy bajo. Fuente: Referencia (14)

La flora correspondiente a las zonas de Gümüşhane y Trabzon se corresponde también con las del tipo Euro Siberiana en tanto que Erzurum presenta una flora de estepa (*Astragalus spp.*) y algunas especies de las familias *Fabaceae* y *Asteraceae*.

Propóleos de China

Bonvehí y Coll (1) determinaron los perfiles de composición que se muestran en las Tablas 20 y 21. Las muestras se homogeneizaron y pulverizaron antes de ser analizadas por triplicado de acuerdo a la siguiente metodología analítica: humedad por desecación a 105 °C, cenizas por calcinación a 500-550 °C; ceras por extracción con éter de petróleo; resinas y bálsamos por extracción con metanol; compuestos fenólicos por espectrofotometría utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu y el índice de oxidación por decoloración de una solución de KMnO_4 en medio ácido.

Tabla 20. Análisis físicoquímico de propóleos de China

	Ceras	Resinas y bálsamos	Compuestos fenólicos	Humedad	Aceites esenciales	Cenizas
	15,1	76,9	22,5	2,1	1,28	3,18
	16,2	73,4	21,8	2,5	0,81	2,78
	17,8	73,7	20,7	2,2	1,17	3,22
	19,4	72,8	20,5	2	0,77	2,76
	15,1	77,6	21,6	2,1	0,91	2,60
	16,3	75,6	20,7	2,7	1,05	2,87
	12,3	79,5	23,7	2,6	0,57	3,10
	13,7	78,6	22,8	2,8	0,69	3,25
	13,2	78,9	21,6	2,6	0,74	2,93
Promedio	15,5	76,3	21,8	2,4	0,89	2,97

Los valores se expresan en g/100 g de propóleos, salvo el índice de oxidación que se expresa en segundos. Fuente: Referencia (4)

La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se realizó por HPLC usando detector UV y los resultados se muestran a continuación:

Tabla 21. Compuestos fenólicos en propóleos de China

	Muestras									
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	promedio
Acido cafeico	0,07	0,10	---	0,09	---	---	---	0,11	0,07	0,09
Vainillina	1,38	1,50	1,07	1,19	1,69	1,71	1,19	1,53	1,89	1,46
Acido ferúlico	0,84	0,68	0,77	0,38	0,49	1,08	0,59	0,82	0,38	0,67
Acido sinápico	0,32	0,29	0,16	0,31	0,22	---	0,14	0,22	0,17	0,23
Acido m-cumárico	0,48	0,73	0,28	0,18	0,54	0,76	0,48	0,28	0,72	0,49
Naringenina	0,07	0,22	0,29	0,17	0,10	0,36	0,42	0,31	0,23	0,24
Rutina	2,37	3,23	3,67	3,26	2,97	2,78	3,47	3,09	3,78	3,18
Acido 4-hidroxibenzoico	0,31	0,28	0,16	---	0,28	0,41	0,07	0,38	0,28	0,27
Acido o-cinámico	0,09	0,10	---	0,25	0,38	0,07	0,16	0,11	0,27	0,18
Quercetina	0,81	0,73	1,21	1,67	0,82	0,69	0,58	0,70	1,28	0,94
Hesperetina	0,17	0,07	0,21	---	---	0,08	0,11	0,18	---	0,14
Pinobanksina	0,18	0,29	0,18	0,16	0,08	0,23	0,18	0,28	0,20	0,20
Kaempferol	0,57	0,49	0,83	0,39	1,07	0,58	0,39	0,67	0,28	0,59
Apigenina	4,89	5,34	3,08	3,89	4,56	4,29	5,29	3,87	3,56	4,31
Isoramnetina	2,45	1,98	2,39	1,78	1,78	1,49	2,07	1,64	1,39	1,89
Galangina	0,78	0,44	0,39	0,51	0,63	0,33	0,52	0,67	0,89	0,57
Crisina	0,17	0,10	---	0,07	0,18	0,11	0,07	---	0,17	0,12
Acacetina	4,97	3,78	4,56	4,39	5,45	4,78	6,34	5,81	4,45	4,95
Pinocembrina	1,56	1,39	1,16	1,38	0,79	1,63	1,82	1,16	0,84	1,30
Pinostrobinina	---	0,28	0,17	0,14	0,07	---	0,10	0,17	0,14	0,15
Tectocrisina	0,94	0,71	0,59	1,23	0,84	0,69	0,52	1,41	0,45	0,82
Ramnetina	0,08	0,21	0,42	0,08	---	0,22	0,14	1,07	0,67	0,36
TOTAL	23,43	22,94	21,59	21,52	22,94	22,29	24,65	24,48	22,11	23,15

Fuente: Referencia (1)

Propóleos de Nueva Zelanda

Nueva Zelanda posee una flora única como consecuencia de su gran aislamiento geográfico y de las especies introducidas. En los propóleos de ese origen que se analizaron (15), se determinó que pinocembrina y pinobanksina-3-acetato son los principales flavonoides. Además no se observaron variaciones significativas entre regiones, probablemente debido al aislamiento. Cualitativamente, se puede decir que los flavonoides encontrados en propóleos de Nueva Zelanda son similares a los de los correspondientes a zonas templadas de Europa y Norte América, por lo que se puede inferir que se originarían a partir de vegetación introducida (por ejemplo álamos), sin embargo no se pueden descartar los probables aportes de las especies nativas sin posteriores investigaciones.

Los dihidroflavonoides basados en pinobanksina y pinocembrina representaron aproximadamente el 70 % de los flavonoides en las muestras analizadas y esto parece ser una característica de los propóleos de Nueva Zelanda. En las Tablas a continuación se indican los resultados obtenidos, analizando tinturas preparadas con las muestras de propóleos.

Tabla 22. Concentración (mg/ml) de flavonoides y otros compuestos determinados por HPLC en tinturas de Nueva Zelanda

	Sólidos disueltos expresados en % (m/m) de tinturas							
	22,5	19,9	17,0	20,9	18,7	20,5	16,7	19,3
Acido cinámico	p	p	p	p	p	p	p	p
Pinobanksina	3,8	3,2	3,5	3,0	3,4	3,2	3,6	2,2
Pinocembrina	10,8	8,9	8,1	11,2	9,1	8,8	9,0	6,7
Pinobanksina-3-acetato	9,4	7,5	7,2	7,2	7,7	8,0	6,3	8,7
Acido 1,1-dimetil alil cafeico	p	p	p	p	p	p	p	p
Crisina	5,0	4,8	4,3	3,9	4,9	4,3	4,3	4,1
Galangina	3,8	3,8	3,2	2,8	3,6	3,5	3,3	2,8
Pinocebrina 7-metil éter	2,0	1,9	2,0	1,8	1,9	1,9	1,5	2,0
Crisina 7-metil éter	0,6	0,7	0,6	0,4	0,7	0,4	0,4	0,7
Galangina 7-metil éter	0,4	0,4	0,4	0,3	0,5	0,4	0,2	0,4
Flavonoides totales	35,8	31,2	29,3	30,6	31,8	30,5	28,6	27,6

p: indica que el compuesto está presente pero no se ha cuantificado. Fuente: Referencia (15)

Tabla 23. Concentración (mg/ml) de compuestos aromáticos y alifáticos identificados en tinturas de propóleos por GC-MS

	Sólidos disueltos expresados en % (m/m) de tinturas							
	22,5	19,9	17	20,9	18,7	20,5	16,7	19,3
<i>Compuestos aromáticos</i>								
Estireno	0,05	0,04	0,08	0,03	0,04	0,02	0,03	nd
Alcohol bencílico	0,04	0,06	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,02
Acido benzoico	0,63	0,45	0,25	0,20	0,35	0,42	0,17	0,37
2-Feniletanol	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01
Acido 3-fenilpropanoico	0,21	0,14	0,10	0,22	0,10	0,14	0,06	0,13
Etil 3-Fenilpropanoato	0,06	3,05	0,03	0,09	0,06	0,04	0,30	0,03
Acido cinámico	2,72	2,00	1,40	3,89	2,15	2,19	0,91	1,90
Vainillina	nd	0,05	0,03	0,03	0,05	0,05	0,03	0,04
Cinamato de etilo	0,06	0,05	0,05	0,10	0,08	0,04	0,07	0,04
Acido 5-fenil-trans-3-pentónico	0,12	0,22	0,12	0,19	0,17	0,17	0,09	0,14
5-fenil-trans-3-pentenoato de etilo	0,06	0,15	0,07	0,09	0,11	0,10	0,06	0,05
Acido vainillínico	0,01	0,05	0,40	0,03	0,05	0,03	0,05	0,02
Acido p-cumárico	0,08	0,33	0,18	0,16	0,20	0,23	0,13	0,24
Acido 5-fenil-trans-trans-2,4-pentadienoico	0,27	0,55	0,40	0,45	0,49	0,54	0,36	0,44
Acido ferúlico	nd	0,03	0,12	0,22	0,19	0,20	0,13	0,15
Ferulato de etilo	0,39	1,05	0,77	0,95	0,85	0,80	0,58	0,74
Ferulato de 3-metilbut-2-enil	0,12	0,58	0,39	0,60	0,46	0,39	0,25	0,39
Ferulato de 3-metilbut-3-enil	0,05	0,36	0,23	0,24	0,02	0,20	0,15	0,20
Total de compuestos aromáticos	4,90	6,18	4,30	7,53	5,43	5,62	3,17	4,91
<i>Ácidos grasos</i>								
Acido mirístico	nd	nd	0,01	nd	nd	0,01	nd	0,01
Miristato de etilo	nd	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Acido palmítico	0,04	0,06	0,09	0,06	0,06	0,08	0,08	0,60
Palmitato de etilo	0,07	0,10	0,15	0,10	0,13	0,10	0,16	0,07
Acido Linoleico	nd	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03
Acido Oleico	0,05	0,12	0,15	0,10	0,11	0,13	0,11	0,09
Acido Esteárico	tr	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
Linoleato de etilo	0,01	0,04	0,03	0,04	0,05	0,03	0,05	0,02
Oleato de etilo	0,07	0,15	0,25	0,15	0,23	0,13	0,21	0,09
Estearato de etilo	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01
Total de ácidos grasos	0,25	0,55	0,77	0,54	0,67	0,57	0,68	0,40

nd: no detectado. Tr: traza (<0,005 mg/mL). Fuente: Referencia (15)

PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL PROPÓLEOS

¿Medicina Natural vs. Medicina Convencional?

En los Congresos y publicaciones apícolas se presentan muchos informes que exponen sobre la bondades de los productos de la colmena, a pesar de ello es poco lo que se informa en los ambientes médicos. En los últimos años, debido a los avances de la Medicina Preventiva, se otorga mayor importancia a la ingesta de productos naturales y se promueve su consumo. De este modo la Apiterapia, que se puede considerar como parte de la Fitoterapia, así como otras llamadas "Medicinas "Naturales" viene ganando espacios dentro de la "Medicina Convencional".

En 1998 Archives of Internal Medicine, publicación de la American Medical Association, dedicó un número al fenómeno de las llamadas "Medicinas Alternativas" (16). Allí se expresa que encuestas realizadas en EE.UU. señalan que el 34 % de la población usa al menos una forma de medicina no convencional, y se estima que se gastan alrededor de U\$S 13.700 millones anuales en "medicinas de alternativa". El editor realiza la siguiente pregunta: "¿cuál es la razón para que exista esta desconexión entre ambas medicinas?" y luego expresa que muchas medicinas no convencionales pueden ser sujetas a la evaluación científica que se requiere para habilitar las drogas, concluye: "¡No podemos usar blindaje!". Otras revistas especializadas como JAMA, Lancet, New England J. y British Med. J. entre otras, también vienen publicando artículos originados en esta corriente de la medicina, que durante décadas parecía contrapuesta a la "convencional" (17, 18).

El creciente empleo de medicinas alternativas y complementarias en EE.UU. llevó al Congreso a la creación del Centro Nacional para la Medicina Complementaria y Alternativa (NCCAM) dentro del Servicio Nacional de Salud (NIH). Su misión está dedicada a explorar prácticas curativas complementarias y alternativas en el contexto de la ciencia, formar investigadores en CAM y diseminar información seria (17). La creación de este Departamento ha despertado un nuevo interés en el campo de la investigación de terapias alternativas, a la vez que ha establecido un puente de contacto en las medicinas ortodoxa y no ortodoxa.

En EE.UU. según Eisenberg y col. las terapias alternativas, entendiendo por tales las que no se enseñan en las facultades de medicina y que normalmente no están disponibles en los hospitales americanos, reciben una atención creciente tanto por el público y los medios de comunicación como de la comunidad médica y las agencias gubernamentales. El porcentaje de la población americana que utiliza algún tipo de de terapia de alternativa ha aumentado del 39 % al 42 % entre 1990 y 1997. De todas las terapias incluidas en la encuesta de Eisenberg, la fitoterapia es la que ha reunido un mayor crecimiento absoluto, pasando del 2,5 % (1990) al 12,1% (1997) (18).

En los últimos años en varios países europeos se ha incorporado la enseñanza de Medicinas de Alternativa dentro de la formación médica convencional. El Dr. E. Ernst, Director del Departamento de Medicina Complementaria, de la Escuela de Postgraduados de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Exeter, señaló que en Inglaterra la prevalencia para el uso de este tipo de medicinas es de alrededor del 20 % con respecto a la convencional y la tendencia es de continuar creciendo. Mientras tanto en Alemania la incidencia alcanza el 60 % (19).

En 1988 se publicó una entrevista al Dr. Andrew Weil catedrático de Medicina Interna de la Universidad de Arizona (20), famoso por impulsar lo que se ha dado en llamar "Medicina Integral". Intenta combinar las mejores ideas y métodos de la medicina "convencional" y "alternativa" para obtener nuevos tratamientos costo-eficientes. Weil considera que hay 2 razones fundamentales que explican la expansión de las llamadas "Medicinas de Alternativa", la grave crisis económica de la salud y que a nivel mundial ocurre un gran movimiento a favor de la Medicina Natural. En 1997 este médico fue considerado por Time "una de las personas más influyentes en la nación". Weil expresa: "muchos de estos tratamientos están basados en estudios serios que desgraciadamente muchos médicos desconocen y por ello cuestionan... El problema no es que no haya evidencia científica, sino que muchos la desconocen.

En el prólogo de su libro "Elige tu propia medicina" Weil expone que los costos de la atención sanitaria continúan subiendo y a los médicos cada vez les resulta más difícil ejercer su profesión fuera de ambientes controlados, en los que las prácticas vienen determinadas por directrices corporativistas.

Ante esta situación, ha surgido un importante movimiento de consumidores que defiende el empleo de la medicina alternativa, lo que obligó más que cualquier otro factor aislado, a hacer cambios en una profesión que durante mucho tiempo se ha resistido a ellos (21).

Durante el 2004 se constituyó la Mesa “Desarrollo de fármacos de fuentes naturales”, que funciona en la órbita de la Dirección de Comercio Exterior (DPC) del Ministerio de Relaciones Exteriores. Este año, el Dr. Carlos Brugnini, Embajador en Suiza, ex director de la DPC, informó a la Mesa sobre conversaciones mantenidas con uno de los principales Laboratorios de aquel país: *“...piensan que el sistema de seguridad social en EE.UU debiera colapsar antes del 2016 al no poder soportar los actuales precios de los remedios en ese país, por lo que esperan un cambio de política en EE.UU con grandes repercusiones en el mercado mundial de fármacos. Además, ya se están impulsando cambios en las producciones y políticas en otros países emergentes como China e India.”*

Durante el I Simposio Brasileiro sobre Própolis e Apiterapéuticos, realizado en la Universidad de Franca en 1999, investigadores y representantes del gobierno expresaron la necesidad de diseñar estudios de investigación científica en humanos, que permitan posicionar con fuerza estos nobles productos que nos brindan las abejas. Una vez que los productos apiterapéuticos sean reconocidos por las autoridades de la salud, estos exhibirán un crecimiento insospechable.

Desde la década del '70 la apiterapia se ha venido desarrollando en forma sostenida, muchas comunicaciones presentadas muestran resultados favorables e incluso sorprendentes. A pesar de ello estos productos no han logrado la penetración deseable en la medicina convencional, por lo que debemos rever lo hecho hasta ahora. El rigor científico de trabajos que se vienen realizando a nivel mundial favorecerá la inserción de estos productos en el ámbito médico. En occidente, la apertura a corrientes renovadoras de la ciencia, hace pensar que contribuirá para que los productos de la colmena ocupen espacios en la farmacopea médica y de esa forma podrán ser usados con mayor fuerza en la población mundial.

Apiterapia

Por Apiterapia se reconoce la disciplina médica que emplea los productos derivados de la colmena: miel, propóleos, polen, jalea real y apitoxina en el tratamiento y la prevención de enfermedades. La miel, el polen y la jalea son valiosos complementos nutricionales y poseen interesantes propiedades terapéuticas, mientras tanto el propóleos se caracteriza por poseer numerosas propiedades terapéuticas y preventivas de enfermedades. La apitoxina, es un antirreumático, conocido desde tiempos remotos, que en los últimos años ha resurgido con muy buenas perspectivas.

Tabla 24. Clasificación de los productos utilizados en Apiterapia, en función de los valores alimentarios y terapéuticos. (Prof. Dr. Donadieu)

Producto	Importancia alimentaria	Importancia terapéutica
Polen	+++	+++
Miel	+++	++
Jalea Real	+	+++
Propóleos	0	+++
Apitoxina	0	+++

Referencia: +++ gran importancia, ++ importante, + importancia menor, 0 sin importancia. El Dr. Donadieu confeccionó esta tabla en la década del 70, en los 90 han adquirido trascendencia los llamados alimentos funcionales (healthy foods) o preventivos de enfermedades. El propóleos es considerado de esta forma en Japón, Corea, EEUU y algunos países europeos. De acuerdo a lo expresado, actualmente el propóleos debería considerárselo como que también posee gran importancia alimenticia.

Propiedades terapéuticas del Propóleos

Los principales usos del propóleos se vinculan con su capacidad antimicrobiana, cicatrizante y antiinflamatoria, pero las propiedades que a nuestro entender le brindan gran relevancia son la antioxidante, inmunoestimulante y la citotóxica (22). En los últimos años se ha reactivado el interés por el propóleos, debido al significado que han alcanzado los antioxidantes en la medicina preventiva. La potente capacidad antioxidante le permitirá al propóleos ganar espacios en la prevención de enfermedades de gran incidencia en la sociedad moderna como la aterosclerosis y en particular el infarto de miocardio, principal causa de mortalidad en los países desarrollados. Importantes estudios epidemiológicos muestran que las poblaciones con mayor consumo de flavonoides, tienen menor mortandad por enfermedad coronaria (23).

Mediante modernos métodos analíticos se está develando la compleja composición del propóleos, estableciéndose que son más de 100 componentes los que actúan en sinergismo.

Propiedades Antimicrobianas

La composición del propóleos le confiere capacidad antimicrobiana: antibacteriana, antimicótica y antiviral.

Capacidad Antibacteriana: Sin dudas esta fue una de las primeras propiedades observadas en el propóleos. Estudios antropológicos señalan que los egipcios, quienes lo llamaban “cera negra”, basados en esta propiedad lo emplearon en la técnica de embalsamar cadáveres. En nuestra era múltiples estudios bacteriológicos in vivo e in vitro confirmaron su acción bacteriostática y bactericida (24, 25). Se señalan como principales responsables de esta propiedad los flavonoides galangina y pinocembrina y derivados de los ácidos benzoico, ferúlico y cafeico. Un estudio realizado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Oxford, (26), informa que 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 los antibióticos (ATB). Previamente se determinó que el propóleos desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular causando bacteriólisis parcial e inhibiendo la síntesis proteica (27). Queda claro que la acción antimicrobiana es compleja y no se puede realizar una simple analogía con otra forma de acción de ningún ATB clásico.

El mayor efecto antibacteriano del propóleos se observa frente a gérmenes Gram positivos como el Estafilococo Dorado (*Staphylococcus aureus*), incluso en cepas Meticilino Resistente (SAMR) (28). También muestra susceptibilidad el Estreptococo beta hemolítico muchas veces responsable etiopatogénico de la amigdalitis pultácea, impétigo y de la erisipela entre otras infecciones. Numerosas bacterias Gram negativas también son sensibles, entre las que se encuentran algunas cepas de *Pseudomona Aeruginosa* (Piociánico), *Escherichia Coli* y *Proteus*.

Hegazi y Abd El Hady del Centro Nacional de Investigación en Giza-Egipto, evaluaron la capacidad antimicrobiana de 4 tipos de propóleos de su país (29), enfrentándolos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Establecieron que había variación de la actividad antimicrobiana de acuerdo al origen de la muestra, siendo el *Staphylococcus* el más sensible en todos los casos. La composición química de las muestras se determinó mediante GC-MS, encontrándose diferencias significativas entre las mismas, lo que explica la diferente expresión de la propiedad antimicrobiana. Mayor información sobre la composición de propóleos, se presenta en el Capítulo II.

Estafilococo Dorado

El estafilococo dorado (*Staphylococcus aureus*) es un patógeno importante en seres humanos, que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados con defensas disminuidas, pero también es responsable de "infecciones comunitarias" que afectan personas sanas, inmunológicamente competentes. El tratamiento de las infecciones provocadas por este microorganismo es cada vez más difícil a partir de la aparición de cepas multirresistentes, principalmente nosocomiales (30).

Durante 10 años hemos tratado más de 1.500 pacientes, lo cual nos permite afirmar que los casos tratados de esta manera tienen una evolución más rápida y con menos secuelas comparados con los pacientes que solo son curados con métodos convencionales y ATB. El tipo de lesiones que tratamos de esta forma son quemaduras, politraumatizados, impétigo, y heridas de diferente naturaleza. En el caso de impétigo estafilocócico o estreptocócico, el propóleo reduce sensiblemente el período de cicatrización en al menos un 30 a 40 % comparado con el uso solo de ATB. En la mayoría de estos casos se logra la cicatrización mechando las heridas con mechas de propóleos (gasas de algodón con propóleos al 2 %). En los primeros días se obtiene una herida limpia y luego se instala la granulación, que tiene una característica singular, no forma queloide y genera una excelente cicatriz en menor tiempo. Esto es atribuido a la capacidad del propóleo de estimular los fibroblastos para que sinteticen colágeno. Histológicamente se ha determinado que en las heridas tratadas con propóleos las fibras de colágeno se disponen en forma paralela, contribuyendo ello a una mejor cicatrización.

En 2004 un grupo de investigadores del Instituto de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Zagreb, Croacia evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleos (EEP) y determinaron que tiene buena actividad frente a especies Gram-positiva y sobre todas la especies múltiples resistentes testeadas. La concentración inhibitoria mínima (MIC) fue más baja en muestras con mayor contenido de flavonoides (entre 0,65 a 7,81 mg/ml). Identificaron la galangina (3,5,7-trihydroxyflavona) como el componente con mayor capacidad bactericida pero apuntaron la importancia del sinergismo de los componentes (31).

Propóleos y antibióticos

En los últimos años, se han publicado gran cantidad de trabajos, informando sobre la resistencia bacteriana a los antimicrobianos (32). Desde su descubrimiento, estas drogas han probado ser notablemente efectivas para el control de las infecciones bacterianas. Sin embargo algunos patógenos muy pronto se hicieron resistentes a muchas de las drogas que fueron en principio efectivas. Investigadores del Instituto de Investigaciones de Salud Pública en EE.UU. y de muchos centros universitarios como el Departamento de microbiología de la Facultad de Medicina de Nueva York, han realizado revisiones y analizaron con preocupación el tema de la resistencia a los antimicrobianos que exhiben muchos microorganismos (33).

Inicialmente, el problema de la resistencia bacteriana a las drogas antimicrobianas se resolvió a través del descubrimiento de nuevas clases de ATB. Nos hallamos ahora ante dos tendencias opuestas. La prevalencia de patógenos humanos multirresistentes crece rápidamente, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas antimicrobianas activas contra dichos organismos se ha enlentecido dramáticamente. Existen muchas razones para ello, incluyendo el costo actual de ingresar un nuevo antibiótico de la fase de descubrimiento al mercado (entre 100 y 350 millones de dólares en los EE.UU.) (34). Desafortunadamente, no existe seguridad en cuanto a que el desarrollo de nuevas drogas antimicrobianas pueda acompasar la capacidad de los patógenos bacterianos para desarrollar resistencia.

Parece que muchos de los genes que determinan resistencia han estado presentes en la naturaleza y son depredadores para el uso clínico de drogas antimicrobianos (35). Luego de leer estas citas, entendimos que era oportuno de nuestra parte recordar lo siguiente: luego de millones de años la naturaleza desarrolló complejos antimicrobianos, concentrados en las resinas que exudan, para proteger a los vegetales superiores (fanerógamas), cuando aquellos son dañados. Son sustancias de compleja composición, que actuado en sinergismo se potencian y logran reducir la posibilidad de que los gérmenes generen resistencia (36).

Esa es la naturaleza del propóleos, desestimada por la medicina moderna a mediados del siglo XX, con el auge de la era de los ATB. Recientemente el propóleos resurge con grandes posibilidades para ser utilizado como un recurso terapéutico valioso, dentro del arsenal de los antimicrobianos, solo o asociado a otros de síntesis, ya que una de las propiedades más interesantes es su capacidad de potenciar la acción de algunos ATB.

Utilizando la salmonelosis del ratón como modelo experimental se estableció que el propóleos intensificaría y prolongaría la acción antibacteriana de algunos ATB (37). En la Universidad de Polonia, evaluaron esta capacidad del propóleos. Para ello utilizaron cultivos de *Estafilococo Dorado*, ante las cuales evaluaron la actividad de cefradina, penicilina G, doxiclina, estreptomina, cloxacilina, cloranfenicol y ampicilina. Primero se determinó la capacidad antimicrobiana del ATB solo y luego se incorporó en el cultivo 600 µg/ml de extracto de propóleos. Los autores determinaron un marcado incremento de la acción antimicrobiana de la cloxacilina y la estreptomina, mientras que fue moderada en los otros ATB, excepto en la ampicilina (38). En algunos casos el efecto bacteriostático se incrementó de 10 a 100 veces.

El sinergismo observado del propóleos potenciando la acción de los ATB, es una propiedad que fundamenta su empleo en los casos donde se utilizan los quimioterápicos para combatir infecciones bacterianas en piel, aparato respiratorio, urinario u otras localizaciones. Sin embargo, es necesario profundizar las líneas de investigación que se han estado llevando a cabo.

Capacidad Antiviral

Herpes Simple: En diciembre de 1992 la Dra. Fraçoise Sauvager presentó su tesis doctoral (39), en el capítulo llamado "Contribución al estudio de las propiedades antivirales del Propóleos" analiza la composición y propiedades del mismo, estableciendo que los responsables de esta acción son algunos flavonoides, un éster del ácido cafeico y el ácido ferúlico y afirma que la actividad de esos componentes aislados es generalmente inferior a la que logran integrados en el propóleos (sinergismo).

El propóleos se comporta como un antiviral de amplio espectro y presenta una buena actividad frente a los virus Herpes y Poliovirus. Los Dres. Amoros y Sauvager de la Facultad de Medicina de Rennes, confirmaron la acción virulicida frente al herpes tipo 1 y 2, pero también ante poliovirus (40). Establecieron que reduce la síntesis del ADN viral y que los responsables son flavonoides, que actúan en sinergismo con un éster del ácido cafeico y el ácido ferúlico. También se ha comprobado que el empleo precoz en lesiones labiales, oculares y genitales causadas por virus del herpes simple Tipos 1 y 2 (HSV 1 y 2), muestra respuestas favorables, caracterizadas por períodos de empuje más cortos y disminución del número de recidivas (41, 42). Desde hace algún tiempo se ensaya su empleo en la clínica con resultados alentadores solo o asociado a interferón.

En Uruguay se utiliza el propóleos en cremas, apósitos y en "solución adhesiva" formulada para aplicar en mucosas. En los pacientes con herpes simple bucal o genital se acorta el período de estado, se reducen las sobreinfecciones, disminuye significativamente la molesta sintomatología local e incluso en muchos pacientes no vuelven a ocurrir recidivas. En estos pacientes se emplea el propóleos en forma tópica y sistémica, lo cual coadyuva por su acción inmunomoduladora.

En el Servicio de Dermatología del Hospital de Colentina (Francia) se obtuvieron efectos terapéuticos significativos empleando propóleos en crema para tratar infecciones por Herpes recidivante y Herpes Zoster según observación publicada en 1988 Virologie (40).

En un estudio aleatorizado, simple-ciego y multicéntrico se evaluó la eficacia del propóleos en herpes genital (HSV tipo 2) comparándolo con aciclovir y placebo (vehículo) (43). Se incluyeron 90 pacientes de ambos sexos, que fueron distribuidos en 3 grupos de 30 pacientes. El tratamiento se comenzó en la fase vesicular. Los resultados obtenidos indican que el proceso de cicatrización se manifiesta más rápido en el grupo propóleos, al décimo día 24 pacientes de 30 tratados habían curado, mientras que en el grupo aciclovir 14 de 30 y en el de placebo 12 de 30 ($p=0,0015$).

En los pacientes tratados con propóleos la costra se formó antes, ocurriendo en 15 pacientes al 3er día, comparado con 8 en el grupo aciclovir y ninguno en el grupo placebo ($p=0,0006$). Al séptimo día, 10 participantes del grupo propóleos, 4 en el de aciclovir y 3 en del placebo habían curado. Los autores concluyen que el propóleos es más efectivo que el aciclovir y el placebo en la cicatrización de lesiones de herpes genital y en reducir los síntomas.

Condilomas acuminados: enfermedades de transmisión sexual de origen viral, en nuestra experiencia observamos que luego de tratarlos con loción o crema de propóleos, remiten en pocos días, respondiendo favorablemente al tratamiento tópico con propóleos.

Herpes Zoster: Otro virus que responde favorablemente al propóleos es el Herpes Zoster o "culebrilla", patología con expresión cutánea, dolorosa de pobre respuesta a los tratamientos convencionales. La incidencia anual del herpes zoster varía de 0,4 a 1,6 casos por 1000 personas sanas por debajo de la edad de 20 años a 4,5 a 11 casos por 1000 en aquellos de 80 años o mayores (44).

El herpes zoster hace erupción en uno o dos dermatomas adyacentes, siendo más comunes los compromisos torácico, cervical y oftálmico. Las lesiones progresan desde parches discretos de eritema a grupos de vesículas con pústulas y costras que aparecen en 7 a 10 días pudiendo llevar un mes su remisión, a menudo con cicatrices anestésicas, cambios en la pigmentación y dolor. El dolor es la sintomatología más común, a menudo precediendo la erupción en días a semanas constituyendo ocasionalmente la única manifestación (45).

El principal riesgo del H. Zoster es la neuralgia postherpética, que genera un dolor intenso, duradero y refractario al tratamiento médico. Su incidencia se incrementa con la edad, a los 55 años ocurre en 27 % de los casos y a los 70 años en un 73 %. Si bien aún hay muchas interrogantes, se considera que en los pacientes cuyo período eruptivo no es adecuadamente resuelto, presentan mayor incidencia de neuralgia. Para el tratamiento del Herpes Zoster la medicina convencional combina corticoides y drogas antivirales como el aciclovir (46). Estas drogas no están exentas de efectos adversos (inmunosupresión), tienen un costo significativo y si bien reducen los síntomas del período de estado, no reducen la incidencia de la temida neuralgia postherpética.

Al tratar precozmente a los pacientes en el período eruptivo, se constata que la remisión se acorta. Otros investigadores sostienen que el uso de propóleos precozmente en estos pacientes (42, 43) produce disminución del dolor dentro de las 48 horas de su aplicación. En esta afección dermatológica se utiliza propóleos por vía oral y en forma tópica. Por vía oral se recomienda la dosis de 400 a 600 mg/día en 2 o 3 dosis, con el propósito de mejorar la respuesta inmune. En forma tópica se cubren las lesiones cutáneas con propóleos en apósito o en crema. Lo que se obtiene es analgesia entre 48 a 72 horas y remisión de la erupción en un período de aproximadamente 2 semanas. Es recomendable asociar las vitaminas B1, B6 y B12 en altas dosis por su propiedad antineurítica y utilizar analgésicos (AINE) a demanda. De esta forma se evita la secuela de neuritis postherpética. No es recomendable el empleo de corticoides.

La medicina puede encontrar en el propóleos un recurso terapéutico útil para tratar esta afección viral, actualmente con tratamiento incierto, costoso y no exento de trastornos secundarios. Es necesario poner en marcha ensayos clínicos controlados evaluando la eficacia del propóleos, comparándolo con drogas convencionales.

Estudios in vitro han revelado que el título de infección del virus HSV 1 se reduce luego de agregar el propóleos al cultivo y la replicación viral disminuye en función del tiempo transcurrido, constatándose asimismo, una reducción de la síntesis del DNA viral (40). La acción antiviral se produce a la concentración de 3 mg/ml.

Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH): también se ha investigado. Un grupo de investigadores del Albert Einstein College of Medicine de Nueva York, publicaron en 1997 un trabajo donde determinaron la capacidad del propóleo de suprimir la replicación del VIH-1 y su efecto inmunoestimulante (47). Considerando las declaraciones del Congreso Mundial de SIDA realizado en Sudáfrica en junio del 2000, se trata de un área trascendente para la salud pública mundial por la ausencia de tratamiento curativo y su alto costo, que deja fuera de posibilidades terapéuticas a millones de habitantes.

En un estudio llevado a cabo en la Universidad Estatal de Campinas-San Pablo en Brasil y la Universidad de Carolina del Norte en EE.UU., se evaluaron 400 muestras de propóleos procedentes de todo el territorio brasileño. Las mismas fueron clasificadas en 12 grupos distintos a través de perfiles en cromatografía en capa delgada de alta performance y espectro de absorción en la región del ultravioleta. Se verificó que 2 de los grupos presentaban alta actividad citotóxica contra diferentes células tumorales malignas y las muestras de otros 2 grupos demostraron actividad anti VIH. (48)

Cicatrizante y antiinflamatorio

El propóleo ganó espacios importantes en el tratamiento de heridas, por su capacidad antibacteriana y por su notable capacidad cicatrizante y antiinflamatoria. Esto último es comparable a la de antiinflamatorios de síntesis como el diclofenac. Se señaló al ácido cafeico como responsable de inhibir la dihidrofolato reductasa, reduciendo la producción de interleuquinas y prostaglandinas (49, 50). En 1996 fue publicado un trabajo elaborado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Oxford, los autores atribuyen esta acción del propóleo a un éster del ácido cafeico (caffeic acid phenethyl ester o CAPE), el ácido cafeico y a la quercetina (51). Actuando a nivel de los macrófagos suprime la producción de prostaglandinas y leucotrienos. Empleando modelos "in vivo" e "in vitro" constataron que el propóleo suprime la vía de la lipooxigenasa del ácido araquidónico. En 2000 se publicó un trabajo realizado en el Departamento de Oftalmología de la Facultad de Medicina, Universidad de Celal Bayar en Turquía. Los autores emplearon un modelo animal, quemadura de cornea, concluyendo que el propóleo tiene un efecto antiinflamatorio comparable a la dexametasona (52).

El propóleos se emplea en medicina para tratar heridas con superiores resultados a los obtenidos con "cicatrizantes" de origen sintético. Desde 1985 empleamos el propóleos para tratar pacientes con heridas de diferente naturaleza (quemaduras, politraumatizados, pie diabético, etc).

Los pacientes concurren al hospital con heridas infectadas o impétigos estafilocócicos o estreptocócicos tratamos sus heridas con apósitos de propóleos al 2 % e indicamos un antibiótico orientado por el estudio microbiológico o la clínica.

Los resultados son claramente favorables, si comparamos con la evolución que tienen los pacientes tratados con otras medidas y antibióticos. Ello obedece a la acción antibacteriana directa pero también a la indirecta a la que nos referiremos. En la clínica no solo influye la capacidad antibacteriana, también influye la antiinflamatoria, que se manifiesta antes de 72 horas. Además el propóleos es capaz de estimular la cicatrización propiamente dicha, existiendo evidencia histológica al respecto y en la clínica es ostensible, en particular en heridas anfractuosas y quemaduras.

Cuando hablamos de capacidad antibacteriana del propóleos, los trabajos in vitro son importantes, pero en la clínica las cosas son más complejas, incidiendo otras variables que es necesario considerar. Concentraciones inferiores a las antibacterianas también logran resultados satisfactorios, mientras que concentraciones elevadas pueden ocasionar intolerancia local, que no es alergia sino una irritación química. Este es un efecto secundario que puede ocurrir con cualquier producto tópico empleado en altas concentraciones. Histológicamente ocurre un incremento de la cantidad de fibroblastos maduros, que sintetizan fibras de colágeno, orientadas en forma paralela, que explicaría que la cicatrización deje poca secuela. La inhibición de la degranulación de células cebadas contribuye a la reducción del exudado inflamatorio. También ocurre un incremento del índice mitótico en el extracto basal de la epidermis y un aumento de la queratinización (53). Asimismo debemos considerar otros hechos, como la llamada capacidad "antimicrobiana indirecta". Se trata de la capacidad que posee el propóleos de potenciar la acción de varios antibióticos como la penicilina, estreptomina, cloxaciclina y cefradina entre otros. Desde nuestro punto de vista, la capacidad inmunoestimulante local y sistémica, contribuyen para alcanzar los resultados positivos observados en los pacientes.

(Ref: Dr. Walter Fierro Morales)

El Dr. Walter Fierro Morales realizó un estudio de observación descriptivo o casos en serie, que fuera presentado en el X Congreso Latinoamericano de Cirugía (54). En un total de 229 pacientes con heridas de diversa índole, se corroboró que la cicatrización se obtenía en menos tiempo y con menos secuela (cicatriz) comparados con los tratamientos convencionales.

En la actualidad la casuística supera los 1500 casos tratados en la esfera del Ministerio de Salud Pública. El primer paso es evaluar el terreno (edad, metabolismo, hemograma, aparato cardio vascular, etc) se encara al paciente desde un punto de vista general. Cuando es necesario se recurre a los ATB. En muchos casos se recomienda el consumo de polen y/o propóleos.

Un grupo de investigadores cubanos, utilizando el propóleos en quemados observaron: "Influencia directa en la evolución clínica del quemado, poder terapéutico, antibacteriano y epidermizante". En este tipo de pacientes las reacciones adversas son poco frecuentes, recomendando su uso tópico de manera sistemática en todas las unidades de quemados, así como en otras especialidades, en quemaduras sépticas y la preparación de heridas para injertos de piel (55).



Foto 1



Foto 2



Foto 3



Foto 5



Foto 4

Foto 1 a 5. Paciente: Lila R. 53 años, falla de sutura en postoperatorio, exudado Estafilococo aureus meticilino resistente hospitalario.

Inicio de tratamiento: 27/11/2000
Alta: 29/12/2000.

Método: lavado de la herida con suero fisiológico y mechado de herida cada 48-72 horas con apósitos de propóleos al 2 %. En este caso no se utilizaron ATB parenterales.

Reacciones locales adversas:

El uso tópico del propóleo en heridas cutáneas puede ocasionar dermatitis alérgica por contacto en pacientes susceptibles, pero son más los casos de irritación primaria por una concentración elevada (56). Hay numerosos estudios que vinculan la presencia del CAPE como responsable de la dermatitis alérgica. (57). Sin embargo consideramos que uno de los elementos cruciales en la aparición de esta intolerancia es la concentración.

En el capítulo 30 dedicado a Piel, en el tratado de Patología del Prof. Stanley Robbins (58), expresa: "El porcentaje de los sujetos que presentarán dermatitis dependiente de sensibilización suele ser mucho menor que el de quienes sufren irritación primaria por una concentración elevada de la sustancia". Este efecto adverso se observa con mayor incidencia en el tratamiento de úlceras tróficas, localizadas en miembros inferiores. Está favorecido por el éxtasis venoso, el empleo prolongado y el eczema que habitualmente subyace en estas lesiones. En un Servicio de Cirugía especializado, evaluando 1.600 niños quemados tratados con propóleo se constató un 0,2% de reacciones adversas (58). Sin embargo, en los adultos la incidencia es mayor. En un grupo de 229 pacientes con heridas de diferente naturaleza, se evaluaron 2 formulaciones de propóleo en apósitos, una al 8 % y la otra al 2 %. La primera concentración era la clásica, que se utilizaba hasta ese momento en Uruguay, la segunda se le llamó "nueva formulación hipoalérgica". La segunda fue claramente mejor tolerada (1,8 % versus 19% de intolerancia). El primer signo clínico suele ser el eritema, seguido de prurito, posteriormente edema, exudado y por último vesículas. Las vesículas a menudo se rompen y forman costras que pueden experimentar infección secundaria. Esta sintomatología puede aparecer entre las 2 y las 4 semanas, retrocede rápidamente con suspender el tratamiento. Si no se suspende el tratamiento, la urticaria puede generalizarse.

Recientemente en el Departamento de Dermatología de la Universidad de Bonn, se evaluó la incidencia de sensibilización en pacientes con insuficiencia venosa crónica. Se aplicaron parches cutáneos con productos muy utilizados en forma tópica. Se reveló sensibilización en 78 % de los pacientes.

La lista de alérgenos fueron encabezados por bases de ungüento que oscilaron entre 33 y 8,3 %; seguidos por resinas vegetales (bálsamo de Perú 22,2%, colofón 13,9 %, fragancias incorporadas 8,3% y propóleos 5,6 %) y antibióticos tópicos (sulfato de neomicina 16,7 %, cloranfenicol 13,9 %). Se constató una sensibilización del 8,3 % en el caso de "vendajes modernos" (59). Estos datos afirman los hallazgos clínicos en los cuales los pacientes con insuficiencia venosa, tienen alta incidencia de intolerancia a los productos tópicos utilizados en ese terreno de éxtasis. Surge de este trabajo que entre los productos empleados en forma tópica el propóleos es de los menos alérgizantes.

Empleando el propóleos por vía sistémica por más de 15 años, en más de 2.000 pacientes, se han observado una muy baja incidencia de casos con intolerancia, menos del 1 por mil, manifestándose sobre todo a nivel orofaríngeo. En el Hospital de Clínicas, donde se lleva un registro a nivel nacional, nunca se denunció un caso de alergia grave que comprometiera la vida de paciente alguno .

Acciones sobre el sistema inmunológico - Inmunomodulador

Diversos trabajos demuestran que el propóleos estimula la inmunidad inespecífica y la específica, tanto inmunidad celular (linfocitos T) como la humoral (linfocitos B). En ratones infectados con el virus influenza tipo A y tratados con propóleos, se constató un aumento de los linfocitos T, un mayor nivel de fagocitosis y una menor mortalidad, en comparación con animales testigo no tratados. Los autores determinaron que se estimula la liberación del factor inhibidor de la migración de los leucocitos (60).

Una de las propiedades importantes que presenta el propóleos es la de ser inmunomodulador. En los últimos años numerosos investigadores han puesto de manifiesto que actúa sobre la inmunidad celular y humoral. Los primeros trabajos fueron efectuados en Rusia por Kivalkina (61) quien observó una respuesta mediada por anticuerpos superior cuando se emplea el propóleos como adyuvante de vacunación antitetánica y concluyó que se estimulan los factores específicos y no específicos de la inmunidad.

En 1991 se realizó el 1º Simposio Internacional sobre Apiterapéuticos, en Cuba, allí fueron presentados diversos trabajos que mostraron resultados positivos empleando propóleos en pacientes con inmunodeficiencia. Uno de los grupos de investigadores cubanos evaluó su respuesta en niños con síndrome respiratorio alto o bajo recidivante y con inmunodepresión celular o mixta. Primero se logró una mejoría clínica y luego una normalización paraclínica. Más del 90% de los casos de síndrome respiratorio alto con inmunodepresión humoral celular mixto tratado mejoraron y se constató mejoría en más del 80 % de los casos de afección respiratoria baja (62, 63).

Aleksandrov y Danilov establecieron que el propóleos estimula la actividad de los macrófagos a casi el doble (49). Asimismo se observó el aumento del número de linfocitos T, un mayor nivel de fagocitosis y una menor mortalidad en comparación con animales testigo no tratados. En ese trabajo el autor hace referencia a que algunas fracciones del propóleos estimulan la liberación del factor inhibidor de la migración de los leucocitos. Otro fenómeno que se observó fue la inhibición de la degranulación del mastocito. Algunos flavonoides serían responsables de esta acción después que se ha producido la reacción antígeno – anticuerpo capaz de introducir cambios halotéricos en las membranas del mastocito, con la consiguiente liberación de sustancias vasoactivas responsables de reacciones alérgicas como el asma, faringitis y amigdalitis crónica.

En 2003 fue publicado un estudio realizado en los Departamentos de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba España y en la Facultad de Medicina de la Universidad de Freiburg Alemania (66). En el mencionado estudio los autores afirman que el CAPE es un compuesto farmacológicamente seguro, con conocidas propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras, y anticancerígenas. Dado que los linfocitos T humanos juegan un rol en la fase inicial de diversas enfermedades inflamatorias, evaluaron la actividad inmunosupresiva del CAPE en dichas células, descubriendo que este compuesto fenólico es un potente inhibidor de los eventos iniciales y tardíos en los procesos que activan las células T. Sin embargo, los autores encontraron que el CAPE, específicamente inhibe la producción de interleukina 2 en células T estimuladas.

Esta propiedad intrínseca del propóleos le confiere gran utilidad para el tratamiento de lesiones dolorosas como aftas y quemaduras. En estos casos el paciente acusa en los primeros segundos "ardor" aunque luego se pone de manifiesto el efecto anestésico local que otorga alivio. Estudios in vitro han demostrado que el propóleos posee una potencia anestésica local similar a la de la novocaína al 5% y que en una concentración de 2-4 % es de 3 a 5 veces más potente que la cocaína. En la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires, se estudió la propiedad anestésica de dos preparados de propóleos y se le comparó con la lidocaína. Se encontró que el propóleos en solución alcohólica es 24 veces más potente que la solución acuosa y a su vez es 6 veces menos potente que la lidocaína. Sin embargo se señala que la solución alcohólica de propóleos es igual de eficaz que la lidocaína, condición absolutamente necesaria para usar un medicamento y no así su potencia, que solamente indica dosis (67).

Estudios toxicológicos sobre el propóleos

Son múltiples los estudios que se han llevado a cabo en diferentes países para demostrar la buena tolerancia y la inocuidad de este producto natural administrado por vía oral. Investigaciones realizadas en el Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República (Uruguay), demostraron que el propóleos no produce ninguna alteración en los parámetros vitales y no lograron establecer la dosis letal 50 por vía oral, ya que dosis tan elevadas, como 13 gr/kg, no produjeron ninguna alteración (68). A las mismas conclusiones arribó Lobeda en Yugoslavia utilizando un modelo animal, con un seguimiento de 9 meses (69).

En la Universidad de La Habana se llevó a cabo un exhaustivo estudio de la toxicidad subcrónica del propóleos y las conclusiones fueron que el propóleos no ocasiona alteraciones patológicas en el organismo, aún cuando se lo utilice en dosis consideradas como altas desde el punto de vista toxicológico (70). En otro estudio realizado en La Habana se observó que el propóleos administrado por vía oral ejerce un efecto citohepatoprotector en ratones sometidos a una dieta con alcohol (71).

Antioxidantes de la dieta en patología Cardiovascular. Investigaciones con Propóleos

En 1999 la American Heart Association (AHA) formuló pautas dietéticas dirigidas a reducir el riesgo de enfermedad coronaria (72): "la recomendación más prudente y científicamente ostensible para la población en general es consumir una dieta equilibrada en frutas y verduras ricas en antioxidantes y los cereales enteros."

Durante décadas se ha hecho mención a la propiedad antioxidante que posee la miel, el polen y en particular el propóleos, pero recién en la década del 90 se comenzó a utilizar la metodología científica con este propósito y diversos trabajos han sido publicados, aquí solo abordaremos algunos. Uno de los primeros trabajos en esta dirección ocurrió en 1994, cuando investigadores cubanos estudiaron diferentes tipos de propóleos estableciendo que la propiedad antioxidante puede ser atribuida a su capacidad de atrapar diferentes tipos de Radicales Libres (scavenging) incluyendo al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), considerado uno de los más potentes conocidos en biología humana (73). También constataron que el mecanismo de acción es similar al que presenta el alfa tocoferol.

Un importante estudio acerca de la capacidad antioxidante del propóleos fue publicado en 1995 en la revista especializada *Free Radical Biology & Medicine* (74). Los autores evaluaron el mecanismo de acción de 7 flavonoides y 2 ésteres del ácido cafeico, estableciendo que la capacidad antioxidante estaba principalmente determinada por la presencia de una doble unión en la posición 2,3 del anillo central y los grupos oxidrilos en posición 3 y 5 de los anillos A y C (ver en anexo: "Química de los flavonoides"). También observaron que algunos flavonoides y un éster del ácido cafeico poseen mayor actividad antioxidante lipídica que otros componentes del mismo propóleos. Mientras tanto investigadores alemanes, ese mismo año, confirmaron esos hallazgos y constataron que la fracción acuosa de propóleos posee mayor capacidad antioxidante que la fracción alcohólica (75, 76).

En el 2004 se publicó en *Food Chemistry* un exhaustivo estudio en el que se evalúa la actividad antioxidante del propóleos de diversos orígenes geográficos, incluyendo muestras de Argentina, Uruguay, Brasil, Chile, EE.UU. y Asia.

Los autores concluyen que la capacidad antioxidante de los propóleos estaba correlacionada con el contenido total de polifenoles y flavonoides. Los propóleos con mayor actividad antioxidante contenían compuestos antioxidantes tales como el kaempferol y el CAPE (77).

Harborne en el Reino Unido (78) y Havsteen en Alemania (79) han publicado sendas y significativas revisiones bibliográficas sobre estos fitoquímicos. La primera publicada por Harborne en el 2.000 analiza aproximadamente 200 citas bibliográficas. Mientras tanto Havsteen concluye que si bien existe abundante información en la literatura científica sobre los flavonoides, más de 1.000 artículos han aparecido en prestigiosas publicaciones, pocas revisiones han sido realizadas desde el punto de vista médico. En esta situación, los países desarrollados solo permitirán la venta de productos basados en mezclas de flavonoides ej.: rotulados como propóleos o sus derivados como suplementos nutricionales y no como drogas. Procurar flavonoides requiere su extracción de fuentes vegetales o de los productos apícolas, (ej. Propóleos) o la síntesis química. Debido a que las concentraciones fisiológicas de los flavonoides en los vegetales son bajas, su extracción es laboriosa y costosa. El autor propone que una fuente alternativa y atractiva lo es el propóleos, que contiene una alta concentración de flavonoides, promedialmente del 4 % por peso. En otras palabras las abejas han hecho una parte considerable del trabajo de selección y recolección. Una muestra típica de propóleos contiene cerca de 25 diferentes flavonoides en una concentración significativa. Havsteen señala que el precio corriente del propóleos en bruto en el mercado internacional, es tan bajo que la síntesis de flavonoides se justificaría solo si es necesaria una sustancia pura para experimentos o para el tratamiento de ciertas enfermedades. El bioquímico Alemán concluye: “un incremento en el uso de flavonoides (ej. propóleos) para fines médicos, debería indirectamente apoyar la producción y por lo tanto la sociedad en su conjunto facilitaría la expansión de la apicultura.”

En el ejercicio de la medicina utilizamos el propóleos solo o asociado al polen, en pacientes con hepatopatía crónica alcohólica o post viral.

(Ref: Dr. Walter Fierro Morales)

Al cabo de 2 y 3 meses el enzimograma hepático alterado comienza a mejorar y al cabo de 6 meses en muchos pacientes esos valores se normalizan. Ello se refleja en una mejoría clínica y metabólica, se eleva la tasa de hemoglobina, mejoran su estado general, incremento del peso y mejoría de aspectos vinculados con la esfera cognitiva.

Antioxidante y antineoplásico

Una de las propiedades que ha despertado mucho interés en los últimos años, es la capacidad antitumoral (80, 81, 82). La quercetina mostró ser, in Vitro, un poderoso agente antiproliferativo de células anticancerosas humanas, exhibiendo efectos sinérgicos con algunos agentes terapéuticos como la Cisplatina y la Adriamicina.

Mediante ensayos in vitro se ha comprobado acción citotóxica del propóleos sobre líneas celulares tumorales que desencadena su apoptosis. In vivo, se ha reportado que hay una mayor respuesta inmune con incremento de la relación CD4/CD8 e incremento del número de linfocitos T Helper (83). En el 2000 se publicó un estudio realizado en forma conjunta por la Universidad de Medicina de Tokio, Instituto Nacional del Cáncer en EE.UU. y la Universidad de Columbia de Nueva York. Los autores comprobaron la capacidad citotóxica que poseen algunos componentes del propóleos frente a células de carcinoma de pulmón humano (HLC-2) (84).

Consideramos que en los últimos años se ha generado valiosa información en el campo de la oncología, siendo evidente que se justifica profundizar las investigaciones respecto de los efectos anticancerígenos del propóleos. Pero ello debe ser manejado con la prudencia que recomienda el método científico, pues aquí más que en otra propiedad, el manejo inadecuado de la información puede crear falsas expectativas que no contribuirían con el crecimiento y desarrollo sostenido que viene observándose a nivel internacional en la utilización del propóleos.

Nuevas fronteras del conocimiento, supresión de la expresión genómica.

Numerosos grupos de investigadores en el mundo, vienen publicando trabajos que sugieren que componentes del propóleos como el CAPE puede ejercer su efecto antiinflamatorio por inhibir la producción de RL y en el nivel de transcripción a través de la supresión de la activación del factor kappaB, y por inhibir directamente la actividad catalítica de la oxido nítrico sintetasa inducible.(85)

En el 2005 Keiichi Hishikawa y colaboradores del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Tokio y el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Teikyo, publicaron un valioso trabajo en la revista *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* de la American Heart Association. Los autores afirman que entre los polifenoles naturales, el más prometedor es el CAPE, obtenido del propóleos, siendo este el único compuesto que ha sido demostrado inhibe la enzima VIH integrasa, necesaria para la integración del ADN VIH dentro del genoma del huésped y que además es un potente y específico NF-kB inhibidor. Asimismo demostraron que el CAPE induce la apoptosis en cáncer de mama humano, pero no en células normales. En el trabajo se evaluó el efecto beneficioso de la suplementación oral de flavonoides atenuando el desarrollo de la aterosclerosis. Los autores concluyeron la suplementación oral de CAPE en ratas con deficiencia de Apolipoprotein E, atenúa el proceso de la aterosclerosis. Esto puede ser atribuido a la inhibición directa de NF-kB en la lesión y la reducción del estrés oxidativo sistémico. (86).

Referencias:

1. Bonheví, S.J.; Coll, V.F. Study on propolis quality from China and Uruguay. *Z. Naturforsch.* 55c, 778-784 (2000).
2. Kumazawa, S.; Hayashi, K.; Kajima, K.; Ishi, T.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2002, 50, 4777-4782.
3. Park, Y.; Matías de Alencar, S.; Lima de Aguiar, C.; Scamparini, A.; González; M.; Molina, M. Comparação das características físico químicas das própolis produzidas na região sub-tropical da América do Sul: evidência fotoquímica de sua origem botânica. *Apacame. Mensagem Doce* 61. <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/61/artigo.htm>.
4. Park, Y.; Ikegaki M.; de Alencar S. Clasificación das própolis Brasileira através de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Congreso Internacional de propóleos. 1 y 2 de septiembre de 2000. Buenos Aires. Argentina.
5. Pereira, A.; Norsell, M.; Cardoso, J.; Aquino Neto, F.; Ramos, M. Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by High-Temperature High Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J.Agric.Food Chem* 2000, 48, 5226-5230.
6. Matsuno, T.; Sang-Kee, J.; Matsumoto, Y.; Saito, M.; Morikawa, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hidroxicinnamic acid (Artepillin C) isolates from propolis. *Anticancer Research* 17: 3565-3568 (1997).
7. Matsuno, T.; Saito, M.; Matsumoto, Y.; Morikawa, J. A new Benzo- γ -pyran derivate isolated from propolis. *Z.Naturforsch.* 53c, 1037-1039 (1998).
8. Matsuno, T.; Matsumoto, Y.; Saito, M.; Morikawa, J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. *Z. Naturforsch.* 52c, 702-704 (1997).
9. Yoong Kuffó, M., Ruiz Orozco, B., Maldonado, L., Álvarez, A., Torné, C. y Bedascarrasbure E. Caracterización de propóleos de la Escuela Agrícola Panamericana. 1º Encuentro Latinoamericano de apicultores y 1º Congreso Cubano de Apicultura. La Habana. Cuba. 6 al 9 de Septiembre de 2004.
10. Bankova, V.; Christov, R.; Delgado Tejera, A. Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry*, Vol. 40, Nº 5, pp. 1411 – 1415, 1998.
11. Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R., "The composition and plant origins of propolis: A report of work al Oxford". International Bee Research Association, *Bee World.* Vol 71 Nº3. 1990.

12. Kosalec, I.; Bakmaz, M.; Pepeljnjak, S.; Knežević, S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta POharm.* 54 (2004) 65-72.
13. Popova, M.; Silici, S.; Kaftanglu, O.; Bankova, V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytochemistry*. Article in press. Corrected proof.
14. Sorkun, K.; Salih, B.; Suer, B. Study of Turkish propolis by Gas Chromatography (GC)-Mass Spectrometry (MS). Congreso Internacional de Propóleos. 1 y 2 de septiembre de 2000. Buenos Aires. Argentina.
15. Markham K.R.; Mitchel K.A.; Wilkins A.L.; Daldy J.A.; Lu Y. HPLC y GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, Vol 42 Nº 1. pp 205-211, 1996.
16. Dalen J. Alternative and complementary medicine. *Arch. Intern. Med.* 1998; 158:2179-2181.
17. Nahin R, Straus S. Research into complementary and alternative medicine: problems and potential. *BMJ* 2001;322:161-164.
18. Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Rompay MV, et al. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997. Results of a follow-up national survey. *JAMA* 1998;280: 1569-1575
19. Ernst E. The role of complementary and alternative medicine. Based on a presentation from the Millennium Festival of Medicine. *BMJ* 2000;321:1133-1135.
20. Martínez J. Entrevista al Dr. Andrew Weil. *Medico Interamericano*. Mayo 1998.
21. Weil A. *Elige tu propia medicina*. Barcelona: Ediciones Urano, 1998.
22. Fierro W. Propóleos: propiedades terapéuticas y uso clínico. *Tendencias en medicina*. 1995;6:30-38.
23. Hertog M, and col. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med.* 1995;155:381-86.
24. Lavie P. Características del propóleos. In: *Propóleos*. Bucarest. Ed Apimondia; 1975:35-42.
25. Rojas N y col. Acción antibacteriana de un preparado a base de propóleos. In: Asís M. editors. *Investigaciones Cubanas sobre el propóleos*. Proceedings of 1º simposio sobre los efectos del propóleos en la salud humana y animal. Varadero, Cuba; 1988:78-82.
26. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res* 1997; 152(3):239-46
27. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica*. 1994;60(3):222-7.

28. Marcucci M. C. Propolis : chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Adipologie*. 1995; 26:83-99.
29. Hegazi AG, El Hady FK. Egyptian propolis: 1-antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt propolis. *Z Naturforsch* 200;56(1-2):82-8.
30. El staphylococcus aureus: cada vez más frecuente y más resistente. *Medical Mag* 1999;10(89):32-39.
31. Pepeljnjak S, Kosalec I. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, Enterococcus spp. and Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Nov1;240(1):111-6.
32. Gold HS and Mollering RC. Resistance to antimicrobial drugs. *The New England J of Med* 1996;335:1445-51.
33. Shopsin B, Mathema B, Martinez J, Ha E, Campo ML, Fierman A, Krasinski K and col. Prevalence of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus in the Community. *The Journal of Infectious Diseases* 2000;182:359-362
34. McCaig IF et al. Trends in antimicrobial drug prescribing among office-based physicians in the United States. *JAMA* 1995;273:214-9.
35. Webb V et al. Antibiotic preparations contain DNA: a source of drug resistance genes? *Antimicrob Agents Chemoter* 1993;37:2379-84.
36. Greenaway W, and col. The composition and plant origins of propolis: A report work at Oxford. *Bee World* 1991;3:107-18.
37. Kivalkina J. La posibilidad de utilizar el propóleos en combinación con los antibióticos. In: XXIV Congreso Internacional de Apicultura. Ed. APIMONDIA, Bucarest; 1973
38. Krol W, Séller S, Shani J, Pites G, Czuba Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of staphylococcus aureus. *Arzneimittel-Forschung*. 1993;43(5):607-9.
39. Amoros M. Simoes C, Girre L. Synergistic effect of flanoes and flaonols against herpes simplex virus type 1 cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Of Natural Products*; 1992;55(12):1732-40.
40. Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J Nat Prod*. 1994 May;57(5):644-7.
41. Dumitrescu M. Crisan I. Esanu V. The mechanism of the antiherpetic action of an aqueous propolis extract. II. The action of the lectins of an aqueous propolis extract. *Roumaine de Virologie*. 1993;44(1-2):49-54.
42. Giurcaneanu F, Crisan I, Esanu V, Cioca V, Cajal N. Treatment of cutaneous herpes and herpes zoster with Nivcrisol-D. *Virologie* 1988;39(1):21-4.
43. Vynograd N, Vynograd I, Sosnowski Z. A comparative mult-centre study of the efficacy of propolis, acycloir and placebo in the placebo in the treatment of genital herpes. *Phytomedicine* 2000;7(1):1-6.

44. Glynn C et al. Epidemiology of shingles. *J R Soc Med* 1990;83:617-619.
45. Ragozzino M et al. Population-based study of herpes zoster and its sequelae. *Medicine* 1982;61:310-316.
46. Wood MM et al. A randomized trial of acyclovir for 7 days or 21 days with and without prednisolone for treatment of acute herpes zoster. *N Engl J Med* 1994;330:896-900.
47. Harish Z, Rubinstein A, Golodner M, Elmaliyah M, Mizrahi Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Exp Clin Res* 1997;23(2):89-96.
48. Park Y, Ikegaki M, de Alentar S, Wang H, Bastow K, Cosentino M, and Lee H. Determinação das actividades citotóxicas e anti-HIV dos extractos etanólicos de propólis colectadas em diferentes regiões do Brasil. <http://apacame.org.br/mensagemdoce/56/artigo.html>
49. Strehl E, Volpert R, Elstner EF. Biochemical activities of propolis-extracts. III. Inhibition of dihydrofolate reductase. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C. Journal of Biosciences.* 1994;49(1-2):39-43.
50. Khayyal M, Ghazaly M, Khatib A. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Drugs Under Experimental & Clinical Research.* 1993;19(5):197-203
51. Mirzoeva O, Calder P. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1996;55(6):441-9.
52. Ozturk F, Kurt E, Cerci M, Emiroglu L, Inan UU, Turker M, Ilker SS The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. *Ophthalmic Res.* 2000;32(1):13-18.
53. Ponce De León R, Benítez P. Estudio morfológico comparativo del efecto de la Propolina, el alcohol y el bálsamo de Shostakoski como agentes cicatrizantes. *Investigaciones Cubanas sobre el Propóleos. Memorias del I Simposio sobre los efectos del propóleos en la salud humana y animal.* Ed: Asís M. La Habana 1991:157-160.
54. Fierro W, López J. Evaluación clínica de una nueva formulación hipoalergénica de propóleos en apósitos. In: X Congreso Latinoamericano de Cirugía. Punta Del Este-Uruguay. 1993.
55. Torres Suárez R. y col. Propóleos en quemados. In: IV Simposio de propóleos. La Habana Cuba. 1996.
56. Rudzki E, Rebandel P, Jaworski E. Comparison of the eliciting properties of 3 different propolis samples. *Contact Dermatitis.* 1998;39(3):142-3.
57. Mescon H, Grots I. Piel. In: Robbins S, editor. *Patología estructural y funcional.* 1ª ed. México: Nueva Editorial Interamericana;1975:cap 30.
58. Ramírez M. Propóleos en el tratamiento de quemados. *Primeras Jornadas de Asistencia Integral del niño quemado* 1989.
59. Gallenkemper G, Rabe E, Bauer R. Contact sensitization in chronic venous insufficiency: modern wound dressings. *Contact Dermatitis* 1998;38(5):274-8.

60. Kivalkina V. Reacción plasmocitaria en los ratones albinos inmunizados con antígeno asociado con Propóleos. In: Propóleos. Ed. Apimondia, Bucarest 1975:80-83.
61. Kivalkina V. Influencia del propóleos en la inmunogénesis, en caso de inmunización con antitoxina tetánica. In: Propóleos. Ed Apimondia, Bucarest 1975:77-79
62. De Los Reyes Rodríguez. Estudio del efecto inmunorregulador de un medicamento elaborado a base de propóleos en niños con trastornos de la inmunidad. In: 1er Taller Internacional de Apiterapéuticos La Habana, Cuba. 1991.
63. Bidot C y col. Ensayo terapéutico con propóleos en inmunodeficientes. Hospital pediátrico Centro Habana. 1er Taller Internacional sobre Apiterapéuticos. Cuba 1989.
64. Aleksandrov IS. Cualidades antimicrobianas del Propóleos. Propóleos 1975:43-44.
65. Neychev H, and col. Immunomodulatory action of propolis. Acta Microb-Bulg1988;23:58-61
66. Márquez N, Sancho R, Macho A, Calzado M, Fiebich B, and Muñoz E. Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits T-Cell Activation by Targeting Both Nuclear Factor κ B in Activated T-Cells and NF- κ B Transcription Factors. Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics Fast Forward. First published on November 14, 2003; DOI: 10.1124/jpet.103.060673
67. Silvestre N, Stranieri G y Bazerque P. Anestesia troncular de propóleos comparado con lidocaína. International Dental Research 1984.
68. Lorenzo J y col. Propóleos: evaluación de efectos cardiovasculares y toxicológicos. Depto. de Farmacología y terapéutica. Fac. de Medicina-Uruguay 1984.
69. Lebeda D. La Propolis produit non toxique. In: III Simposio Internacional de Apiterapia Yugoslavia. Ed. Apimondia Bucarest; 1978:78-80.
70. Hollands I y col. Estudio de la toxicidad subcrónica del Propóleos Cubano. In: Investigaciones cubanas sobre el propóleos. Ed. Asís M. Cuba 1988:94.100
71. Mandado S y col. Observaciones ultra estructurales en los hepatocitos de ratones tratados con Propolisina y de sus controles alcohólicos y acuosos. Investigaciones cubanas sobre el Propóleos. Ed. Asís M. La Habana 1988:221-230.
72. Tribble D. Asesoramiento científico de la AHA. Consumo de antioxidantes y riesgo de enfermedad coronaria: énfasis en la vitamina C, la vitamina E y los beta-carotenos. Circulation 1999;99:591-595.
73. Pascual C, Gonzalez R, Torricella R. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. J. of Ethnopharmacology 1994;41:9-13.

74. Rapta P, Misik V, Stasko A, And Vrabel I. Redox Intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;18(5):901-908.
75. Volpert R, Elstner E. Biochemical activities of propolis extracts. I. Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C. Journal of Biosciences*. 1993;48(11-12):851-858.
76. Volpert R, Elstner E. Biochemical activities of propolis extracts. II. Photodynamic activities. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C. Journal of Biosciences*. 1993;48(11-12):858-862.
77. Shigenori Kumazawa S, Hamasaka T and Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84 (2004) 329–339.
78. Harborne J and Williams C. Review: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55 (2000):481-504.
79. Havsteen, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol*. 1983;32:1141-1148.
80. Erma A, Jonson J, Gould M, Tanner M. Inhibition of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene and N-nitrosomethylurea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetina. *Cancer Res*. 1988;48:5754-5788.
81. Hertog M, Hollman P, Katan M. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Neterlands. *J Agric Food Che*. 1992;40:2379-2383.
82. Rice-Evans C, Miller N, Paganga J. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant. Science* 1997;2:152-159.
83. Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, and col. Apoptosis and suppression of tumor growth by artrepillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev* 1998;22(6):506-15.
84. Hirota M, Matsuno T, Fujiwara T, Sugiyama H, Mineshita S. Enhanced cytotoxicity in a Z-photoisomer of a benzopyran derivative of propolis. *J Nat Prod* 2000;63(3):366-70.
85. Ilhan A, Akyol O, Gurel A, Armutcu F, Iraz M, Oztas E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. *Free Radic Biol Med*. 2004 Aug 1;37(3):386-94.
86. Keiichi Hishikawa, Toshio Nakaki and Toshiro Fujita. Oral Flavonoid Supplementation Attenuates Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice- *Arterioscler Tromb Vasc Biol*. 2005;25:442-446.

Capítulo III

Producción de propóleos argentinos

Origen botánico de los propóleos argentinos

En el marco del Proyecto “Caracterización físico química de propóleos argentinos y sus extractos” se realizó un trabajo para corroborar las observaciones efectuadas por técnicos locales del PROAPI en dos zonas de la República Argentina, sobre la preferencia de las abejas para forrajear resinas desde ciertos vegetales. Se compararon los espectros de absorción ultravioleta de los extractos de las plantas con los de los propóleos producidos (1).

La espectrofotometría de absorción molecular en el ultravioleta es utilizada en el análisis de propóleos pues éste posee compuestos que absorben radiación en esa zona del espectro: ácidos aromáticos y alifáticos, sus ésteres, alcoholes aromáticos, aldehídos, flavonoides, chalconas, dihidrochalconas (2). Si bien esta técnica presenta limitaciones, es frecuentemente aplicada en el estudio de compuestos orgánicos, a longitudes de onda superiores a 185 nm para evitar la interferencia de los componentes del aire (3). En los espectros resultantes, la absorción a una determinada longitud de onda es la suma de las absorciones de cada uno de los componentes individuales.

Las zonas consideradas en el trabajo fueron:

Delta del Río Paraná: Las muestras se recolectaron en el INTA E.E.A. Delta del Paraná, ubicado en el Bajo Delta sobre el Río Paraná de las Palmas, en la cuarta sección de islas del Delta Bonaerense. La principal actividad productiva en este sector del Delta es la forestación de Salicáceas (*Salix spp.* y *Populus spp.*), formando la mayor superficie plantada en el mundo con estas especies. Constituyen una importante fuente de recursos para las abejas (polen y néctar en el primer caso y resinas en el segundo). La apicultura trashumante es una de las características más notorias de la región, que recibe colmenas de las provincias de Entre Ríos, La Pampa, Córdoba, Santa Fe y otros sectores de la provincia de Buenos Aires para la obtención de núcleos. En general solamente los apicultores instalados en los sectores de islas, diversifican su producción con la obtención de propóleos (4).

Datos preliminares mostraron que el pico invernal de producción de propóleos coincidía con el momento de mayor producción de resinas en las yemas de guías y ejemplares adultos de álamos ubicados en las proximidades. Las yemas se extrajeron de guías de un año, de distintos clones de álamo (*Populus deltoides*) c.v.: Stoneville 67, Stoneville 71, Stoneville 91, Rosedale 8, y 125-60, producidas en estaqueros de la E.E.A Delta del Paraná. El estaquero es la forma de multiplicación de material que utilizan tanto los productores forestales como los viveros que proveen el material de plantación.



Foto 1. Yema de *Populus deltoides* exudando resinas
(Autor: Dra. Laura Gurini – INTA E.E.A. Delta del Paraná)

Amaicha del Valle: Se encuentra ubicada en la provincia de Tucumán y pertenece a la zona del Valle Calchaquí, que es una unidad fitogeográfica, ubicada en el Noroeste de la República Argentina. Se extiende longitudinalmente de Sur a Norte tomando parte de las provincias de Catamarca, Tucumán y Salta. Se trata de un valle de altura con 1600 m.s.n.m. en las partes más bajas y 2900 m.s.n.m. en las más altas. El clima del valle es del tipo árido, con precipitaciones medias de 200 mm anuales y humedad relativa de 56%. La temperatura media anual es de 16° C, con valores extremos de 39 °C y -12°C.

La vegetación es del tipo arbustiva, donde se destacan especies como: brea (*Cercidium praecox*), jarilla macho (*Larrea divaricata* Cav.), jarilla hembra (*Larrea cuneifolia* Cav.), poposa (*Zuccagnia punctata* Cav.), churqui (*Acacia caven*) y atamisqui (*Atamisquea emarginata*). En los lugares con mayor disponibilidad de agua se desarrolla un estrato arbóreo caracterizado por la presencia de algarrobos (*Prosopis spp*), tuscas (*Acacia aroma*), arcas (*Acacia visco*), chañar (*Geoffraea decorticans*) y talas (*Celtis tala*). También durante la época lluviosa se desarrolla un estrato herbáceo de especies del género *Stipa*, *Aristides*, *Setaria*, *Eragrostis* (5).

Se tomaron muestras de hojas y tallos de jarilla macho, jarilla hembra y poposa, que de acuerdo a observaciones previas serían las plantas preferentemente visitadas por las abejas para recolectar resinas.



Foto 2. Hojas de *Zuccagnia punctata* Cav. exudando sustancias resinosas



Foto 3. Detalle del exudado resinoso de *Zucagnia punctata* Cav.

En las dos zonas, el propóleos se obtuvo de colmenas provistas con mallas plásticas para la recolección, procediéndose de acuerdo al protocolo elaborado por el PROAPI (6) y estaban ubicadas en los alrededores de donde se encontraban los vegetales objeto del estudio. El material vegetal (yemas, tallos y hojas) se secó a 50 °C y se colocó en bolsas plásticas rotuladas. Ambos tipos de muestras se almacenaron protegidas del calor y luz directa hasta que se enviaron al Laboratorio de Agroindustrias-PROAPI en la E.E.A. Famaillá. Los propóleos se procesaron de acuerdo a la Norma IRAM-INTA 15935-1 (7). Las yemas, tallos y hojas se trituraron en mortero, se colocaron en un extractor Soxhlet y se agregó etanol para obtener los extractos.

Se utilizó un espectrofotómetro HP 8452A con software UV-VIS ChemStation Rev A 02.05 y cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico para medir la absorción de los extractos diluidos y obtener picos de absorbancia en el orden de 0,6 a 0,8, en el rango de longitudes de onda desde 240 a 420 nm. Los espectrogramas obtenidos se normalizaron para facilitar la interpretación y comparación.

Resultados obtenidos

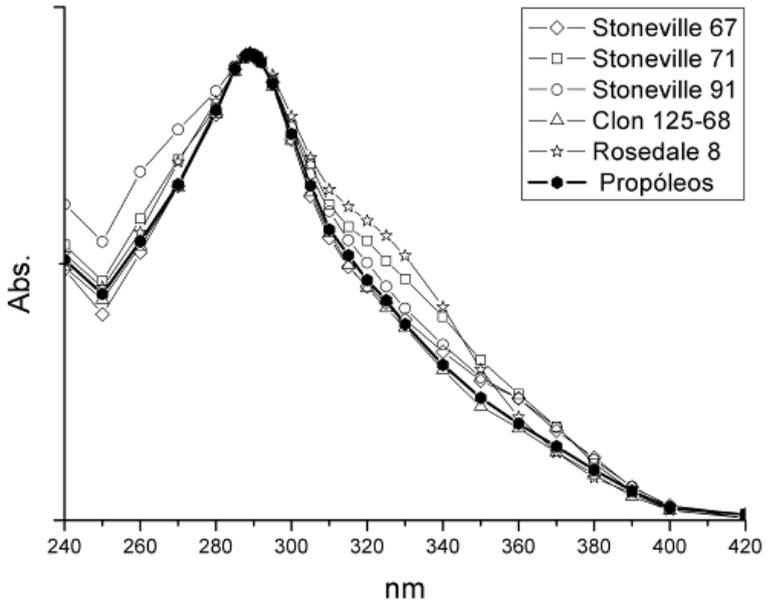


Fig 1. Espectrogramas de resinas de yemas de álamos y propóleos de la zona del Delta del Río Paraná.

Tabla 1. Parámetros característicos de resinas de yemas de álamos y propóleos de la zona del Delta del Río Paraná, obtenidos de los espectrogramas.

Muestra	Pico principal [nm]	Valle [nm]
Populus deltoides c.v. Stoneville 67	289 ± 2	250 ± 2
Populus deltoides c.v. Stoneville 71	289 ± 2	250 ± 2
Populus deltoides c.v. Stoneville 91	289 ± 2	250 ± 2
Populus deltoides c.v. Rosedale 8	289 ± 2	250 ± 2
Populus deltoides c.v. 125-60	289 ± 2	250 ± 2
Propóleos (*)	289 ± 2	250 ± 2

(*) Resultado promedio de 5 muestras

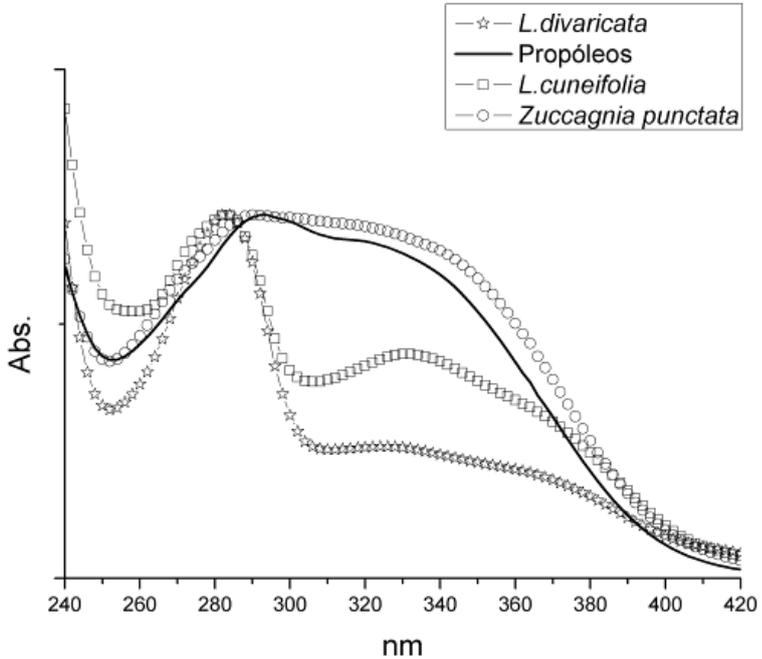


Fig 2. Espectrogramas de resinas de *L.divaricata*, *Zuccagnia punctata*, *L.cuneifolia* y propóleos de la zona de Amaicha del Valle.

Tabla 2. Parámetros característicos de *L.divaricata*, *Zuccagnia punctata*, *L.cuneifolia* y propóleos de la zona de Amaicha del Valle, obtenidos de los espectrogramas

Muestra	Pico principal [nm]	Valle [nm]
Larrea divaricata	284 ± 2	252 ± 2
Zuccagnia punctata	290 ± 2	252 ± 2
Larrea cuneifolia	282 ± 2	260 ± 2
Propóleos (*)	292 ± 2	250 ± 2

(*) Resultado promedio de 5 muestras

De acuerdo a los espectrogramas obtenidos y a sus parámetros característicos se puede concluir que para el caso de la zona del Delta del Paraná, los álamos serían la principal fuente de resinas para elaborar el propóleos, sin embargo con la técnica utilizada no se puede determinar el aporte relativo de los diferentes clones.

Para el caso de Amaicha del Valle, los principales aportes de resinas serían de las tres especies estudiadas, evidenciándose una mayor similitud entre los espectrogramas y parámetros característicos de propóleos y *Zuccagnia punctata* por sobre las otras dos, corroborándose por lo tanto, las observaciones previamente efectuadas acerca del origen botánico de los propóleos en dos zonas de la República Argentina. No obstante, a pesar que la espectrofotometría ultravioleta permite obtener información y efectuar inferencias de una manera rápida y simple, es necesario aplicar otras técnicas de análisis para confirmar con certeza el origen botánico de los propóleos.

Incidencia de la flora introducida

Como se indicó anteriormente, las abejas prefieren recolectar exudados de yemas de álamos por sobre otros vegetales. Esta situación pudo verificarse a través del análisis de muestras de propóleos provenientes de la ciudad de Cafayate, provincia de Salta. La zona se encuentra también en la región de los Valles Calchaquíes y los propóleos normalmente presentan curvas de absorción en el UV similares a las obtenidas para los propóleos de Amaicha del Valle. No obstante en la zona se han introducido numerosas plantaciones de álamos, generalmente utilizadas como cortinas rompevientos.



Foto 4. Vista de la zona de Las Conchas (Cafayate-Salta) donde predomina la vegetación autóctona

Esto ha determinado que los espectrogramas UV resulten anómalos y se asemejen a los encontrados en otras regiones donde abundan los álamos, como se muestra en la Fig. 3, donde se muestran los espectros normalizados correspondientes a las muestras N°201 y N°279 cosechadas de colmenas ubicadas en las cercanías de la ciudad y en la localidad de Las Conchas, distante a 25 km del centro de la ciudad, respectivamente, donde predomina la vegetación autóctona.

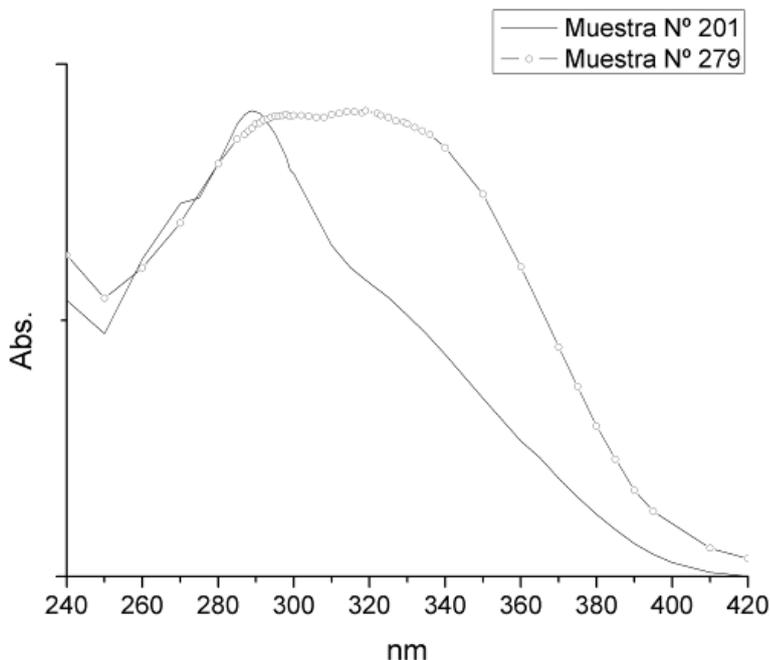


Fig. 3. Espectros de absorción UV normalizados, de muestras de propóleos de Cafayate

La diferencia en los espectrogramas de ambas muestras puede observarse claramente. A continuación se muestra un resumen de los resultados analíticos.

Tabla 3. Características organolépticas y análisis físico químico de muestras de propóleos de Cafayate

	Nº 201	Nº 279	
Caracterización organoléptica			
Aspecto:	Trozos irregulares con brillo	Trozos irregulares opacos	
Consistencia:	Blanda	Muy blanda	
Impurezas visibles:	Virutas de madera - Partes de abejas - Cera obrada - Restos vegetales - Capullos de polilla de cera	Virutas de madera - Partes de abejas - Cera obrada - Restos vegetales.	
Color:	Amarillo - Marrón verdoso amarillento	Marrón amarillento - Marrón verdoso amarillento	
Olor:	Resinoso aromático	Resinoso muy aromático	
Sabor:	Picante	Picante	
Análisis Físico – Químico			
Humedad:	5,28	6,57	%
Cera:	27,09	13,67	%
Resinas Totales:	64,69	66,22	%
Impurezas mecánicas:	5,72	16,19	%
Cenizas:	2,71	4,39	%
Fenoles Totales:	15,76	14,60	% (expresado como ácido gálico equivalente)
Flavonoides Totales:	5,93	11,54	% (expresado como quercetina dihidrato)
Absorbancia máxima (270 nm - 315 nm):	Positivo	Negativo	

En la Tabla se aprecia que la muestra Nº 279 recolectada en la zona de Las Conchas presenta un mayor contenido de flavonoides y una mayor relación Flavonoides/Fenoles totales que la Nº 201 donde se supone existe influencia de la vegetación introducida, principalmente álamos.

Factores que condicionan la producción

La cantidad de propóleos que produce una colmena depende del comportamiento pecoreador (de recolección) de resinas de la colonia y de la vegetación circundante. *Apis mellifera* recoge mayor cantidad de resinas de brotes de árboles, principalmente álamo, sauce, coníferas, etc., pero también lo hace a partir de especies autóctonas.

La bibliografía al respecto es escasa y por lo tanto la información resulta imprecisa, pero podemos considerar que mediante los métodos tradicionales de raspado es posible la obtención de 100 a 200 gramos de propóleos anualmente, mientras se pueden alcanzar hasta 500 gr. con el método de mallas, mejorando la calidad sin incrementar demasiado los costos de producción.

Otro factor a considerar es el genético, ya que se ha comprobado que en un apiario donde se utiliza el mismo ecotipo (Material vivo certificado, con genética PROAPI), la cantidad de propóleos recolectado por colmena puede variar, independientemente del método de producción utilizado. En la Figura a continuación se muestran los resultados obtenidos en el ensayo implantado en Leales, provincia de Tucumán.

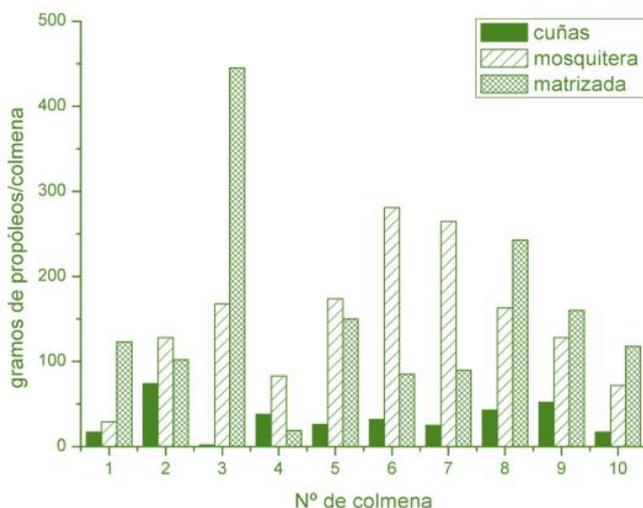


Figura 4. Variación del propóleos recolectado por colmenas de un apiario y por diferentes métodos.

La Figura muestra la marcada diferencia en la cantidad de propóleos recolectado por diferentes colmenas para cada uno de los tratamientos. Resultados similares se obtuvieron en los ensayos de otras zonas de Argentina. Mas detalles acerca de los ensayos se presentan en las secciones siguientes. Si bien la cantidad, composición y calidad del propóleos depende del tipo de flora, del ambiente y genética utilizada; es decisivo en este sentido el trabajo del apicultor. La calidad del producto resultante estará directamente relacionada con el método de cosecha, el almacenamiento y la conservación.

Métodos de producción y cosecha

Los más difundidos en nuestro país, son los tres que se describen a continuación y fueron evaluados en el ensayo implementado en diferentes zonas del país, como se enunció anteriormente.

1. Método artesanal o de raspado

En forma natural las abejas elaboran propóleos para utilizarlo en las colmenas y para recolectarlo el apicultor debe raspar las partes donde fue depositado. Para obtener una mayor cantidad se recurre a la incentivación, que consiste en emplear elementos que se colocan entre las alzas (por ejemplo cuñas de madera), ya que cuando se producen grietas o roturas, las abejas las cierran con propóleos.

Este método presenta inconvenientes y desventajas relacionados por un lado con aspectos de manejo del apiario (favorece el pillaje) y por otro con la calidad del producto obtenido ya que está más expuesto a contaminaciones. No obstante, en caso de emplearse, se recomienda tener en cuenta los siguientes aspectos: retirar las alzas y cuadros al preparar las colmenas para la invernada, ya que se aprovecha ese momento para confinar la colonia al menor espacio posible y transportar el material excedente al taller del apicultor. Además en esa época la temperatura baja facilita la separación del propóleos de la madera y el estado rígido de la resina limita la posible contaminación con trozos de madera, abejas y otros contaminantes macroscópicos. Es recomendable utilizar una espátula de acero inoxidable, sin mucho filo para reducir el riesgo de arrastrar virutas de madera. Cuidar de no raspar donde haya pintura, pues ésta es uno de los mayores responsables de la contaminación del propóleos y es fácilmente detectable.

Se debe recolectar el propóleos que se encuentra en las superficies interiores de la colmena: tapa, cuadros y cajas, desechando el que se encuentra en el piso y piquera, pues generalmente está muy contaminado. La recolección se debe realizar con las manos y espátula libres de restos de miel, tierra o cualquier otra sustancia que pueda contaminarlo. No exponer el propóleos a la incidencia directa de los rayos solares, evitándose su almacenamiento cerca de fuentes de calor como el ahumador. Por lo antedicho, si se pretende producir propóleos de calidad, es recomendable utilizar alguno de los métodos de mallas, que se describen a continuación.

2. Método de mallas.



Foto 5. Mallas matrizadas con propóleos.

Mallas matrizadas: son placas de material plástico de diferentes procedencias y dimensiones (las utilizadas en los ensayos fueron de 41 x 25 cm. y aprox. 0,4 cm de espesor, en las cuales se encuentran estampadas las ranuras donde se depositará el propóleos.

Una vez que las abejas hicieron el trabajo, se procede a retirar las mallas y cosechar el propóleos.

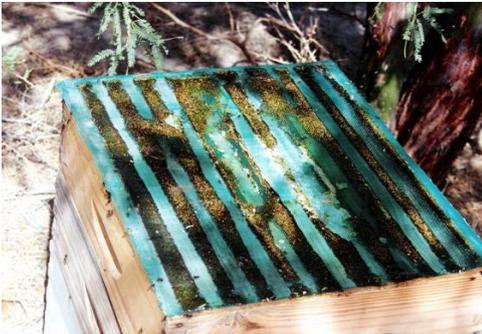


Foto 6. Malla de tejido tipo mosquitero con propóleos.
(Autor: Ing. Carlos Segura. INTA-UEyEA Valles Calchaquís)

Mallas de tejido mosquitero plástico: consiste en la utilización de un tejido de hilos plásticos de 55 x 45 cm que se termosella en los bordes antes de comenzar a usar. Recordar que no sirven las metálicas porque pueden contaminar el propóleos y las de fibra de vidrio a tienden romperse durante el manipuleo.

Es útil colocar estas últimas en forma simétrica sobre el ancho del alza, y luego de algunas semanas moverlas hacia el otro extremo, de modo de incentivar a las obreras a que se enfrenten a los nuevos espacios vacíos y depositen mayor cantidad.

Cualquiera de las mallas que se vayan a utilizar pueden ser colocadas y retiradas en cualquier época del año, en función de la curva de recolección para la zona considerada. Pese a tratarse de resultados preliminares, mas adelante en este capítulo, se presenta información que puede ayudar al respecto. Para retirar el propóleos se puede congelar entre -10° y -20°C durante por lo menos una hora lo que torna a la resina rígida y frágil, fácil de separar de la malla mediante "manipuleo".

En general, se debe evitar que el propóleo se compacte y para lograrlo no se debe comprimir con las manos para formar pelotas, por el contrario, se debe mantener granulado, en formas de escamas y/o trozos sueltos.

Los propóleos procedentes de diferentes zonas de recolección no se deben mezclar y es conveniente elaborar una ficha con la mayor cantidad de información posible, para cada caso.

Características de los propóleos de diferentes regiones de Argentina

Se analizaron las características físico-químicas y organolépticas del propóleo argentino, en base a los resultados del análisis de 197 muestras recogidas durante el Proyecto de Caracterización físico-química de Propóleos Argentinos y sus extractos.

Las características físicoquímicas del propóleo dependen en gran medida de la flora de cada región, ya que como se mencionó anteriormente las abejas forrajean las resinas disponibles para elaborarlo (2). Para el estudio del propóleo argentino se consideraron seis regiones geográficas: NOA, NEA, Cuyo, Centro, Buenos Aires y Patagonia. A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada región.

Región NOA: abarca las provincias de: Jujuy, Salta, Catamarca, Tucumán, Sgo. del Estero. Incluye las regiones fitogeográficas: Desierto andino, Selva Tucumano Boliviana, Parque Chaqueño (occidental) y Monte occidental.

Se analizaron 63 muestras de propóleos provenientes de la región. En la Tabla 4 se muestran los caracteres organolépticos y en Tabla 5 los parámetros de composición química.

Tabla 4. Características organolépticas de propóleos del NOA

Color	Marrón
Olor	Resinoso suave, algunas muestras mas aromáticas.
Sabor	Amargo y picante, en algunos casos insípido.
Consistencia	Blanda

Tabla 5. Composición química de propóleos del NOA

Parámetro	Valor medio [% p/p]	Error estándar
Humedad	6,22	0,31
Cera	45,17	2,21
Resinas	35,48	2,12
Impurezas mecánicas	14,62	0,69
Cenizas	3,94	0,47
Fenoles	11,92	0,83
Flavonoides	4,93	0,61
Relación fenoles/resina	0,33	0,02
Relación flavon./fenoles	0,40	0,03

Región NEA: Incluye las provincias de: Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes, Entre Ríos y norte de la pcia de Sta Fé. En ella encontramos las siguientes regiones fitogeográficas: Parque Chaqueño, Parque mesopotámico y Selva Misionera. Se analizaron 21 muestras provenientes de la Región. En la Tabla 6 se muestran los parámetros organolépticos y en la 7 la composición química.

Tabla 6. Características organolépticas de propóleos del NEA

Color	Marrón oscuro a negro
Olor	Resinoso suave.
Sabor	Picante, en algunos casos insípido.
Consistencia	Blanda

Tabla 7. Composición química de propóleos del NEA

Parámetro	Valor medio [% p/p]	Error estándar
Humedad	6,01	0,35
Cera	57,83	2,71
Resinas	19,29	2,89
Impurezas mecánicas	17,06	1,38
Cenizas	3,77	1,13
Fenoles	4,96	0,96
Flavonoides	1,13	0,57
Relación fenoles/resina	0,21	0,02
Relación flavon./fenoles	0,15	0,04

Región de Cuyo: Integrada por las provincias: La Rioja, San Juan, Mendoza. Incluye las regiones fitogeográficas: Desierto andino y Monte occidental. Se analizaron 36 muestras . En la Tabla 8 se muestran los parámetros organolépticos y en la 9 la composición química.

Tabla 8. Características organolépticas de propóleos de Cuyo

Color	Marrón claro - Tintes castaño rojizo - Marrón verdoso amarillento
Olor	Resinoso aromático.
Sabor	Picante.
Consistencia	Dura

Tabla 9. Composición química de propóleos de Cuyo

Parámetro	Valor medio [% p/p]	Error estándar
Humedad	3,59	0,57
Cera	24,60	2,00
Resinas	65,57	1,83
Impurezas mecánicas	5,28	0,43
Cenizas	3,41	0,45
Fenoles	21,91	0,78
Flavonoides	12,58	0,76
Relación fenoles/resina	0,33	0,01
Relación flavon./fenoles	0,57	0,02

Región Central: Abarca la provincia de Córdoba, Centro y Sur de Santa Fé. Incluye las regiones fitogeográficas: Parque Chaqueño y Estepa pampeana. Se analizaron 9 muestras de propóleos provenientes de la región. En la Tabla 10 se muestran los parámetros organolépticos y en la 11 la composición química.

Tabla 10. Características organolépticas de propóleos de la Región Central

Color	Marrón oscuro a negro
Olor	Resinoso
Sabor	Amargo y en algunos casos insípido
Consistencia	Blanda

Tabla 11. Composición química de propóleos de la Región Central

Parámetro	Valor medio [% p/p]	Error estándar
Humedad	4,32	0,44
Cera	64,64	4,88
Resinas	19,62	5,98
Impurezas mecánicas	12,14	1,31
Cenizas	2,79	0,27
Fenoles	6,00	2,12
Flavonoides	2,29	1,04
Relación fenoles/resina	0,29	0,08
Relación flavon./fenoles	0,34	0,11

Provincia de Buenos Aires: Cubre la mayor parte de la estepa pampeana. Se analizaron 67 muestras de propóleos . En la Tabla 12 se muestran los parámetros organolépticos y en la 13 la composición química.

Tabla 12. Características organolépticas de propóleos de Buenos Aires

Color	Marrón claro - Tintes rojizos - Amarillo rojizo
Olor	Resinoso aromático
Sabor	Dulce
Consistencia	Blanda

Tabla 13. Composición química de propóleos de Buenos Aires

Parámetro	Valor medio [% p/p]	Error estándar
Humedad	4,78	0,24
Cera	24,54	1,30
Resinas	64,96	1,45
Impurezas mecánicas	6,07	0,66
Cenizas	1,91	0,31
Fenoles	21,59	0,59
Flavonoides	9,18	0,36
Relación fenoles/resina	0,33	0,01
Relación flavon./fenoles	0,43	0,02

Región Patagónica: Integrada por las provincias de Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego. Incluye las regiones fitogeográficas: Bosques

Se analizaron 28 muestras de la región . En la Tabla 14 se muestran los parámetros organolépticos y en la 15 la composición química.

Tabla 14. Características organolépticas de propóleos de la región Patagónica

Color	Marrón amarillento
Olor	Resinoso aromático
Sabor	Picante, y algunas muestras insípidas
Consistencia	Blanda

Tabla 15. Composición química de propóleos de la región Patagónica

Parámetro	Valor medio [% p/p]	Error estándar
Humedad	3,48	0,63
Cera	69,11	3,97
Resinas	21,13	3,89
Impurezas mecánicas	4,96	0,53
Cenizas	1,53	0,20
Fenoles	5,54	1,48
Flavonoides	1,55	0,41
Relación fenoles/resina	0,21	0,02
Relación flavon./fenoles	0,31	0,02



Región NOA



Región NEA



Provincia de Buenos Aires



Región de Cuyo



Región Central



Región Patagónica

Foto 7. Propóleos de diferentes regiones de la República Argentina

Diferencias y similitudes entre las regiones

Analizando los valores obtenidos, se observa que los propóleos del NEA y la región Central presentaron los valores mas altos de contenido de cera, en tanto que los de Cuyo y Buenos presentaron una mayor concentración de resinas, seguidos por los de la Región NOA. En lo que respecta a impurezas mecánicas los mayores valores se obtuvieron en las muestras pertenecientes a las regiones del NEA, NOA y Central. En principio, estos parámetros son de importancia si se considera que el propóleos debe ser procesado para lograr su aprovechamiento y como se verá mas adelante en este capítulo, generalmente se recurre a procesos extractivos, consistentes en separar, recuperar y preservar la fracción correspondiente a las resinas (donde se encuentran los compuestos bioactivos) de la cera e impurezas.

Por otra parte, se compararon estadísticamente el contenido de fenoles, flavonoides y la relación entre ambos para establecer si existen diferencias significativas entre las regiones. Los resultados fueron analizados por ANOVA y cuando se encontraron diferencias entre las medias se realizó el test de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de significación del 5%.

Considerando el contenido de fenoles totales (valor medio) para las regiones se obtuvo el siguiente resultado:

Tabla 16. Análisis estadístico del contenido de fenoles totales por región

Región	Valor medio de fenoles totales [% p/p]	Desviación estándar	Grupos homogéneos
NOA	11,92	6,44	B
NEA	4,96	4,93	C
Cuyo	21,91	4,69	A
Centro	6,00	6,37	C
Buenos Aires	21,59	4,86	A
Patagonia	5,54	7,84	C

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas según el test de Tukey ($P < 0,05$).

El análisis estadístico indica que las regiones de Cuyo y Buenos Aires presentan el mayor contenido de fenoles totales y que no existen diferencias significativas entre ambas. El menor contenido de fenoles se encuentra en las regiones del NEA, Centro y Patagonia, no detectándose diferencias entre estas tres. Por otra parte, la región NOA es diferente a las cinco restantes, y tiene un contenido de fenoles intermedio entre las tres más bajas (NEA, Centro y Patagonia), y las dos más altas (Cuyo y Buenos Aires).

La Tabla a continuación permite comparar el contenido de flavonoides totales de las distintas regiones.

Tabla 17. Análisis estadístico del contenido de flavonoides totales por región

Región	Valor medio de flavonoides totales [% p/p]	Desviación estándar	Grupos homogéneos
NOA	4,93	4,82	A
NEA	1,13	2,28	B
Cuyo	12,58	4,54	C
Centro	2,29	2,76	AB
Buenos Aires	9,18	2,89	D
Patagonia	1,55	2,19	B

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas según el test de Tukey ($P < 0,05$).

El test de comparaciones múltiples de Tukey muestra que la región de Cuyo presenta el mayor contenido de flavonoides totales, y significativamente diferente al resto de las regiones, luego le sigue Buenos Aires, que también se diferencia de las restantes 5 regiones. Continuando con valores decrecientes, tenemos la región NOA que no se diferencia estadísticamente de la región Centro, pero sí de las otras cuatro regiones. Finalmente los valores más bajos de flavonoides corresponden a las regiones NEA, Centro y Patagonia, que no presentan diferencias significativas entre sí.

La Figura a continuación permite observar la distribución de los valores en un diagrama de cajas.

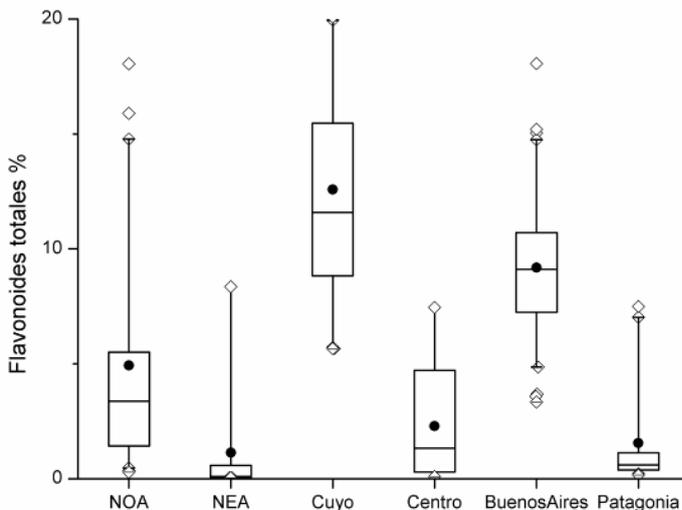


Figura 5. Diagrama de cajas para el contenido de flavonoides totales por región.

Los círculos pintados en negro indican el valor medio, el límite inferior de la caja representa el primer cuartil de datos, la línea interior a la mediana, el límite superior al tercer cuartil, el límite inferior del segmento el límite de confianza al 5% y el superior, el límite al 95%, mientras que los rombos indican los puntos exteriores al intervalo de confianza del 90%.

Discusión de los resultados

El contenido de fenoles totales se ubicó entre 4,96% y 21,91% (Tabla 16), dentro del rango encontrado por Bonvehí y Coll (8) para propóleos de Brasil, Uruguay y China. En la región del NEA se encontró un contenido de Fenoles Totales inferior a las otras regiones, pero similar al reportado por Woisky y Salatino (9), quienes trabajando con las mismas técnicas analíticas determinaron para seis regiones de Brasil un contenido de Fenoles Totales que fluctuó entre 3,49% y 6,71%.

El contenido de flavonoides se ubicó entre 1,13% para la región NEA y 12,53% para la región de Cuyo (Tabla 17). Los valores encontrados en la regiones de Buenos Aires y Cuyo son superiores a los reportados por Bonvehí y Coll (8). Para el caso del NEA resultan similares a los reportados por Woisky y Salatino (9) para propóleos de Brasil, con valores de entre 0,77% y 2,69%.

La Figura 5 muestra el promedio y la variabilidad del contenido de flavonoides para las distintas regiones. La importancia de estos compuestos se analiza con más profundidad en el Capítulo II y Anexo 1. Como puede observarse en la Figura, y se discute ampliamente en este libro, el contenido de flavonoides es diferente en las distintas regiones, pero a su vez existe una gran variabilidad dentro de cada región como puede demostrarse mediante un test de homogeneidad de varianza. Puede observarse además que en los lugares donde el contenido de flavonoides es mayor, también aumenta la variabilidad entre las muestras. Resulta indispensable profundizar dicha variabilidad y conocer su origen para poder avanzar en la estandarización de los productos obtenidos, asegurando un mejor aprovechamiento de sus propiedades.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el propóleo argentino presenta un elevado contenido de compuestos biológicamente activos como fenoles y flavonoides, existiendo diferencias significativas entre regiones, lo que sustenta la necesidad de estandarizar los diferentes tipos de propóleos. (10)

Ensayos de producción en diferentes zonas de la República Argentina. Evaluación de métodos de recolección y cosecha.

Si bien no se trató de un objetivo específico del proyecto, la información obtenida permite realizar una primera aproximación a la curva de producción de propóleos a lo largo del año, en diferentes regiones para los distintos métodos evaluados. Para tal fin se cosechó el producto recolectado en los tratamientos: a. con cuñas separadoras, b. con mallas tipo mosquitera, c. con mallas matrizadas.

A continuación se presentan los resultados correspondientes a las zonas de Leales (Tucumán), Calingasta (San Juan), Río Turbio (Santa Cruz), Valle de Uco (Mendoza), Delta del Paraná (Buenos Aires) y Gualeguaychú (Entre Ríos).

Ensayo en Leales - Tucumán

Las especies vegetales de la zona se corresponden con las características del Parque Chaqueño más el aporte de algunas especies introducidas como Eucapiltos. En la Figura 6 se muestran los pesos promedio obtenidos por colmena en cada tratamiento, mientras que en la Figura 7 se muestran los pesos acumulados por colmena.

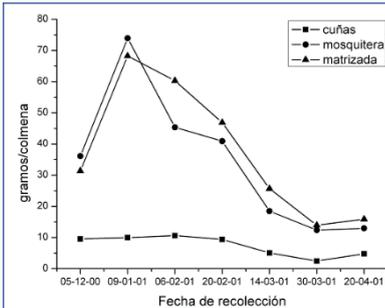


Figura 6. Propóleos recolectados por cada método

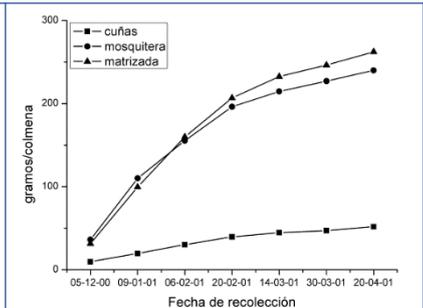


Figura 7. Peso (acumulado) de propóleos recolectado por cada método

El Análisis de Varianza demuestra que la cantidad de propóleos recolectado en los dos métodos de malla son significativamente mayores que el obtenido por raspado, y que no existen diferencias estadísticas entre la cantidad recolectada entre ambas mallas (11). Se observa un pico de producción entre los meses de enero y febrero, que se produce después de la entrada principal de néctar. Esto podría deberse a varios factores como ser: capacidad ociosa de forrajeo al interrumpirse la entrada de néctar, oferta de resinas del medio, etc. El análisis químico del propóleos obtenido muestra los siguientes resultados:

Tabla 18. Resultados analíticos de propóleos obtenidos con el método de cuñas

Fecha	Ceras [% p/p]	Resinas [% p/p]	Impurezas [% p/p]	Fenoles [% p/p]	Flavonoides [% p/p]
05/12/2000	39,00	38,72	13,12	9,84	3,99
09/01/2001	37,77	36,01	19,35	12,98	4,65
06/02/2001	50,72	19,38	23,69	6,42	2,43
20/02/2001	38,43	40,20	13,55	11,66	5,51
14/03/2001	39,89	31,67	22,55	16,75	4,79
30/03/2001	nd	nd	nd	nd	nd
20/04/2001	54,78	18,51	20,76	6,88	2,25

Tabla 19. Resultados analíticos de propóleos obtenidos con el método de mallas mosquiteras

Fecha	Ceras [% p/p]	Resinas [% p/p]	Impurezas [% p/p]	Fenoles [% p/p]	Flavonoides [% p/p]
05/12/2000	59,38	28,33	6,57	3,84	1,75
09/01/2001	54,07	32,25	9,14	4,17	1,40
06/02/2001	69,04	13,06	14,72	2,49	0,80
20/02/2001	56,67	16,98	10,83	2,51	1,27
14/03/2001	80,16	5,85	10,45	1,65	0,63
30/03/2001	76,54	7,31	13,04	1,82	0,50
20/04/2001	74,21	6,33	15,34	1,09	0,28

Tabla 20. Resultados analíticos de propóleos obtenidos con el método de mallas matizadas

Fecha	Ceras [% p/p]	Resinas [% p/p]	Impurezas [% p/p]	Fenoles [% p/p]	Flavonoides [% p/p]
05/12/2000	37,07	45,02	9,36	4,45	1,97
09/01/2001	36,58	50,73	7,45	1,62	0,64
06/02/2001	38,03	33,09	20,38	11,43	1,74
20/02/2001	49,28	23,92	17,24	10,43	2,44
14/03/2001	44,02	29,69	20,99	15,23	3,92
30/03/2001	54,63	18,10	22,16	9,52	2,43
20/04/2001	68,67	11,05	15,50	6,47	1,10

Con los datos de las Tablas 18, 19 y 20 y los pesos de propóleos obtenidos por colmena se puede seguir la evolución temporal de los parámetros analíticos considerados, obteniéndose curvas con perfiles similares a las de la Figura 6. Por otro lado, sumando los valores medios del peso de propóleos obtenidos por colmena y los de cada una de las variables analíticas se obtiene la siguiente Tabla:

Tabla 21. Valores medios totales obtenidos durante el transcurso del ensayo

	Productividad [g/colmena]	Ceras [g]	Resinas [g]	Impurezas mec. [g]	Fenoles [g]	Flavonoides [g]
Cuñas	51,80	21,11	15,61	9,10	5,19	1,97
Malla mosquitera	239,99	149,73	49,73	25,75	7,29	2,76
Malla matrizada	262,27	112,44	91,80	39,33	20,55	4,77

Se puede apreciar claramente que los métodos de mallas, y en especial el de malla matrizada, permiten obtener no solamente mayor cantidad de propóleos como ya se dijo, sino también mayor cantidad de resinas, fenoles totales y flavonoides, lo cual es de gran importancia si consideramos que estos compuestos son los que determinan las propiedades biológicas de los propóleos por lo que serán de gran importancia durante el procesamiento.

Ensayo en Calingasta – San Juan

Las especies vegetales presentes en la zona fueron: álamo (*Populus sp.*), jarilla (*Larrea sp.*), sauce (*Salix sp.*), brea (*Cercidium praecox*), eucaliptos (*Eucaliptos sp.*) La Figura 8 muestra los pesos promedio por colmena para cada tratamiento en función de la fecha y la Fig. 9 los pesos de propóleos acumulados por colmena.

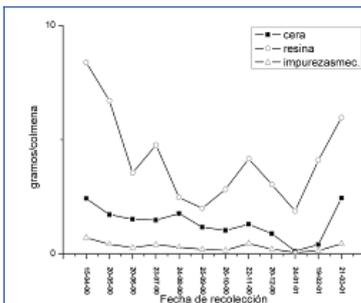


Figura 8. Propóleos recolectados por cada método

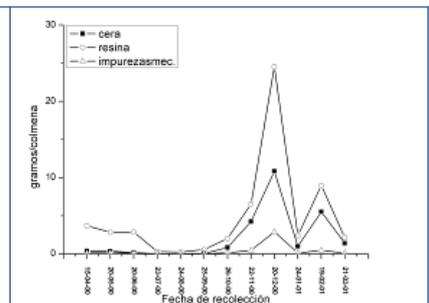


Figura 9. Peso (acumulado) de propóleos recolectado en cada método

El análisis de varianza no detecta diferencias significativas entre la cantidad de propóleos recolectada entre el método de raspado y el de malla mosquitera ($P < 0,05$).

El análisis químico del propóleo obtenido muestra los siguientes resultados:

Tabla 22. Resultados analíticos de propóleos obtenidos con el método de cuñas

Fecha	Ceras [% p/p]	Resinas [% p/p]	Impurezas [% p/p]	Fenoles [% p/p]	Flavonoides [% p/p]
15-04-00	19,17	66,21	5,61	22,04	13,91
20-05-00	17,46	68,25	4,31	22,24	14,18
20-06-00	26,96	62,78	5,03	20,54	11,48
23-07-00	20,41	65,83	5,65	23,15	15,47
24-08-00	36,72	51,08	6,20	18,22	9,49
25-09-00	32,62	55,97	5,53	19,57	11,59
26-10-00	24,24	66,34	3,69	24,64	17,05
22-11-00	20,56	65,86	7,20	22,41	11,39
20-12-00	19,98	68,27	4,62	26,83	14,95
24-01-01	6,08	88,70	3,09	28,34	19,49
19-02-01	8,30	83,52	2,76	28,49	17,93
21-03-01	27,70	67,59	5,14	19,40	12,97

Tabla 23. Resultados analíticos de propóleos obtenidos con el método de mallas mosquiteras

Fecha	Ceras [% p/p]	Resinas [% p/p]	Impurezas [% p/p]	Fenoles [% p/p]	Flavonoides [% p/p]
15-04-00	8,28	79,92	2,63	27,94	19,95
20-05-00	9,87	76,22	4,41	27,88	19,63
20-06-00	5,28	85,88	3,19	28,24	19,62
23-07-00	3,64	80,14	3,06	29,61	17,36
24-08-00	9,90	67,59	5,19	27,09	15,42
25-09-00	7,32	83,20	2,86	28,01	20,09
26-10-00	25,31	60,49	4,51	21,79	14,40
22-11-00	37,10	57,15	3,91	12,47	5,72
20-12-00	28,36	64,25	7,54	20,18	9,23
24-01-01	27,74	67,40	3,39	24,94	13,34
19-02-01	36,78	59,78	3,05	21,20	11,39
21-03-01	37,71	58,05	2,95	18,44	9,74

Con los datos de las Tablas 22 y 23 y los pesos de propóleos obtenidos por colmena se puede seguir la evolución temporal de los parámetros analíticos considerados, obteniéndose curvas con perfiles similares a los de la Figura 8, como se muestra a continuación.

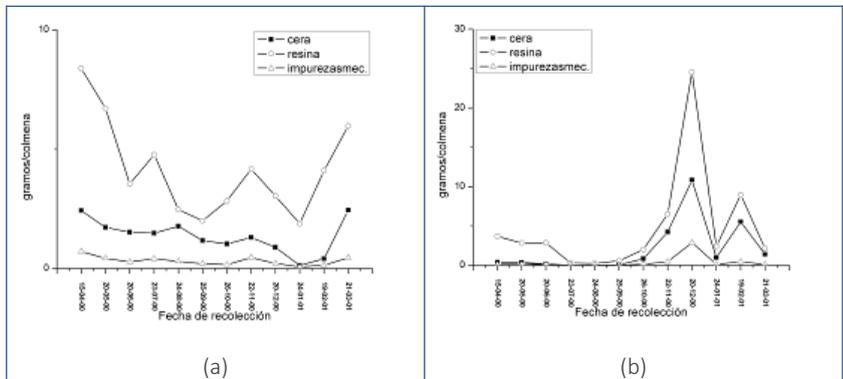


Figura 10. Evolución del peso de ceras, resinas e impurezas mecánicas recolectadas en función del tiempo y del método (a) cuñas separadoras (b) mallas mosquiteras.

Por otro lado, sumando los valores medios del peso de propóleos obtenidos por colmena y los de cada una de las variables analíticas se obtiene la siguiente Tabla:

Tabla 24. Valores medios totales obtenidos durante el transcurso del ensayo

	Productividad [g/colmena]	Ceras [g]	Resinas [g]	Impurezas mec.[g]	Fenoles [g]	Flavonoides [g]
Cuñas	74,69	16,29	49,85	3,80	16,77	10,35
Malla mosquitera	88,25	24,84	57,06	4,60	18,26	9,76

Las sumas muestran que existen diferencias entre ambos métodos, pero no son estadísticamente significativas, como se dijo anteriormente.

Ensayo en Río Turbio – Santa Cruz.

Los datos de producción de propóleos que mayormente se han reportado corresponden a zonas templadas, en menor medida a climas cálidos y son prácticamente nulos los correspondientes a zonas frías. Por esta razón se implementó un ensayo de producción en Río Turbio, que se llevó a cabo sólo con el método de mallas matrizadas, y utilizando 30 colmenas (quizás las mas australes del mundo). Se ubicaron 15 colmenas en zona de pastizales y otras 15 en zona de bosque. En todos los casos, las mismas se obtuvieron a partir de paquetes certificados y con genética PROAPI.

Las especies vegetales predominantes en cada una de las zonas fueron: trébol blanco (*Trifolium repens*), diente de león (*Taraxacum officinales*) y crucíferas (*Sisymbrium altissimum*, *Thiaspi arvense*) en el primer caso y álamo de Alaska, sauce viminalis, pinos y adesmia en el segundo. En la Figura 11 se muestran los pesos promedio por colmena en función de la fecha de producción, y en la Figura 12 los pesos acumulados.

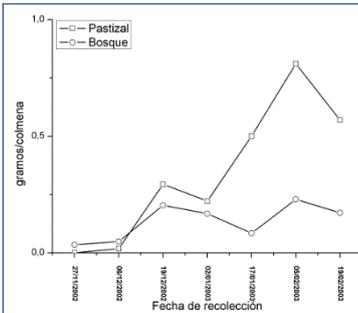


Figura 11. Propóleos recolectados en dos zonas diferentes en Río Turbio

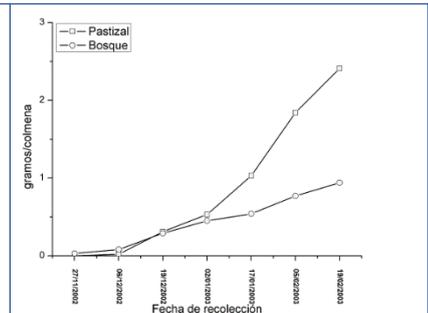


Figura 12. Peso (acumulado) de propóleos recolectado en dos zonas de Río Turbio

Contrariamente a lo esperado, se observa mayor producción de propóleos en la zona de pastizales que en la de bosques, aunque en ambos casos, son cantidades muy pequeñas (12).

Ensayo en el Valle de Uco - Mendoza

Entre las especies vegetales predominantes se encontraron: álamos (*Populus spp.*), sauces (*Salix spp.*), acacias (*Acacia spp.*), vegetación xerófila y frutales de pepita y carozo. La Figura 13 muestra los pesos promedios por colmena en cada tratamiento y la 14 los acumulados.

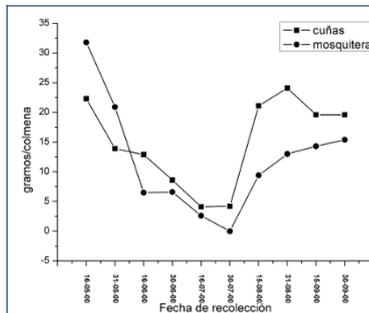


Figura 13. Propóleos recolectados por cada método

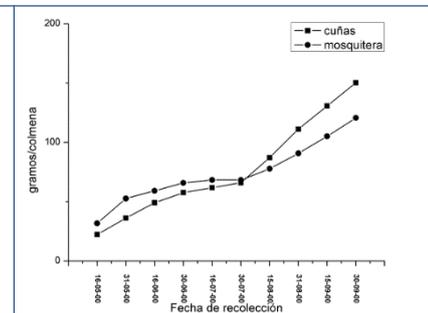


Figura 14. Peso (acumulado) de propóleos recolectado por cada método

El análisis de varianza aplicada a los datos de los tratamientos por raspado y malla no detecta diferencias significativas entre los dos métodos de recolección de propóleos. ($P < 0,05$). Se observa un pico de producción a fines del mes de agosto, anterior a la entrada principal de néctar y probablemente influenciada fuertemente por la aparición de yemas en los álamos. Además la Figura 13 sugiere que podría producirse otro pico de entrada en el otoño y por lo tanto se requerirían más datos correspondientes a esa época.

Ensayo en el Delta del Paraná – Buenos Aires

Entre las especies vegetales predominantes se destacan las Salicáceas (*Salix spp.*, *Populus spp.*) como consecuencia de la actividad de forestación de la zona. La Figura 15 muestra los pesos promedio recolectados por colmena para cada tratamiento en función de la fecha y la Figura 16 los pesos acumulados por colmena.

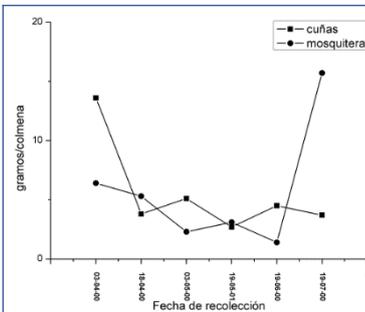


Figura 15. Propóleos recolectados por cada método

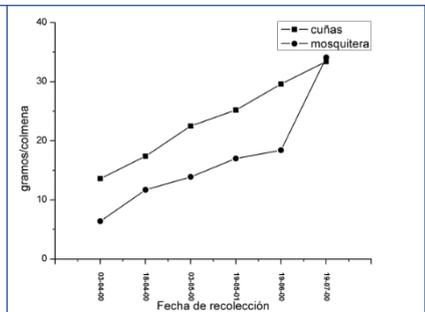
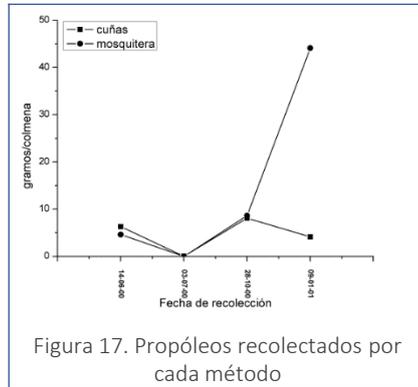


Figura 16. Peso (acumulado) de propóleos recolectado por cada método

El análisis de varianza de los datos no detecta diferencias significativas entre ambos métodos ($P < 0,05$). En la Figura se muestra un pico de entrada correspondiente a la época invernal y posiblemente influenciada por la producción de yemas en los álamos.

Ensayo en Gualeguaychú - Entre Ríos.

Entre las especies vegetales presentes en la zona del ensayo se pueden mencionar: ñandubay (*Prosopis affinis*), sauce (*Salix spp.*), algarrobo (*Prosopis spp.*). La Figura 17 muestra los pesos promedio por colmena para cada tratamiento en función de la fecha.



El análisis de varianza de los datos no revela diferencias significativas entre ambos métodos. ($P < 0,05$).

Análisis de los resultados

Pese a tratarse de información preliminar, puede observarse la variación en la curva de recolección para las distintas zonas consideradas. En la mayor parte de los ensayos (Calingasta, Valle de Uco, Delta del Paraná y Gualaguaychú) no se observaron diferencias significativas entre la producción de propóleos utilizando el método de cuñas y la realizada empleando alguno de los dos tipos de mallas ensayadas (matrizadas y mosquiteras), excepto en el ensayo de Leales donde la producción mediante los dos tipos de mallas fue mayor al de cuñas.

A partir de los resultados obtenidos no puede generalizarse acerca de la conveniencia de un método de obtención respecto de otro considerando solamente la cantidad de propóleos recolectada, ya que existe influencia del medio ambiente. Más adelante, en este mismo capítulo, al analizar los contaminantes presentes en el propóleos, probaremos que los métodos de mallas son más seguros que el de cuñas desde el punto de vista de la inocuidad del producto.

Si bien la cantidad de propóleos depende de factores (como la condición de la colonia) que no fueron contemplados en el ensayo, resulta interesante analizar los picos de recolección, observando que se ubican por lo general en el verano, con dos picos para el caso de Valle de Uco en Mendoza. Sin lugar a dudas será necesario profundizar el estudio de los factores que condicionan la recolección para cada región para ajustar la curva y mejorar la eficiencia de cosecha.

Limpieza, almacenamiento, conservación y transporte

El primer paso luego de cosechado el propóleos es la limpieza del mismo con una pinza de punta, cuidando de retirar contaminantes macroscópicos como abejas, trozos de madera, pasto, etc. Se deben desechar los trozos que puedan venir con pintura adherida ya que ésta es una de las principales fuentes de contaminación.

Es útil disponer de una bandeja de dimensiones apropiadas y de pocos centímetros de altura para depositar el propóleos mientras se procede a su inspección. Pueden ser de material plástico o de madera, estar ubicada preferentemente sobre una mesa y con suficiente iluminación para trabajar cómodamente.

Para que las propiedades del propóleos no se alteren, es recomendable acopiarlo en bolsas de plástico transparentes, hasta que se entregue para su utilización. Se debe tener la precaución de no almacenar grandes volúmenes, para evitar que se compacte desmereciendo significativamente la calidad. Es prudente guardar estas bolsas dentro de cajas de cartón, madera o un recipiente apropiado que lo proteja de temperaturas excesivas y en especial de la luz. En caso de disponer de pequeñas cantidades, se puede conservarlo en frascos de vidrio de color ámbar.

Si el propóleos se va a almacenar por largo tiempo antes de trasladarlo a la planta de procesamiento, se debe conservar sometiéndolo a temperaturas que oscilen entre -10 y -20 C durante 48 horas. Se pueden utilizar los freezer de uso doméstico, siendo recomendables los de cuatro estrellas o tropicales. Una vez retirado del mismo, no se debe dejar expuesto al aire ya que tiende a condensar la humedad ambiente y en este caso podrían desarrollarse algunos tipos de hongos. Es conveniente cubrirlo con un plástico (preferentemente incoloro) hasta que alcance la temperatura del lugar donde se conservará.

El almacenamiento se realizará en locales limpios, secos, ventilados, libres de roedores y plagas, separando el propóleos del piso y de las paredes. Nunca se lo debe dejar a la intemperie, ni cerca de fuentes de contaminación como son las acumulaciones de panales viejos o material apícola en desuso después de la cosecha.

Si por alguna razón se detectan fragmentos de propóleos atacados por polilla, se deben separar inmediatamente y destruir. Posteriormente se debe inspeccionar el resto de las muestras para descubrir y eliminar en caso necesario cualquier otro foco de contaminación.

A modo de seguridad, la muestra que presentó polillas se somete a congelamiento utilizando las condiciones previamente establecidas.

Los medios de transporte deben estar limpios, secos, libres de combustibles u otras sustancias tóxicas que le impregnan olores y sabores extraños que afectan la calidad del propóleos.

En resumen:

- Para obtener propóleos, es recomendable utilizar mallas (preferentemente matrizadas) y si se obtiene por raspado, tratar que no se mezcle con cera o con restos de pintura.
- Conservar el producto en forma granulada, de escamas o trozos, evitando que se apelmace.
- Empaquetar por separado los distintos tipos y calidades para su comercialización.
- Almacenar el propóleos en un sitio fresco, oscuro y seco, evitando la exposición directa a la luz solar, a tubos de neón o a focos de gas a mercurio.
- Evitar la contaminación en el almacenamiento, no utilizar sitios con polvo, ni lugares donde se depositen agroquímicos, o se enciendan motores accionados a combustible (tractores, autos, grupos electrógenos, etc.)
- No acopiar en bolsas de papel y menos aún en papel de diario, pues la tinta aporta plomo que es fácilmente captado por el propóleos.

Procesamiento industrial

A diferencia de otros productos apícolas como la miel y la jalea real, el propóleo debe procesarse para poder ser aprovechado. Actualmente se lo utiliza en la industria alimenticia, cosmética, veterinaria y farmacéutica, en una gran cantidad de productos que aprovechan sus propiedades.

Con anterioridad se definió que desde el punto de vista macroscópico está compuesto por aproximadamente un 50 % de resinas, en las que se encuentran la mayor parte de los compuestos con actividad biológica, en tanto que el 50% restante está formado por ceras e impurezas y puede considerarse como la fracción inerte, por lo tanto se puede considerar al procesamiento como una serie de operaciones unitarias destinadas a separar, recuperar y conservar los compuestos activos. Para la separación, normalmente se recurre a técnicas extractivas, donde el propóleo se pone en contacto con un extractante, generalmente en estado líquido y de variada naturaleza.

La fracción resinosa está formada principalmente por compuestos orgánicos, por lo que los solventes más adecuados para la extracción serán los del tipo orgánico, como por ejemplo: etanol, glicerina y propilenglicol, obteniéndose extractos hidroalcohólicos (si no se utilizó etanol absoluto), glicéricos y glicólicos. Se han empleado otros extractantes como acetona o éter etílico, pero en casos especiales y en escala no muy grande.

Por otro lado, también se utiliza el agua obteniéndose en este caso extractos acuosos, generalmente de baja concentración ya que, aunque la mayoría de los compuestos activos son orgánicos, en algunos casos se encuentran unidos químicamente a otras moléculas que mejoran la solubilidad en agua. Un caso típico son los flavonoides, que en su forma aglicona o libre son prácticamente insolubles, pero cuando se combinan con azúcares aumentan su polaridad y por lo tanto la solubilidad.

Un aspecto de suma importancia y que a veces genera confusión, es la manera de expresar la concentración de los extractos, cualquiera sea su naturaleza. La forma correcta de hacerlo es a través del cálculo del residuo seco o materia seca, que se obtiene por evaporación del solvente en condiciones estandarizadas (mayores detalles se encuentran en el Capítulo IV de Metodología Analítica).

No se debe confundir con las proporciones de propóleos y extractante utilizadas para la obtención del extracto.

Por ejemplo, si decimos que un extracto tiene una concentración del 15%, significa que 100 gramos de extracto contiene 15 gramos de residuo seco, lo cual no es lo mismo que decir que el extracto se obtuvo mezclando 15 gramos de propóleos con 100 u 85 gramos de extractante, ya que sabemos que la composición es variable y por lo tanto si utilizamos proporciones fijas, el producto será diferente cada vez que se cambie la partida de propóleos.

Dado que el extractante es líquido y propóleos es un material sólido, es necesario prepararlo convenientemente y aplicar condiciones de proceso que favorezcan y faciliten la transferencia de materia de la fase sólida a la líquida, tomando en cuenta las características del producto.

En primer lugar se debe acondicionar la partida o lote de la siguiente manera:

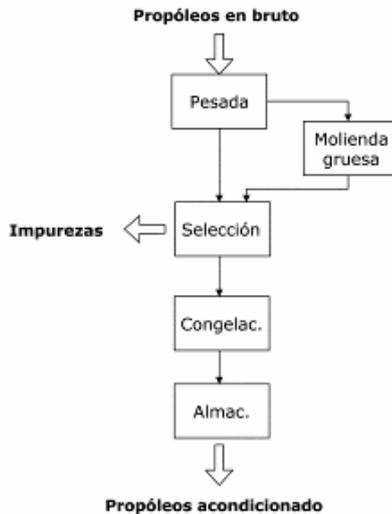


Figura 18. Acondicionamiento de propóleos en bruto

El propóleos en bruto se pesa y se registra el dato. En caso de encontrar trozos de tamaño grande será necesario efectuar una primera etapa de molienda (gruesa) para disgregarlo e inspeccionar el interior de los conglomerados.

A continuación se efectúa una selección para descartar las impurezas visibles (trozos de cera, restos de madera, partes de abejas, restos vegetales, de papel, cartón, etc.) y las no conformidades (propóleos que presenta elevado contenido de cera, virutas de madera con pintura, etc.)

Una vez seleccionado, el propóleos se somete a congelación de manera de eliminar la posible presencia de polilla de la cera. Normalmente esta operación se realiza entre -18 y -20°C durante 24 horas al menos. Una vez retirado se puede almacenar en un lugar fresco y seco, protegido de la luz directa hasta el momento en que se decida continuar con el proceso.

En la actualidad se prefiere obtener extractos en base a etanol y concentrarlos hasta obtener un producto con no menos del 75% de resinas, que se conoce como extracto blando de propóleos (EBP) y se obtiene como indica en la Figura a continuación.

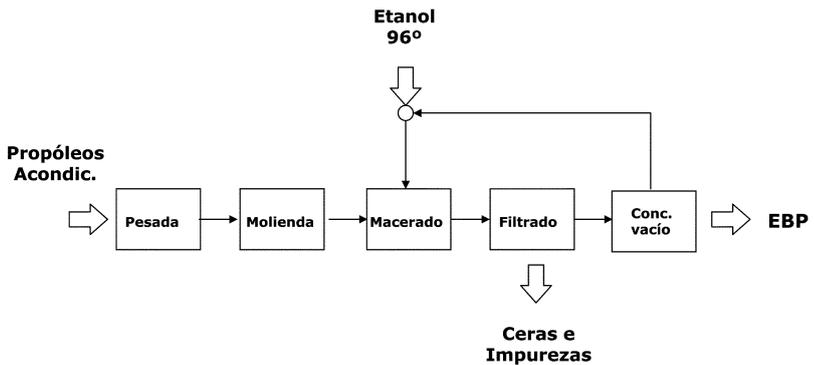


Fig. 19. Proceso de obtención de Extracto Blando de Propóleos

El propóleos acondicionado se muele para disminuir el tamaño de partícula y facilitar la extracción. Luego se pone en contacto con etanol 96°, se agita y se calienta suavemente hasta lograr la extracción de los principios activos.

Luego de esta etapa se puede enfriar la mezcla de manera de facilitar la etapa siguiente de separación ya que comienzan a coagular las ceras. Posteriormente, los extractos alcohólicos se concentran a baja temperatura, aplicando vacío de manera de minimizar la degradación de compuestos activos. Se continúa con el proceso hasta alcanzar una concentración de sólidos de aproximadamente 80% en peso en el extracto. Luego se descarga el equipo y se almacena el Extracto blando en recipientes adecuados debidamente identificados, en lugar fresco y protegido de la luz.

El extracto blando es un semielaborado que permite luego desarrollar una gran variedad de productos. A continuación se muestran los resultados analíticos de un extracto obtenido de acuerdo a lo descrito.

Tabla 25. Características organolépticas y Análisis físico químico de Extracto Blando de propóleos

CARACTERISTICAS ORGANOLÉPTICAS
Aspecto: Líquido viscoso.
Color: Marrón oscuro, rojizo.
Olor: Resinoso, alcohólico, aromático, característico de propóleos.
Sabor: Alcohólico, amargo, picante.
ANALISIS FISICO QUIMICO
Sólidos Totales: 80 g/100 g
Fenoles totales: 40.8 g/100 g (como ácido gálico equiv.)
Flavonoides totales: 8.9 g/100 g (como quercetina dihidratada – método $AlCl_3$)
Absorbancia: Máxima entre 270 - 315 nm (pico principal: 287 nm)

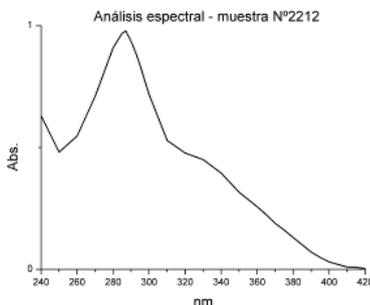


Figura 20. Espectrograma UV de Extracto blando de propóleos

Principales contaminantes

Una de las contaminaciones más importantes del propóleos es la presencia de metales pesados, y entre ellos, el más común es el plomo.

El origen de esta contaminación reside en que los flavonoides, que constituyen uno de los principales compuestos bioactivos del propóleos (13), tienen tendencia a acomplejar metales como el hierro y el cobre, que son elementos que catalizan reacciones químicas formadoras de radicales libres. Pero esta misma propiedad les permite formar quelatos con metales pesados (14), como el plomo, que se convierte así en uno de los principales contaminantes del propóleos.

La FDA (15) reportó varios casos de contaminación con plomo en suplementos dietarios elaborados a partir de propóleos, en USA (1994). También la Food Standards Agency encontró muestras de suplementos dietarios contaminados con plomo en el Reino Unido en 1995 (16).

Evaluación del efecto del método de cosecha sobre el contenido de plomo en propóleos

El plomo encontrado en el propóleos puede provenir de la atmósfera (contaminación ambiental) o ser incorporado durante la cosecha, extracción o procesamiento. En el marco del Proyecto “Caracterización Físico-Química del propóleos argentinos y sus extractos”, se diseñó un ensayo para evaluar el efecto del método de cosecha sobre el contenido de plomo, y se compararon dos métodos analíticos para determinar el mismo: Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (GFAAS) y Espectrofotometría UV-Vis de Absorción Molecular (UV-Vis). El ensayo fue implementado en el Campo Experimental Regional de INTA en Leales (CER Leales), provincia de Tucumán, con un diseño aleatorizado con tres tratamientos (métodos de recolección) y diez repeticiones por cada uno. Se tomaron ocho muestras de propóleos de cada tratamiento, durante un período de un año

Los métodos evaluados fueron:

1. Cuñas separadoras y cosecha por raspado
2. Mallas mosquiteras
3. Mallas matrizadas

En cuanto a los procedimientos analíticos, las muestras fueron mineralizadas en mufla a 400 °C hasta cenizas blancas, y luego las cenizas fueron disueltas en ácido nítrico (1+4), filtradas con papel Whatman 42.

El plomo fue determinado por:

1. Espectrofotometría UV-Vis: utilizando el método de la ditizona (que se describe en el Capítulo IV: Metodología Analítica). (17)
2. Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, empleando un método ICUMSA (18).

En la Tabla 26 se muestra el contenido medio de plomo obtenido con los dos métodos analíticos para cada tratamiento, el error estándar de la media (e.e.), y el resultado del análisis de varianza en dos niveles.

Tabla 26. Contenido de plomo en propóleos

Tratamiento	UV-Vis Contenido de plomo (mg/kg) ± e.e.	GFAAS Contenido de plomo (mg/kg) ± e.e.	Grupos homogéneos
Cuñas separadoras	7,0 ± 1,5	8,9 ± 2,5	A
Mallas mosquiteras	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,4	B
Mallas matrizadas	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	B
Grupos homogéneos	C	C	

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas según tratamiento ($P < 0,05$).
Letras diferentes en la última fila indican diferencias significativas según el método analítico ($P < 0,05$).

El análisis estadístico de los datos revela que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el método de raspado y los métodos de mallas, mientras que entre los dos tipos de mallas no se detectan diferencias. El método de cuñas separadoras presenta una dispersión notablemente mayor que los métodos de mallas, siendo el tratamiento con mallas matrizadas el que presenta la menor variabilidad. (19, 20, 21)

Respecto a los métodos de análisis aplicados, no se encontraron diferencias significativas, y también son semejantes las dispersiones de los datos obtenidos. Puede concluirse entonces que en los laboratorios de control de calidad de propóleos de rutina que no posean un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito, puede emplearse el método colorimétrico de la ditizona y obtener resultados comparables, para el rango de concentraciones de plomo analizadas. (22)

El nivel de plomo determinado para los tres métodos de cosecha (Tabla 20) es inferior a los valores reportados en la bibliografía. En propóleos brasileños colectados con mallas, Alcici y col. (23) determinaron concentraciones de plomo desde 2,7 a 3,1 mg/kg, mientras que en propóleos de raspado, con restos de pintura, encontraron valores desde 19 a 48 mg/kg. En el Reino Unido, la Food Standards Agency reportó valores desde 2,3 a 461 mg/kg de plomo en 20 muestras de propóleos provistas por miembros de la British Beekeepers Association (16), y que fueron analizadas utilizando el método de espectrometría de plasma acoplado inductivamente con espectrometría de masa (ICP-MS).

Determinación de Arsénico

En las muestras de propóleos recolectadas en el ensayo del Campo Experimental del INTA en Leales, se determinó también el contenido de arsénico. Se empleó el método colorimétrico del dietilditiocarbamato de plata (24) que se describe en el capítulo de metodología analítica.

Todos los valores determinados estuvieron por debajo del límite de detección del método empleado (0,1 mg/kg).

Referencias:

1. Gurini, L., Segura, C., Maldonado, L., Alvarez, A., Torné, C., Rodríguez, D. y Bedascarrasbure, E. Origen botánico de propóleos obtenidos en dos zonas de la República Argentina. 1º Encuentro Latinoamericano de apicultores y 1º Congreso Cubano de Apicultura. La Habana. Cuba. 6 al 9 de Septiembre de 2004.
2. Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R., "The composition and plant origins of propolis: A report of work al Oxford". International Bee Research Association, Bee World. Vol 71 Nº3. 1990.
3. Skoog, A.; Leary, J. Análisis Instrumental. Cuarta Edición. Ed. McGraw Hill. 1994
4. Bedascarrasbure E.; Maldonado L.; Gurini L.; Alvarez, A.; van der Horst A.; Tabera, A. "Caracterización de propóleos argentinos. I. Delta del Río Paraná". Congreso Internacional de propóleos. 1 y 2 de Septiembre de 2000. Buenos Aires. Argentina.
5. Bedascarrasbure E., Maldonado L., Segura, C., Pérez, O., Alvarez, A., van der Horst A., Tabera, A. "Caracterización de propóleos argentinos. II. Valle Calchaquí". Congreso Internacional de propóleos. 1 y 2 de Septiembre de 2000. Buenos Aires. Argentina.
6. Bedascarrasbure, E.L., Maldonado, L., Alvarez A., van der Horst, A., Rodríguez, E. "Physical and chemical characterization of Argentine Propolis". Proc. 37th Int. Apic. Congr. 28 Oct – 1 Nov 2001. Durban South Africa. ISBN: 0-620-27768-68
7. Proyecto Norma IRAM-INTA 15935-1. Propóleos en bruto.
8. Bonheví, S.J.; Coll, V.F. Study on propolis quality from China and Uruguay. Z. Naturforsch. 55c, 778-784 (2000).
9. Ricardo G. Woisky; Antonio Salatino. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apicultural Research 37(2): 99-105 (1998)
10. Enrique Bedascarrasbure , Luis Maldonado, Alejandro Alvarez y Edgardo Rodríguez. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleos Argentino. Acta Farm. Bonaerense 23(3): 369-72 (2004).
11. Maldonado, L.M.; Bedascarrasbure, E.L. "Evaluación de diferentes métodos de recolección de propóleos". XVII Seminario Americano de Apicultura. Aguascalientes. México. 7, 8 y 9 de agosto de 2003.
12. Christiansen, R., Scatturice, L., Maldonado, L., Alvarez, A. y Bedascarrasbure, E. "Producción de propóleos en la Patagonia Austral". 27º Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal. Bs.As. 2004
13. Fierro, Walter "El propóleos, un producto con destacable capacidad antioxidante". Antioxidantes y calidad de vida 2001. Vol. 7 33 : 5-11.

14. Havsteen B.H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids *Pharmacology & Therapeutics* 96 (2002) 67-202.
15. FDA Enforcement Report, october 19th 1994 <http://www.fda.gov/bbs/topics/ENFORCE/ENF00343.html>
16. UK Food Standards Agency, MAFF UK - ANALYSIS OF BEE PRODUCTS FOR HEAVY METALS Food Surveillance, Information Sheet, Number 53 February 1995, <http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1995/no53/53bee.htm>.
17. AOAC Official method 934.07 - Lead in food - General Dithizone Method, 15th edition 1993.
18. ICUMSA Method GS2/3-24. The determination of lead in sugars and syrups by a GFAAS Method-Official. 1998.
19. Adriana Sales, Patricia Marchisio, Magdalena Rodriguez Areal, Leopoldo Sales, Luis Maldonado, Alejandro Alvarez y Enrique Bedascarrasbure "The Lead Level in the Argentinean Propolis". 8º Simposio de Espectrometría Atómica de Río. Río de Janeiro - Brasil. 2004.
20. Sales A, Alvarez A, Areal MR, Maldonado L, Marchisio P, Rodriguez M, Bedascarrasbure E. The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-vis. NCBI. PubMed. 2006. <http://www.pubmed.gov>.
21. E. Bedascarrasbure, L. Maldonado, A. Alvarez. Preliminary results about method of harvest's effect on the propolis'content of lead. *Honeybee Science*. ISSN 0388-2217. 25(3): 129-131. Honeybee Science Research Center. Tamagawa University, Tokio. Japan.
22. Sales, A.; Alvarez, A.; Rodriguez Areal, m.; Maldonado, L.; Marchisio, P. y Bedascarrasbure, E. Estudio crítico sobre los métodos de espectrofotometría molecular UV-visible y absorción atómica con horno de grafito en la determinación de plomo en propóleos. II Congreso Argentino de Química Analítica, Córdoba, Octubre de 2003.
23. Alcici Nivia Macedo Freire. Heavy metals in propolis: practical and simple procedures to reduce the lead level in the Brazilian propolis, First German Bee Products and Apitherapy Congress with International Participation , March 23-24, 2002.
24. AOAC Oficial Method 952.130 Arsenic in Food Silver Diethyldithiocarbamate Method – 15th Edition – 1993.

Capítulo IV

Metodología Analítica

METODOLOGÍA ANALÍTICA

En el Laboratorio de Agroindustrias de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Famaillá se desarrollaron y pusieron a punto un conjunto de técnicas de análisis de rutina para propóleos, que se detallan a continuación y permiten determinar la mayor parte de los parámetros físico-químicos exigidos por el conjunto de las normas presentadas en el Anexo. La metodología analítica que se presenta a continuación es considerada oficial en las Normas IRAM-INTA 15935-1 y 15935-2 (esquema 1) (1,2), aplicables a propóleos en bruto y extractos de propóleos.

I. Análisis de propóleos en bruto

1. Preparación de la muestra

La muestra de propóleos en bruto debe ser mantenida a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación; además, a esta temperatura se vuelve rígido, lo cual favorece su molienda. Una vez refrigerado, por lo menos durante 24 h, debe ser molido finamente en mortero de porcelana o vidrio, manualmente, o bien en forma mecánica en un molino a martillos. Después de la molienda debe conservarse en congelador, al abrigo de la luz, en recipiente de vidrio o plástico, hasta que se lleve a cabo el análisis.

2. Determinación de Humedad

- Instrumental
 - Balanza analítica.
 - Cápsulas de porcelana.
 - Estufa con circulación de aire, preferentemente forzado.
 - Desecador.
- Procedimiento: la determinación se efectúa por duplicado.
 - Se pesa una cápsula de porcelana limpia y seca y se anota su masa.
 - Se pesan aproximadamente 4 g de propóleos en bruto, acondicionado, y se colocan en la cápsula.
 - Se coloca en la estufa regulada a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta eliminar completamente la humedad, para lo cual se deja al menos 2 h. Luego se retira la cápsula, se coloca en un desecador hasta que llegue a temperatura ambiente, y se pesa hasta constancia de peso, lo cual se verifica cuando dos pesadas sucesivas no difieren entre sí en más de 5 mg.

- Cálculos. Se calcula la humedad, H%, mediante la fórmula siguiente:

$$H\% = 100 \cdot \left(1 - \frac{(C_{TS} - T)}{(C_{TH} - T)} \right)$$

Siendo:

C_{TS} : la masa de la cápsula con la muestra seca, en gramos;

C_{TH} : la masa de la cápsula con la muestra en bruto, en gramos;

T: la masa de la cápsula vacía, en gramos.

Se informa el promedio de las dos determinaciones.

3. Determinación de Cenizas

- Instrumental
 - Balanza analítica
 - Cápsulas de porcelana
 - Estufa con circulación de aire, preferentemente forzado
 - Desecador
 - Horno de mufla
- Procedimiento
 - La determinación se efectúa por duplicado.
 - La muestra seca y la cápsula de porcelana provenientes de la determinación de Humedad, se colocan en un horno de mufla y se incinera a $400 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta que se alcancen cenizas blancas. No se debe exceder de esa temperatura, para evitar pérdidas de plomo por volatilización. Una vez que se obtienen las cenizas blancas, se retira la cápsula, se coloca en un desecador hasta que llegue a temperatura ambiente, y se pesa.
- Cálculos. Se calculan las cenizas, C%, mediante la fórmula siguiente:

$$C\% = \frac{(C_Z - T)}{(C_{Ph} - T)} \cdot 100$$

Siendo:

C_Z : la masa del crisol con cenizas, en gramos;

C_{Ph} : la masa del crisol con muestra húmeda, en gramos;

T: la masa de la cápsula, en gramos.

Se informa el promedio de las dos determinaciones.

4. Determinación de ceras

- Instrumental
 - Balanza analítica.
 - Equipo para extracción (Soxhlet).
 - Cartuchos de celulosa o papel de filtro.
 - Calefactor eléctrico.
 - Estufa con circulación de aire, preferentemente forzado.
 - Desecador.
- Reactivos
 - n-hexano
- Procedimiento. La determinación se efectúa por duplicado.
 - Se pesan aproximadamente 2 g de la muestra acondicionada y se colocan en un cartucho de celulosa seco o bien se los encierra en un papel de filtro seco, se sujeta con hilo de algodón desgrasado, y se coloca en el cuerpo de un extractor de Soxhlet.
 - Se pesa el balón del extractor de Soxhlet y se colocan en él aproximadamente 120 ml de n-hexano, se conecta al extractor y se comienza a calentar hasta que el solvente entre en ebullición y se mantenga en esas condiciones durante 6 h, a una velocidad de aproximadamente 120 gotas a 150 gotas de condensado por minuto.
 - Transcurrido ese tiempo se comprueba si ha finalizado la extracción extrayendo por la llave lateral un par de gotas del solvente en contacto con la muestra, se las coloca en un vidrio de reloj, se evapora el hexano y se controla que no queden residuos.
 - El remanente de la muestra se saca del extractor, se seca y se reserva para las determinaciones de resinas solubles en alcohol e impurezas mecánicas.
 - En el balón queda la cera disuelta en hexano, y para hacer el cálculo, es necesario retirar el solvente, para lo cual se coloca el balón en una estufa a 80 °C. Después de evaporado el hexano, se retira el balón de la estufa, se coloca en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesa. Se repite el último procedimiento hasta lograr constancia de peso, lo cual se verifica cuando dos pesadas sucesivas no difieren entre sí en más de 5 mg.

- Cálculos. Se calculan las ceras, E%, mediante la fórmula siguiente:

$$E \% = \frac{(B_{c1} - B_{c0})}{m} \cdot 100$$

Siendo:

B_{c1} : la masa del balón con cera (seco), en gramos;

B_{c0} : la masa del balón vacío (seco), en gramos;

m: la masa de la muestra, en gramos.

Se informa el promedio de las dos determinaciones siempre y cuando que los resultados individuales no varíen en más de 5%.

5. Determinación de resinas

- Instrumental
 - Balanza analítica.
 - Equipo de extracción (Soxhlet).
 - Calefactor eléctrico.
 - Estufa con circulación de aire, preferentemente forzado.
 - Desecador.
- Reactivos
 - Etanol
 - Solución de $FeCl_3$ al 10%
- Procedimiento. La determinación se efectúa por duplicado.
 - Se coloca el remanente de muestra resultante de la extracción de ceras, en el cuerpo de un extractor Soxhlet.
 - Se colocan en el balón del extractor Soxhlet aproximadamente 120 ml de etanol, se monta el aparato y se comienza a calentar hasta que el solvente entre en ebullición. Se mantiene en esas condiciones durante 6 h como mínimo, a una velocidad de aproximadamente 120 a 150 gotas de condensado por minuto.
 - El final de la extracción se indica por el color del alcohol que luego de tomar contacto con la muestra debe quedar incoloro, y se controla agregando una gota de este alcohol, extraída por la llave lateral, a un tubo de ensayo conteniendo una solución de $FeCl_3$. Si el color de la solución cambia de amarillento a verdoso, indica la presencia de sustancias fenólicas y por lo tanto es necesario continuar con la extracción, en caso contrario se deja llenar el cuerpo del extractor por última vez y se descarga por la llave lateral.

- Se trasvasa cuantitativamente el contenido del balón a un matraz aforado de 100 ml y se lleva a volumen con etanol.
 - Se pipetea 50 ml y se colocan en un balón de destilación previamente pesado. Se destila completamente el alcohol a baño maría de 80 °C. Los restantes 50 ml se colocan en un frasco color caramelo, con tapa y con capacidad para 100 ml.
 - Como el análisis se realiza por duplicado, se dispone de otros 50 ml que se colocan en el frasco anterior, obteniéndose así 100 ml de extractos alcohólicos de las muestras que se reservan para otras determinaciones.
 - Las resinas quedan en el balón de destilación el cual se coloca en una estufa a 80 °C para evaporar los restos de etanol. Después de evaporado el etanol, se retira de la estufa, se coloca en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesa. Se repite el último procedimiento hasta lograr constancia de peso, lo cual se verifica cuando dos pesadas sucesivas no difieren entre sí en más de 5 mg.
- Cálculos. Se calculan las resinas, R%, mediante la fórmula siguiente:

$$R \% = \frac{(B_{R1} - B_{R0})}{m} \cdot 100 \cdot \frac{V_R}{V_{R1}}$$

Siendo:

B_{R1} : la masa del balón con resinas (secos), en gramos;

B_{R0} : la masa del balón vacío (seco), en gramos;

m : la masa de la muestra, en gramos;

V_R : volumen al cual se diluye el extracto etanólico total de resinas;

V_{R1} : volumen tomado para evaporar el alcohol y efectuar el cálculo.

Si se trabaja de acuerdo con las condiciones indicadas, la fórmula anterior se reduce a la siguiente expresión:

$$R \% = \frac{(B_{R1} - B_{R0})}{m} \cdot 200$$

Se informa el promedio de las dos determinaciones siempre y cuando los resultados individuales no varíen en más de 5 %.

6. Determinación de impurezas mecánicas

- Instrumental
 - Balanza analítica.
 - Estufa con circulación de aire, preferentemente forzado.
 - Desecador.
- Procedimiento. La determinación se efectúa por duplicado.
 - Se saca del extractor el remanente de la muestra luego de la extracción de ceras y resinas, se seca en la estufa a 80 °C, se retira de la estufa, se coloca en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesa.
 - Se repite el último procedimiento hasta lograr constancia de peso, lo cual se verifica cuando dos pesadas sucesivas no difieren entre sí en más de 5 mg.
- Cálculos. Se calculan las impurezas mecánicas, IM%, mediante la fórmula siguiente:

$$IM\% = \frac{(P_1 - P)}{m} \cdot 100$$

Siendo:

P_1 : la masa del cartucho o papel con hilo (secos);

P: la masa del cartucho (o papel) vacío (seco);

m: la masa de la muestra.

Se informa el promedio de las dos determinaciones siempre y cuando los resultados individuales no varíen en más de 5%.

7. Determinación de compuestos fenólicos totales

- Instrumental. Espectrofotómetro que permita hacer lecturas de absorbancia a 765 nm.
- Reactivos
 - Solución de referencia de ácido gálico de 0,5 mg/ml. Se disuelven 0,05 g de ácido gálico en agua para análisis y se lleva a un volumen de 100 ml en un matraz aforado. Se mantiene la solución refrigerada a 4°C, y se la utiliza después de 48 h de haberla preparado.
 - Reactivo de Folin-Ciocalteu. Se prepara a partir de los componentes siguientes:
 - 100 g de wolframato de sodio hidratado p.a.;
 - 25 g de modlibdato de sodio hidratado;
 - 50 ml de ácido fosfórico de 85 % p.a.;
 - 100 ml de ácido clorhídrico de 36 % p.a.;
 - 150 g de sulfato de litio hidratado;
 - bromo.Se mezclan los reactivos mencionados dentro de un balón de 1.000 ml y se calienta a reflujo suave, durante 10 h. Luego se deja enfriar, y se lava el condensador con 50 ml de agua para análisis, la que se escurre sobre el balón. Se añaden 150 g de sulfato de litio hidratado y una o dos gotas de bromo p.a. Luego se lleva ebullición, sin el condensador, dentro de una campana de extracción de gases, hasta que la solución quede libre de bromo (lo que se evidencia porque el color verde se torna amarillo brillante).
 - Solución de carbonato de sodio. Se disuelven 159 g de carbonato de sodio anhidro, en 700 ml de agua para análisis caliente. Se enfría y se completa a 1.000 ml con agua análisis, en un matraz aforado.
 - Solución de cloruro férrico de 10 g/100 ml.
- Trazado de la curva de calibración
 - Se toman alícuotas de 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml y 25 ml de la solución de referencia 5.7.2.1, y se colocan en un matraz aforado de 25 ml. Se completa el volumen con una solución de etanol de 10 %. Las diluciones así preparadas contendrán 0 mg/ml; 1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml y 0,5 mg/ml, respectivamente, de ácido gálico.

- Se toma 1 ml de cada una de las soluciones de referencia diluidas y se coloca en matraces aforados de 25 ml, se agregan 10 ml de agua para análisis y 1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agita suavemente y se deja en reposo durante 2 min.
- Se añaden 4 ml de la solución de carbonato de sodio y se completa el volumen con agua destilada, sin agitar. Finalmente, se calienta en un baño maría a 50 °C durante 5 min y se enfría hasta temperatura ambiente.
- Se colocan las soluciones en cubetas de vidrio y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 765 nm, contra un blanco preparado en las mismas condiciones con los reactivos, y utilizando 1 ml de agua para análisis en lugar de la solución de referencia diluida.
- Para el trazado de la curva de calibración es conveniente disponer de 4 a 5 repeticiones y en principio considerar el valor promedio. Además, se debe tener en cuenta la dilución que se produce en las soluciones de referencia diluidas al colocarlas en el matraz de 25 ml donde se agregan los reactivos para la lectura final.
- Procedimiento. La determinación se efectúa por duplicado.
 - Se pipetea 5 ml del extracto alcohólico obtenido en la determinación de resinas y se colocan en un matraz aforado de 100 ml. Se completa con agua para análisis y se agita vigorosamente para estabilizar la emulsión formada.
 - Se toma 1 ml de la solución anterior y se coloca en un matraz aforado de 25 ml, se agregan 10 ml de agua para análisis y 1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agita suavemente y se deja en reposo durante 2 min.
 - Se añaden 4 ml de la solución de carbonato de sodio y se completa el volumen con agua para análisis, sin agitar. Finalmente, se calienta en un baño María a 50 °C durante 5 min, y se enfría en baño de agua hasta temperatura ambiente.
 - Se coloca la solución en una cubeta de vidrio y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 765 nm, contra un blanco preparado en las mismas condiciones con los reactivos y utilizando 1 ml de agua para análisis en lugar de muestra.
 - Con el valor de absorbancia obtenido, se interpola en la curva de calibración, y se determina el valor buscado.

- Cálculos. Se debe tener en cuenta que el extracto alcohólico (normalmente de 100 ml) se obtuvo a partir de 50 ml de cada uno de los extractos alcohólicos provenientes de la determinación de resinas al procesar la muestra simple y su duplicado. Por lo tanto se considerará como peso de muestra, M, el promedio de los pesos de muestra individuales, m₁ y m₂.

$$M = \frac{(m_1 + m_2)}{2} \quad (1)$$

La concentración de fenoles totales en la solución que se coloca en la cubeta del espectrofotómetro es:

$$F = M \cdot \frac{Fe}{100} \cdot \frac{V_t}{V_s} \cdot \frac{V_{Ti}}{V_i} \cdot \frac{1000}{V_c} \quad (2)$$

Siendo:

Fe: el contenido de fenoles totales, g/100 g de propóleos en bruto

1.000: el factor para expresar la concentración en mg/ml

La curva de calibración relaciona la absorbancia con la concentración de la sustancia de referencia, en este caso ácido gálico, mediante la expresión $Abs = f(C)$. Generalmente se obtiene una recta con ordenada al origen igual a cero. Por lo tanto:

$$\text{Siendo:} \quad \text{Abs} = b \cdot C \quad (3)$$

Abs: el valor de absorbancia leído a 765 nm en la muestra;

b: la pendiente de la recta;

C: la concentración de la solución de referencia, en mg/ml.

Despejando C de (3) e igualando con (2):

$$Fe = \frac{Abs}{10 \cdot b} \cdot \frac{V_i}{V_{Ti}} \cdot \frac{V_s}{V_t} \cdot \frac{V_c}{M} \quad (4)$$

La (4) es la ecuación general, pero para las condiciones enunciadas en esta técnica resulta la siguiente:

$$Fe = \frac{Abs}{b} \cdot \frac{5000}{M} \quad (5)$$

El resultado obtenido indica el contenido de compuestos fenólicos totales, en g/100 g de propóleos, expresado como su equivalente en ácido gálico.

8. Determinación de flavonoides totales

- Reactivos
 - Solución madre de quercetina de 1 mg/ml. Se disuelven 100 mg de quercetina dihidratada en 100 ml de metanol. Se debe conservar en la oscuridad y refrigerada.
 - Solución patrón de quercetina de 100 µg/ml. Se toman 10 ml de la solución madre, y se diluyen a 100 ml con metanol. Se debe conservar en la oscuridad y refrigerada.
 - Solución de tricloruro de aluminio de 5 g/100 g. Se pesan 10 g de tricloruro de aluminio, con mucho cuidado, empleando guantes y barbijo, ya que el producto es muy corrosivo e higroscópico, y se disuelven en 200 ml de metanol.
- Trazado de la curva de calibración
 - Para realizar esta curva de calibración se preparan soluciones de 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml y 10 µg/ml de quercetina, respectivamente.
 - En sendos matraces aforados de 25 ml se pipetea (empleando propipeta) 0 ml; 5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml y 2,5 ml de la solución patrón de quercetina. Se agregan 0,5 ml de la solución de tricloruro de aluminio (empleando propipeta) a cada una de ellas y al blanco. Se enrasa a 25 ml con metanol. Se deja 30 min en la oscuridad, y se leen las absorbancias a 425 nm.
- Procedimiento. La determinación se efectúa por duplicado. Se parte del extracto alcohólico obtenido en la determinación de resinas.
 - Se pipetea 0,1 ml del extracto alcohólico en un matraz de 25 ml, se agregan 0,5 ml de solución de tricloruro de aluminio (empleando propipeta) y se enrasa con metanol. Se prepara un blanco con 0,1 ml de alcohol etílico y 0,5 ml de solución de tricloruro de aluminio, empleando propipeta, y se enrasa con metanol.
 - Se deja 30 min en la oscuridad, se coloca en una cubeta de vidrio y se lee la absorbancia a 425 nm. Si la absorbancia es mayor de 0,400 se repite la determinación tomando un volumen menor de extracto alcohólico. Del mismo modo, si se obtiene una lectura muy baja, se aumenta el volumen de dicho extracto.

- Cálculos.

Se debe tener en cuenta que el extracto alcohólico (normalmente de 100 ml) se obtuvo a partir de 50 ml de cada uno de los extractos alcohólicos provenientes de la determinación de resinas al procesar la muestra simple y su duplicado. Por lo tanto se considerará como peso de muestra, M, el promedio de los pesos de muestra individuales, m₁ y m₂.

$$M = \frac{(m_1 + m_2)}{2} \quad (1)$$

En caso que se varíe el volumen de extracto alcohólico, o bien se tomasen volúmenes diferentes de 50 ml de cada muestra (simple y duplicado), se debe calcular el peso de muestra como el promedio ponderado:

$$M = \frac{(m_1 \cdot v_1 + m_2 \cdot v_2)}{(V_s)}$$

$$V_s = v_1 + v_2$$

La concentración de flavonoides totales en la solución que se coloca en la cubeta del espectrofotómetro es:

$$F_{it} = M \cdot \frac{F_1}{100} \cdot \frac{V_t}{V_s} \cdot \frac{1000000}{V_c} \quad (2)$$

Siendo:

1000000: el factor para expresar la concentración en mg/ml.

La curva de calibración relaciona la absorbancia con la concentración de la sustancia de referencia, en este caso la quercetina dihidratada, mediante la expresión $Abs = f(C)$. Generalmente se obtiene una recta con ordenada al origen igual a cero. Por lo tanto:

$$Abs = b \cdot C \quad (3)$$

Siendo:

Abs: el valor de absorbancia leído a 425 nm;

b: la pendiente de la recta;

C: la concentración de la solución de referencia, en mg/ml.

Igualando (2) y (3) y despejando:

$$FI = \frac{Abs}{b} \cdot \frac{V_s}{V_t} \cdot \frac{V_c}{10000 \cdot M} \quad (4)$$

La (4) es la ecuación general, pero para las condiciones enunciadas en esta técnica, resulta la siguiente:

$$FI = \frac{Abs}{b} \cdot \frac{2.5}{M} \quad (5)$$

Siendo:

FI: el contenido de flavonoides totales, en g/100 g de propóleos en bruto.

El resultado indica el contenido de flavonoides totales, g/100 g de propóleos en bruto, expresado como su equivalente en quercetina dihidratada.

9. Determinación del índice de oxidación

- Instrumental
 - Balanza analítica
 - Erlenmeyer de 125 ml
 - Embudo
 - Papel de filtro
 - Tubo de ensayo
 - Cronómetro
- Reactivos
 - Etanol.
 - Solución de ácido sulfúrico de 20 %.
 - Solución de permanganato de potasio 0,1 N.
- Procedimiento. La determinación se efectúa por duplicado.
 - Se pesan 0,2 g de la muestra de propóleos en bruto acondicionada y se coloca en un erlenmeyer de 125 ml. Se añaden 5 ml de etanol y se deja en reposo durante 1 h.
 - Se agregan 100 ml de agua para análisis, se agita, se filtra a través de un papel de filtro y se recoge el filtrado en un vaso de precipitación o erlenmeyer.
 - Se colocan 2 ml del filtrado en un tubo de ensayo, se añade 1 ml de solución de ácido sulfúrico y se agita durante 1 min.

- Finalmente, se agregan en el tubo 0,05 ml (1 gota) de la solución de permanganato de potasio 0,1 N y se pone en marcha el cronómetro en el preciso momento en que la gota se pone en contacto con la solución acidulada de propóleos, agitando constantemente. La gota debe caer directamente sobre la solución y no sobre las paredes del tubo. Se registra el tiempo, en s, que la solución tarda en decolorarse.

Se expresa el resultado en segundos, como el promedio de ambas determinaciones.

10. Determinación del espectrograma de absorción en el UV

- Instrumental
 - Espectrofotómetro de UV, con fuente de deuterio, para trabajar entre 240 y 420 nm.
 - Cubetas de cuarzo, de 1 cm de paso óptico, para trabajar en la región UV del espectro.
- Procedimiento
 - A partir del extracto alcohólico obtenido en la determinación de resinas, se efectúa una dilución de 1 en 1000 con alcohol etílico. Se lee la absorbancia a 290 nm (zona en la que muchos tipos de propóleos tienen un máximo de absorbancia), y si este valor se encuentra entre 0,5 y 0,8 unidades de absorbancia, se efectúa el barrido completo de longitudes de onda, a intervalos de 10 nm, desde 240 nm hasta 420 nm. En las zonas en las que haya un posible máximo de absorbancia, se efectúa un barrido más fino, de 1 en 1 nm.
 - Si la absorbancia medida inicialmente a 290 nm es mayor de 0,8, o menor de 0,5 unidades de absorbancia, se debe corregir la dilución efectuada inicialmente.
 - Se grafican los valores de absorbancia medidos en función de la longitud de onda de la radiación. La presencia de compuestos fenólicos resulta positiva si se registra un máximo de absorbancia entre 270 nm y 315 nm.

11. Determinación de plomo en propóleos en bruto.

- Principio del método
 - Una muestra acidificada que contiene cantidades de plomo del orden de los microgramos se mezcla con una solución reductora de citrato-cianuro amoniacal, y luego el plomo es extraído con ditizona en cloroformo para formar un complejo de ditizonato de plomo color rojo. Este color es medido espectrofotométricamente a 510 nm. El límite de detección para propóleos en bruto es de 0,1 mg/Kg.
- Mineralización de la muestra
 - Se pesan 10 g (M1) de la muestra acondicionada según 5.1 en un crisol de porcelana. Se calcina en mufla a 400 ± 25 °C hasta cenizas blancas. Debe controlarse rigurosamente la temperatura, porque valores más elevados de 425 °C pueden ocasionar pérdidas de plomo por volatilización.
 - Una vez calcinada la muestra se disuelven las cenizas con 25 ml de ácido nítrico (1+4), calentando las cápsulas en plancha calefactora bajo campana de extracción de vapores. Luego el contenido de las cápsulas es filtrado en un matraz aforado de 50 ml, se enjuaga las cápsulas y el papel de filtro con agua bidestilada caliente, y se enrasa a 100 ml (Vf).
- Reactivos
 - Agua bidestilada, libre de plomo.
 - Solución de stock de plomo: disolver 0,1599 g de nitrato de plomo en aproximadamente 200 ml de agua bidestilada. Agregar 10 ml de ácido nítrico concentrado y diluir a 1000 ml con agua bidestilada. Esta solución contiene 100 µg/ml de Pb.
 - Solución de trabajo de plomo: diluir 20 ml de la solución stock a 1000 ml con agua destilada libre de plomo. Esta solución contiene 2 µg Pb/ml.
 - Solución de ácido nítrico 1+4: diluir 200 ml de ácido nítrico concentrado a 1 litro con agua bidestilada.
 - Solución reductora de citrato cianuro amoniacal: disolver 400 g de citrato de amonio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 20 g de sulfito de sodio anhidro, 10 g de clorhidrato de hidroxilamina $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, y 40 g de cianuro de potasio, en agua bidestilada y diluir a 1 litro. Mezclar esta solución con 2 litros de hidróxido de amonio concentrado.

- Solución stock de ditizona: disolver 100 mg de ditizona en 1000 ml de cloroformo p.a. Esta solución contiene 100 μg Pb/ml.
- Solución de trabajo de ditizona: diluir 100 ml de solución stock de ditizona a 250 ml con cloroformo p.a. Esta solución contiene 40 μg de ditizona/ml.
- Aparatos
 - Ampollas de decantación de 125 ml con robinete de teflón.
 - Espectrofotómetro para trabajar en la región visible.
 - Cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico.
 - Mufla
- Procedimiento
 - a) Calibración: se pipetea 2, 4, 6, 8 y 10 ml de la solución de trabajo de plomo en una ampolla de decantación de 125 ml. Agregar una cantidad de ácido nítrico similar a la que se emplea para disolver las cenizas de las muestras, en nuestro caso, se adicionan 25 ml de ácido nítrico 1+16 (ya que las muestras fueron tratadas con 25 ml de ácido nítrico 1+4, y diluidas a 100 ml). Se agregan 25 ml de la solución de citrato-cianuro amoniacal, se mezcla y se enfría a temperatura ambiente. Adicionar 10 ml de la solución de trabajo de ditizona, agitar vigorosamente durante 30 segundos, y dejar que las fases se separen. Descargar la fase clorofórmica en un vaso de precipitación, filtrarla recogiendo el filtrado en la cubeta del espectrofotómetro. Leer inmediatamente (ya que el cloroformo es muy volátil) la absorbancia a 510 nm. Realizar un ensayo en blanco, y restar de la absorbancia de los patrones la del blanco. Graficar absorbancia en función de la concentración de plomo en el extracto clorofórmico (μg Pb en 10 ml).
 - b) Análisis de las muestras: se pipetea 25 ml (Vt) del extracto ácido obtenido en la mineralización de la muestra en una ampolla de decantación de 125 ml. Se agregan 25 ml de la solución de citrato-cianuro amoniacal, se mezcla y se enfría a temperatura ambiente. Adicionar 10 ml de la solución de trabajo de ditizona, agitar vigorosamente durante 30 segundos, y dejar que las fases se separen. Descargar la fase clorofórmica en un vaso de precipitación, filtrarla recogiendo el filtrado en la cubeta del espectrofotómetro. Leer inmediatamente (ya que el cloroformo es muy volátil) la absorbancia a 510 nm.

Cálculos

$$\text{mg Pb/ Kg} = \frac{\text{Abs}}{b} * \frac{V_f}{V_t} * \frac{1}{M_1}$$

Abs: absorbancia leída.

b: pendiente de la curva de calibración (obtenida al graficar absorbancia de los patrones en función de los $\mu\text{g Pb}$ presente en los mismos).

V_f : volumen al que se enrasa el extracto ácido obtenido en la digestión de la muestra (100 ml).

V_t : volumen tomado y colocado en la ampolla de decantación.

M_1 : peso de propóleos en bruto tomado para realizar el análisis, expresado en gramos.

12. Determinación de arsénico en propóleos en bruto

- Principio del método
 - El arsénico inorgánico es reducido a arsina (H_3As), por zinc en solución ácida en un generador de Gutzeit. La arsina luego es pasada a través de un tubo absorbedor que contiene dietilditiocarbamato de plata disuelto en cloroformo. En el absorbedor, el arsénico reacciona con la sal de plata, formando un complejo rojo soluble que se mide espectrofotométricamente. El límite de detección para propóleos en bruto es de 0,1 mg/Kg.
- Aparatos
 - Digestor tipo Kjeldahl
 - Generador de arsina (generador de Gutzeit) y tubo absorbedor.
 - Espectrofotómetro, para leer a 535 nm con celdas de 1 cm de paso óptico.
- Reactivos
 - Acido sulfúrico concentrado
 - Acido nítrico concentrado
 - Acido clorhídrico concentrado
 - Solución de yoduro de potasio: disolver 15 g de KI en 100 ml de agua destilada. Conservar en frasco oscuro.
 - Solución de cloruro estannoso: disolver 40 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de HCl concentrado.

- Solución de dietilditiocarbamato de plata: disolver 500 mg de efedrina en 100 ml de cloroformo p.a., y luego agregar 625 mg de $\text{AgSCSCN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, y ajustar el volumen a 250 ml con cloroformo adicional. Filtrar y almacenar en frasco oscuro.
- Zinc, en granallas, 20 a 30 mesh, libre de arsénico.
- Solución stock de arsénico: disolver 1,320 g de trióxido de arsénico, As_2O_3 , en 10 ml de agua destilada que contiene 4 g de NaOH, y diluir a 1000 ml con agua destilada, 1 ml = 1 mg As. PELIGRO: el arsénico es tóxico, tomar precauciones para evitar la ingestión de soluciones de arsénico.
- Solución intermedia de arsénico: diluir 5 ml de la solución stock a 500 ml con agua bidestilada, 1 ml = 10 μg As.
- Solución estándar de arsénico: diluir 10 ml de la solución intermedia a 100 ml con agua bidestilada; 1 ml = 1 μg As
- Procedimiento
 - Tratamiento de la muestra: pesar 10 g de propóleos en bruto en un tubo de digestión tipo Kjeldahl, o bien, en un vaso de precipitación. Agregar 10 ml de agua, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y 5 ml de ácido nítrico concentrado. Calentar procurando evitar que la solución se seque y carbonice, puesto que en este caso el arsénico se reduce y se pierde. Si es necesario agregar agua. Calentar hasta eliminación completa del ácido nítrico (si quedan restos del mismo impedirán la reducción del arsénico y la consecuente formación de la arsina), lo cual se observa al formarse humos blancos. Enfriar en freezer el extracto ácido obtenido, para separar posibles restos de cera, y filtrar con papel. Adicionar 25 ml de agua y trasvasar la solución a una botella generadora. Adicionar sucesivamente, 5 ml de HCl concentrado, 2 ml de la solución de KI, y 8 gotas (0.40 ml) del reactivo SnCl_2 . Calentar 15 minutos en baño de agua a 90°C para la reducción del arsénico pentavalente al estado trivalente.
 - Preparación del absorbedor: pipetear 4 ml de la solución de dietilditiocarbamato de plata en el tubo absorbedor.
 - Generación de la arsina y medición: adicionar 3 g de zinc al generador y conectar el absorbedor inmediatamente. Dejar 60 minutos para el desprendimiento completo de la arsina.

- Calentar el generador suavemente para asegurarse que toda la arsina fue liberada. Trasvasar la solución del absorbedor directamente en una cubeta de 1 cm de espesor, y medir la absorbancia a 535 nm, usando un blanco de reactivos como referencia.
- Preparación de la curva de calibración: tratar alícuotas de la solución estándar que contienen 0, 1, 2, 5 y 10 µg As de igual manera que a la muestra (seguir el procedimiento desde a) hasta c)). Graficar la absorbancia en función del arsénico en el estándar.
- Cálculos

$$\text{mg As/ Kg} = \frac{\text{Abs}}{b} * \frac{1}{M_1}$$

Siendo:

Abs: absorbancia leída a 535 nm.

b: pendiente de la curva de calibración (obtenida al graficar la absorbancia en función de los µg As presentes en los patrones).

V_f : volumen al que se enrasa el extracto ácido obtenido en la digestión de la muestra (100 ml).

V_t : volumen tomado y colocado en la botella del generador de Gutzeit.

M_1 : peso de propóleos en bruto tomado para realizar el análisis expresado en gramos.

II- Análisis de extractos de propóleos

- Preparación de la muestra
 - La muestra debe conservarse en un frasco oscuro o ámbar, bien cerrado, en un lugar fresco y protegido de la luz, preferentemente refrigerado entre 8°C y 10°C, para evitar la evaporación de alcohol, hasta que se lleve a cabo el análisis.

2. Determinación de extracto seco

La determinación se efectúa por duplicado. Se pesa un cristizador y se colocan en él 20 ml del extracto de propóleos, se pesa el conjunto y se lleva a una estufa a 100 ± 2 °C para eliminar completamente el solvente. Luego se retira el cristizador, se coloca en un desecador hasta que llegue a temperatura ambiente, y se pesa hasta constancia de peso, lo cual se verifica cuando dos pesadas sucesivas no difieren entre sí en más de 5 mg.

- Cálculos

$$Es\% = \frac{(Pcs - Tc)}{20} \cdot 100$$

Siendo:

Es%: extracto seco expresado en g/100 ml

Tc : tara del cristizador.

Pcs : peso del cristizador seco

20 : volumen de muestra tomado en ml

3. Determinación de ceras

El instrumental y los reactivos son similares a los requeridos para la misma determinación en propóleos en bruto.

Se pesa un cristizador y se colocan en él 20 ml de extracto del propóleos, se pesa el conjunto y se lleva a una estufa a 100 ± 2 °C para eliminar completamente el solvente. Luego se retira el cristizador, se coloca en un desecador hasta que llegue a temperatura ambiente, y se pesa hasta constancia de peso, lo cual se verifica cuando dos pesadas sucesivas no difieren entre sí en más de 5 mg.

Se retira la masa obtenida, se tritura, se pesan aproximadamente 2 g, se colocan en un cartucho de celulosa seco o se envuelven en un papel de filtro seco y se sujeta con hilo de algodón desgrasado.

Se pesa el balón del extractor de Soxhlet y se colocan en él aproximadamente 120 ml. de n-hexano, se conecta al extractor y se comienza a calentar hasta que el solvente entre en ebullición y se mantenga en esas condiciones durante 6 h, a una velocidad de aproximadamente 120 gotas a 150 gotas de condensado por minuto.

Transcurrido ese tiempo se comprueba si ha finalizado la extracción extrayendo por la llave lateral un par de gotas del solvente en contacto con la muestra, se las coloca en un vidrio de reloj, se evapora el hexano y se controla que no queden residuos.

En el balón queda la cera disuelta en hexano, y para hacer el cálculo, es necesario retirar el solvente, para lo cual se coloca el balón en una estufa a 80°C. Después de evaporado el hexano, se retira el balón de la estufa, se coloca en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesa. Se repite el último procedimiento hasta lograr constancia de peso, lo cual se verifica cuando dos pesadas sucesivas no difieren entre sí en más de 5 mg.

- Cálculos

La cantidad de cera contenida en m es: $Bc_1 - Bc_0$. La cantidad de cera contenida en la totalidad de la muestra seca (M_s) en (TMs) se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{M_s}{m} \cdot (Bc_1 - Bc_0) \quad (1)$$

$$M_s = TMs - T \quad (2)$$

La (1) también expresa la cantidad de cera en la muestra húmeda M_h y debe ser igual a:

$$M_h \cdot \frac{\text{Cera}\%}{100} \quad (3)$$

$$M_h = TM_h - T \quad (4)$$

Igualando (1) y (3), reemplazando (2) y (4) y despejando E%:

$$E\% = \frac{(Tms - T) \cdot (B_{c1} - B_{c0})}{(TM_h - T) \cdot m} \cdot 100 \quad (5)$$

La (5) es la ecuación general para el cálculo.

4. Determinación de compuestos fenólicos totales

El instrumental, los reactivos y el trazado de la curva de calibración son similares a los requeridos para la misma determinación en propóleos en bruto. La determinación se efectúa por duplicado.

Se pipetea 5 ml de extracto (V_m), se colocan en un matraz de 100 ml (VS) y se completa a volumen con etanol. Esta solución se reserva para la determinación del contenido de flavonoides totales y el análisis espectrofotométrico. Se pipetea 10 ml de la solución anterior (V_t) y se colocan en un matraz aforado de 100 ml (V_1). Se completa con agua para análisis y se agita vigorosamente para estabilizar la emulsión formada.

Se toma 1 ml (V_{T1}) de la solución anterior y se coloca en un matraz aforado de 25 ml (VC). Se agregan 10 ml de agua para análisis y 1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agita suavemente y se deja en reposo durante 2 min. Se añaden 4 ml de la solución de carbonato de sodio y se completa el volumen con agua para análisis, sin agitar. Finalmente, se calienta en un baño María a 50°C durante 5 min, y se enfría en baño de agua hasta temperatura ambiente.

Se coloca la solución en una cubeta de vidrio y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 765 nm, contra un blanco preparado en las mismas condiciones, con los reactivos y utilizando 1 ml de agua para análisis en lugar de muestra. Con el valor de absorbancia obtenido, se interpola en la curva de calibración, y se determina el valor buscado.

- Cálculos

La cantidad de fenoles totales expresada en gramos en la muestra tomada es:

$$V_m \cdot \delta \cdot \frac{Fe}{100} \quad (1)$$

Siendo: Fe: el contenido de fenoles totales, g/100 g; δ : la densidad del extracto, en g/ml.

La concentración de fenoles totales en la solución que se coloca en la cubeta del espectrofotómetro es:

$$\frac{V_{T1}}{V_1} * \frac{V_t}{V_s} * \frac{V_m}{V_c} * \frac{Fe}{100} * \delta * 1000 \quad (2)$$

Siendo: 1000: el factor para expresar la concentración en mg/ml.

La curva de calibración relaciona la absorbancia con la concentración de la sustancia de referencia, en este caso ácido gálico mediante la expresión $Abs = f(C)$. Generalmente se obtiene una recta con ordenada al origen igual a cero. Por lo tanto:

$$Abs = b.C \quad (3)$$

Siendo: Abs: el valor de absorbancia de la muestra leído a 765 nm; b: la pendiente de la recta; C: la concentración de la solución de referencia, en mg/ml. Despejando C de (3) e igualando con (2):

$$Fe = \frac{Abs}{10 \cdot b \cdot \delta} * \frac{V_1}{V_{T1}} * \frac{V_s}{V_t} * \frac{V_c}{V_m} \quad (4)$$

La (4) es la ecuación general, pero para las condiciones enunciadas en esta técnica resulta la siguiente:

$$Fe = \frac{Abs}{b \cdot \delta} * \frac{2500}{V_m} \quad (5')$$

El resultado obtenido indica el contenido de compuestos fenólicos totales, en g/100 g de extracto de propóleos, expresado como su equivalente en ácido gálico.

5. Determinación de flavonoides totales

El instrumental, los reactivos y el trazado de la curva de calibración son similares a los requeridos para la misma determinación en propóleos en bruto. La determinación se efectúa por duplicado.

Se pipetea 5 ml de extracto (V_m), se colocan en un matraz de 100 ml (VS) y se completa el volumen con etanol. Esta solución se reserva para la determinación del contenido de fenoles totales y el análisis espectrofotométrico. Se pipetea 0,1 ml (V_t) de la solución anterior en un matraz de 25 ml (V_c), se agregan 0,5 ml de solución de tricloruro de aluminio, empleando propipeta y se enrasa con metanol. Se prepara un blanco con 0,1 ml de alcohol etílico y 0,5 ml de solución de tricloruro de aluminio empleando propipeta y se enrasa con metanol. Se deja 30 min en la oscuridad, se coloca en una cubeta de vidrio y se lee la absorbancia a 425 nm. Si la absorbancia es mayor de 0,400 se repite la determinación tomando un volumen menor de extracto alcohólico. Del mismo modo, si se obtiene una lectura muy baja, se aumenta el volumen de dicho extracto.

- Cálculos

La cantidad de Flavonoides totales, expresados en gramos, en la muestra tomada es:

$$V_m \cdot \delta \cdot \frac{Fl}{100} \quad (1)$$

Siendo: Fl: el contenido de fenoles totales, en g/100 g; δ : la densidad del extracto. La concentración de flavonoides totales en la solución que se coloca en la cubeta del espectrofotómetro es:

$$V_m \cdot \delta \cdot \frac{Fl}{100} \cdot \frac{V_1}{V_s} \cdot \frac{1000000}{V_c} \quad (2)$$

Siendo: 1000000: el factor para expresar la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

La curva de calibración relaciona la absorbancia con la concentración de la sustancia de referencia, en este caso quercetina dihidratada, mediante la expresión $Abs = f(C)$.

Generalmente se obtiene una recta con ordenada al origen igual a cero. Por lo tanto:

$$C = \frac{\text{Abs}}{b} \quad (3)$$

Abs: el valor de absorbancia de la muestra leído a 425 nm; b: la pendiente de la recta; C: la concentración de la solución de referencia, mg/ml.

Igualando (2) y (3) y despejando:

$$\text{Fl} = \frac{\text{Abs}}{\delta \cdot b} \cdot \frac{V_s}{V_1} \cdot \frac{V_c}{V_m} \cdot \frac{1}{10000} \quad (4)$$

La (4) es la ecuación general, pero para las condiciones enunciadas en esta técnica, resulta la siguiente:

$$\text{Fl} = \frac{\text{Abs}}{\delta \cdot b} \cdot \frac{2,5}{V_m} \quad (5)$$

El resultado indica el contenido de flavonoides totales, g/100 g de extracto de propóleos, expresado como su equivalente en quercetina dihidratada.

6. Determinación del índice de oxidación

El instrumental y los reactivos son similares a los requeridos para la misma determinación en propóleos en bruto. La determinación se efectúa por duplicado.

Se colocan 100 ml de agua para análisis en un erlenmeyer de 125 ml. Se pipetea 2 ml de la muestra de extracto de propóleos y se agregan lentamente sobre el agua mientras se agita. Se filtra a través de un papel de filtro y se recoge el filtrado en un vaso de precipitación o erlenmeyer de volumen adecuado. Se colocan 2 ml del filtrado en un tubo de ensayo, se añade 1 ml de solución de ácido sulfúrico y agitar durante 1 minuto.

Finalmente, se agregan en el tubo 0,05 ml (1 gota) de la solución de permanganato de potasio 0,1 N y se pone en marcha el cronómetro en el preciso momento en que la gota se pone en contacto con la solución acidulada de propóleos, agitando constantemente. La gota debe caer directamente sobre la solución y no sobre las paredes del tubo. Se registra el tiempo, que la solución tarda en decolorarse. Se expresa el resultado en segundos, como el promedio de ambas determinaciones.

8. Determinación de plomo

El instrumental, los reactivos y el trazado de la curva de calibración son similares a los requeridos para la misma determinación en propóleos en bruto.

- Mineralización de la muestra

Se pipetea 20 ml (V_1) del extracto y se colocan en un balón o tubo de digestión del tipo empleado para la determinación de Kjeldahl. Se agregan 20 ml de ácido nítrico (1+4), y se calienta hasta mineralización completa, aspirándose los vapores nitrosos con un sistema con trampa de agua. Una vez terminada la digestión se filtra el contenido del balón o el tubo de digestión en un matraz aforado de 50 ml, se enjuagan el tubo o balón y el papel de filtro con agua para análisis caliente, y finalmente se enrasa a 50 ml.

- Procedimiento

- Se pipetea 20 ml del extracto ácido obtenido en la mineralización de la muestra en una ampolla de decantación de 125 ml.
- Se agregan 50 ml de la solución de citrato-cianuro amoniacal, se mezcla y se enfría a temperatura ambiente.
- Se adicionan 10 ml de la solución de trabajo de ditizona, se agita vigorosamente durante 30 s, y se deja que las fases se separen.
- Se descarga la fase clorofórmica en un vaso de precipitación, se filtra recogiendo el filtrado en la cubeta del espectrofotómetro.
- Se lee la absorbancia a 510 nm.

- Cálculos

$$\text{mg Pb/L} = \frac{\text{Abs}}{b} \cdot \frac{V_f}{V_t} \cdot \frac{1}{V_1}$$

Siendo: V_1 : el volumen de extracto tomado para realizar el análisis expresado en ml (20 ml).

9. Determinación de Arsénico

El instrumental, los reactivos y el trazado de la curva de calibración son similares a los requeridos para la misma determinación en propóleos en bruto.

- Procedimiento

- Tratamiento de la muestra: pipetear 20 ml (V1) de extracto en un tubo de digestión tipo Kjeldahl, o bien, en un vaso de precipitación. Agregar 20 ml de ácido nítrico (1+4). Calentar procurando evitar que la solución se seque y carbonice, puesto que en este caso el arsénico se reduce y se pierde. Si es necesario agregar agua. Calentar hasta eliminación completa del ácido nítrico (si quedan restos del mismo impedirán la reducción del arsénico y la consecuente formación de la arsina), lo cual se observa al formarse humos blancos. Enfriar en freezer el extracto ácido obtenido, para separar posibles restos de cera, y filtrar con papel. Adicionar 25 ml de agua y trasvasar la solución a una botella generadora. Adicionar sucesivamente, 5 ml de HCl concentrado, 2 ml de la solución de KI, y 8 gotas (0,40 ml) del reactivo SnCl₂. Calentar 15 minutos en baño de agua a 90°C para la reducción del arsénico pentavalente al estado trivalente.
- Preparación del absorbedor: pipetear 4 ml de la solución de dietilditiocarbamato de plata en el tubo absorbedor.
- Generación de la arsina y medición: adicionar 3 g de zinc al generador y conectar el absorbedor inmediatamente. Dejar 60 minutos para el desprendimiento completo de la arsina. Calentar el generador suavemente para asegurarse que toda la arsina fue liberada. Trasvasar la solución del absorbedor directamente en una cubeta de 1 cm de espesor, y medir la absorbancia a 535 nm, usando un blanco de reactivos como referencia.

- Cálculos

$$\text{mg As/Kg} = \frac{\text{Abs}}{b} * \frac{1}{V1}$$

Siendo: Abs: absorbancia leída a 535 nm; b: pendiente de la curva de calibración (obtenida al graficar la absorbancia en función de los µg As presentes en los patrones). V1: volumen de extracto tomado para realizar el análisis expresado en ml.

Referencias:

1. Proyecto IRAM-INTA 15935-1. Propóleos en bruto.
2. Proyecto IRAM-INTA 15935-2. Extractos de Propóleos.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Es evidente que el origen botánico del propóleo tiene una incidencia decisiva sobre el producto resultante, que se expresa como una gran variabilidad desde el punto de vista químico.

El comportamiento de forrajeo de las resinas ha sido escasamente estudiado. Sin lugar a dudas la temperatura ambiente juega un papel muy importante, por la actividad de las abejas y maleabilidad de las resinas, pero respecto de la localización de las mismas y del flujo de información dentro de la colonia, existen todavía muchos aspectos desconocidos.

Si bien está claro que el propóleo tiene un aporte de sustancias elaboradas por las abejas, su origen probablemente se explique por una posición intermedia entre las teorías del origen interno y externo.

El forrajeo y la producción están influenciados por varios factores entre los que se destacan: (a) **la ubicación del apiario**, (b) **época del año**: si bien la información presentada resulta preliminar, aparentemente el pico de recolección de resinas y elaboración de propóleos se produce en diferentes momentos de acuerdo a la zona. En ambientes templado fríos la mayor recolección se produciría en general hacia el otoño, en ambientes subtropicales durante el verano y en condiciones extremas como las de Río Turbio en Santa Cruz prácticamente no habría producción en ningún momento del año, (c) **estado fisiológico de la colonia**: por ahora solo estamos en condiciones de consignar la relación que la fortaleza de la colonia tiene sobre el comportamiento global de forrajeo, en relación no solo a la proporción de abejas forrajeras sino también el estado fisiológico interno de las mismas, que determina en gran parte el “home range” o área de forrajeo, (d) **tipo de abejas**: es conocida la diferencia en la tendencia a la recolección de resinas y producción de propóleos entre diferentes ecotipos, pero se ha visto que dentro de un mismo ecotipo existen amplias variaciones entre colonias lo que sugiere diferencias genéticas en la tendencia a la recolección que pueden deberse a diferentes “inputs” dentro de la colonia o simplemente al condicionamiento genético del comportamiento de forrajeo.

Algunos mitos y muchas preguntas: Hasta hace poco tiempo se hablaba de “Propóleos tipo álamo, chino, etc.” cuando hoy sabemos que la variabilidad se expresa entre regiones muy cercanas, en diferentes épocas del año y quizá entre diferentes colmenas. Se creía que la presencia de exinas de polen en el propóleos podría servir para determinar su origen botánico o que las colmenas recolectaban resinas “preparándose para invernar”. Hoy podemos descartar algunos de estos mitos, pero nos quedan muchas preguntas por responder, entre las que podríamos destacar: ¿Cómo identifican las abejas las fuentes de resinas?, ¿Cómo informan al resto de las abejas para producir el reclutamiento?, ¿Cómo transmiten información respecto de la calidad de la fuente encontrada?, ¿Cómo se desencadena el “input” de recolección dentro de la colonia?

Propóleos argentinos: los resultados obtenidos permiten afirmar que el propóleos argentino presenta un elevado contenido de compuestos biológicamente activos como fenoles y flavonoides, existiendo diferencias significativas entre regiones, pero a su vez existe una gran variabilidad dentro de cada región, lo que sustenta la necesidad de profundizar en dicha variabilidad y conocer su origen para poder avanzar en la estandarización de los productos obtenidos, asegurando un mejor aprovechamiento de sus propiedades.

En la mayor parte de los ensayos no se observaron diferencias significativas entre la producción de propóleos utilizando el método de cuñas y la realizada empleando alguno de los dos tipos de mallas ensayadas, salvo excepciones. A partir de los resultados obtenidos no puede generalizarse acerca de la conveniencia de un método de obtención respecto de otro considerando solamente la cantidad de propóleos recolectada. Si bien se realiza una aproximación a la evolución de la recolección a lo largo del año resulta indispensable conocer la curva de ingreso de resinas a la colonia y la producción de propóleos en cada zona para lograr una cosecha eficiente.

Una de las contaminaciones más importantes del propóleos es la presencia de metales pesados, y entre ellos, el más común es el plomo que puede provenir de la atmósfera (contaminación ambiental) o ser incorporado durante la cosecha, extracción o procesamiento.

Existen diferencias significativas en la cantidad de plomo presente en el propóleo obtenido mediante el método de raspado y los métodos de mallas, mientras que entre los dos tipos de mallas no se detectan diferencias. Respecto a los métodos de análisis utilizados, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante una técnica espectrofotométrica y otra empleando espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

El propóleo es un valioso recurso natural, muy eficaz para la prevención de enfermedades de enorme repercusión como lo son las vinculadas con la biología de los radicales libres, las inmunológicas y las infecciosas. Su empleo beneficiaría la Salud Pública de los países de la región y a miles de apicultores. Para que esto sea posible resulta imprescindible una eficiente interacción entre el sector productivo, académico y el empresarial.

Paulo Coelho, en un pasaje de su novela "El Alquimista", relata que el personaje al atravesar el desierto es interceptado por ladrones, quienes lo registran:

"...encontró un pequeño frasco de cristal lleno de líquido y un huevo de vidrio amarillento, poco mayor que un huevo de gallina. -¿Qué es todo esto? -inquirió

- *Es la Piedra Filosofal y el Elixir de la Larga Vida. Es la Gran Obra de los Alquimistas. Quien tome este elixir jamás caerá enfermo, y una partícula de esta piedra transforma cualquier metal en oro.*
- *Los ladrones rieron a más no poder, y el Alquimista rió con ellos. Les había hecho mucha gracia la respuesta, y los dejaron partir sin mayores contratiempos con todas sus pertenencias.*
- *Está usted loco? -preguntó el muchacho al Alquimista, cuando ya se habían distanciado bastante-. ¿Por qué les dijo eso?.*
- *Para enseñarte una simple ley del mundo -respondió el Alquimista-. Cuando tenemos los grandes tesoros delante de nosotros, nunca los reconocemos. ¿Y sabes por que?. Porque los hombres no creen en tesoros."*

Con frecuencia nos desilusiona la indiferencia que expresan muchos profesionales frente a la evidencia de las propiedades terapéuticas del propóleo. Tal vez ello obedece parcialmente al dilema de los "paradigmas". Al leer la novela de Paulo Coelho, quizás se entienda mejor esa reacción irreflexiva, que incluso va contra los principios del espíritu científico, el cual debería estar abierto a las nuevas ideas, ser analítico, libre de preconceptos y despojado de prejuicios.

ANEXO

COMPUESTOS FENÓLICOS

En general se trata de compuestos derivados de las plantas, que poseen en común un anillo aromático con uno o más oxidrilos como sustituyentes. El compuesto fenólico más simple es el fenol y se representa en la Fig. 1.

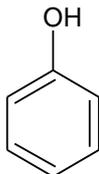
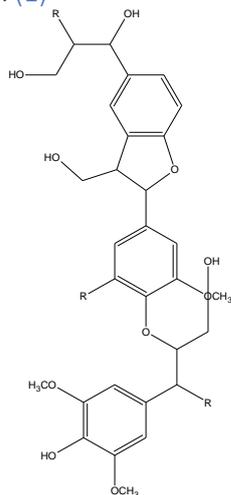
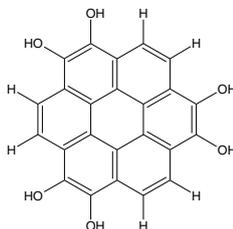


Figura 1. Estructura del fenol

Cuando se unen con azúcares, se denominan glicósidos y por lo general son solubles en agua, por el carácter polar del azúcar, en tanto que la forma aglicona (no combinada) es menos soluble. Hasta el presente se conocen varios miles de compuestos fenólicos, de los cuales la mayor parte son flavonoides y en menor cantidad se encuentran los fenoles monocíclicos simples, los fenilpropanoides y quinonas fenólicas. En las plantas además se encuentran importantes estructuras poliméricas como las ligninas, melaninas y taninos que son polifenoles. Ocasionalmente se pueden encontrar grupos fenólicos unidos a las proteínas, alcaloides y terpenos. (1)



Unidad estructural de lignina



Estructura monomérica de melanina

Figura 2. Estructuras de polímeros fenólicos de plantas

Mientras que la función de algunos compuestos fenólicos es conocida (por ejemplo: la lignina forma parte de la pared celular, las antocianinas se encuentran en las flores), la de otros como por ejemplo los flavonoides, no está aún dilucidada completamente.

Las sustancias fenólicas son compuestos aromáticos y por lo tanto absorben fuertemente la radiación UV.

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se encuentran frecuentemente en frutas y vegetales, unidos de diversas formas tales como ésteres, glicósidos y conjugados con otros ácidos orgánicos. Entre los tipos de ácidos monocíclicos mas simples se encuentran el ácido benzoico (C_6-C_1), el ácido cinámico (C_6-C_3) y sus derivados como se muestra en la Figura 3. (2)

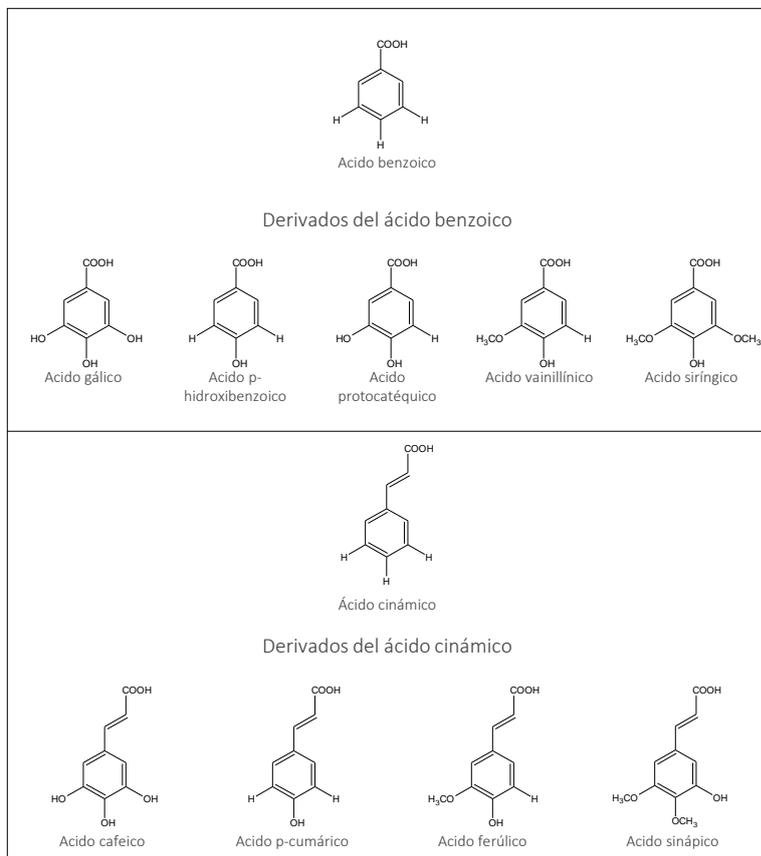


Figura 3. Ácidos benzoico, cinámico y sus derivados

La mayoría de los derivados del ácido benzoico muestran un máximo de absorción UV entre 246-262 nm, con un hombro entre 290-315, excepto el ácido gálico y el sirínico que tienen absorción máxima en 272 y 275 nm respectivamente. El cinámico absorbe en dos regiones del UV y presenta un máximo entre 225-235 nm y otro entre 290-330 nm (2).

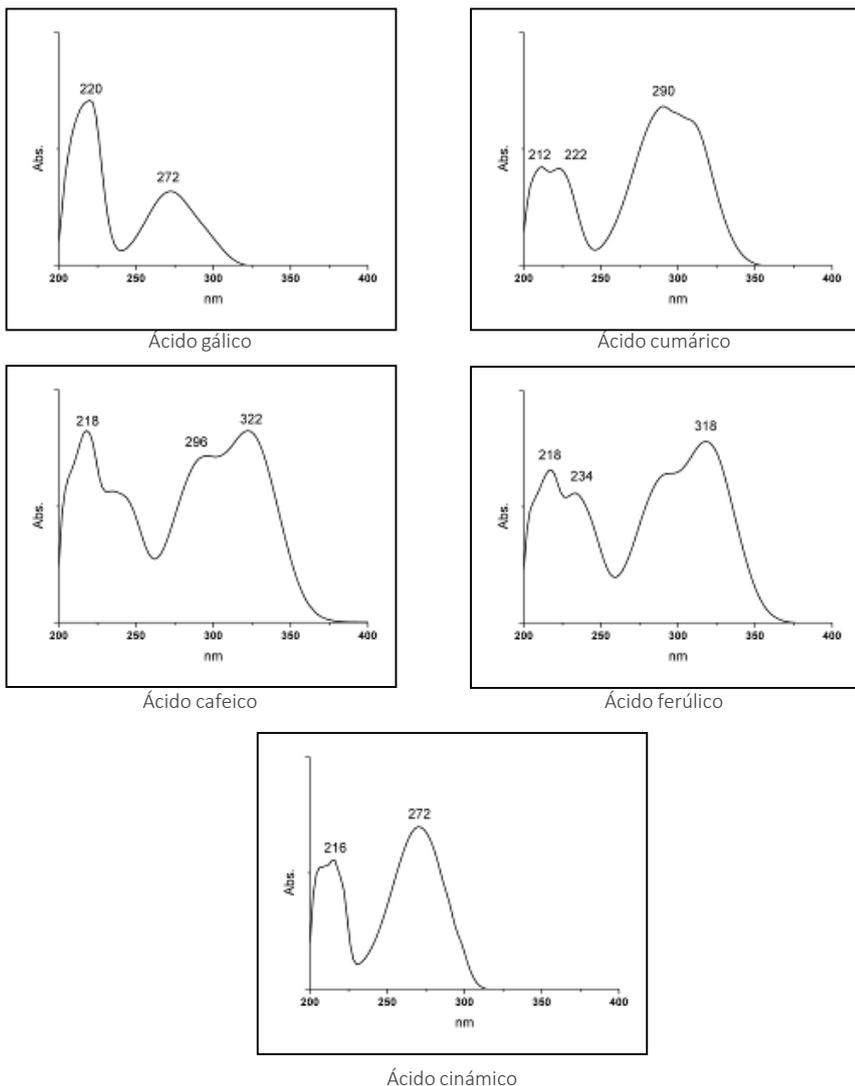


Figura 4. Espectros de absorción UV de los ácidos gálico, cumárico, cafeico, ferúlico y cinámico. (Fuente: Laboratorio de Agroindustrias – INTA EEA Famaillá)

Flavonoides

Se denominan como flavonoides a varias clases de sustancias naturales que contienen dos anillos aromáticos unidos mediante una cadena de tres átomos de carbono (compuestos $C_6C_3C_6$) que se encuentran ampliamente distribuidas en los vegetales y que son biosintetizadas en parte a partir del ácido shikímico y en parte a partir de la acetilcoenzima A vía malonilCoA (biosíntesis mixta).

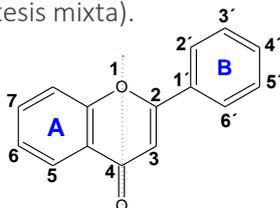


Figura 5. Estructura básica de un flavonoide

Tres moles de malonil coenzima A (CoA) a partir del metabolismo de la glucosa se condensan para formar el anillo A, catalizado por chalcon sintetasa. El anillo B también proviene del metabolismo de la glucosa, pero vía el camino del shikimato a través de fenil alanina, que es convertido en ácido cinámico y luego en ácido cumárico.

Los flavonoides son miembros de una clase de compuestos naturales que han sido recientemente un tema de interés científico y terapéutico considerable. Se encuentran en las células de las plantas verdes (especialmente angiospermas), sin embargo, hasta ahora, no se ha encontrado ninguna evidencia de una implicación directa de estos compuestos en la fotosíntesis pero dado que la absorción de radiación es intensa, se piensa entonces que deben actuar en la regulación de los genes (3). Se han encontrado en diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas; y en forma libre (flavonoides agliconas), como glicósidos, como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros. Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos.

De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes de hallar. En hongos y algas se han detectado muy pocos flavonoides. Junto con los carotenoides y los derivados del tetra pirrol se constituyen en los tres pigmentos naturales más importantes.

Se estima que aproximadamente el 2% del carbono asimilado por las plantas, se convierte en flavonoides o compuestos estrechamente relacionados, por lo que se constituyen en uno de los mas grandes grupos fenólicos naturales.

Se han identificado más de 4000 flavonoides, pertenecientes a 12 sub clases. Los colores naranja, rojo y azul en las frutas, verduras, flores y tejidos de reserva de las plantas se deben a las antocianinas solubles en agua, pues se encuentran como sales, que se obtienen por reducción de los flavonoides amarillos debido a la pérdida de oxígeno. Las antocianinas contribuyen a la atracción de animales para favorecer la dispersión de semillas y la polinización (4). Se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul.

Salvo casos especiales, muy pocas veces se encuentran varias clases de flavonoides en un mismo tejido vegetal.

Clasificación y nomenclatura

Los flavonoides se clasifican en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C3 (Figura 5). La mayoría de los flavonoides agliconas poseen nombres triviales con la terminación INA u OL. Por ejemplo la acacetina es una flavona y corresponde a la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona. La quercetina es un flavonol y corresponde a 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol. La naringenina es una flavanona y corresponde a la 5,7,4'-trihidroxiflavanona. En el caso de los flavonoides glicosidados es muy común nombrarlos con relación al nombre trivial de la aglicona. Por ejemplo la apigenina corresponde a la 5,7,4'-trihidroxiflavona y la vitexina corresponde al 8-C--D-glucopiranosido de apigenina. (1)

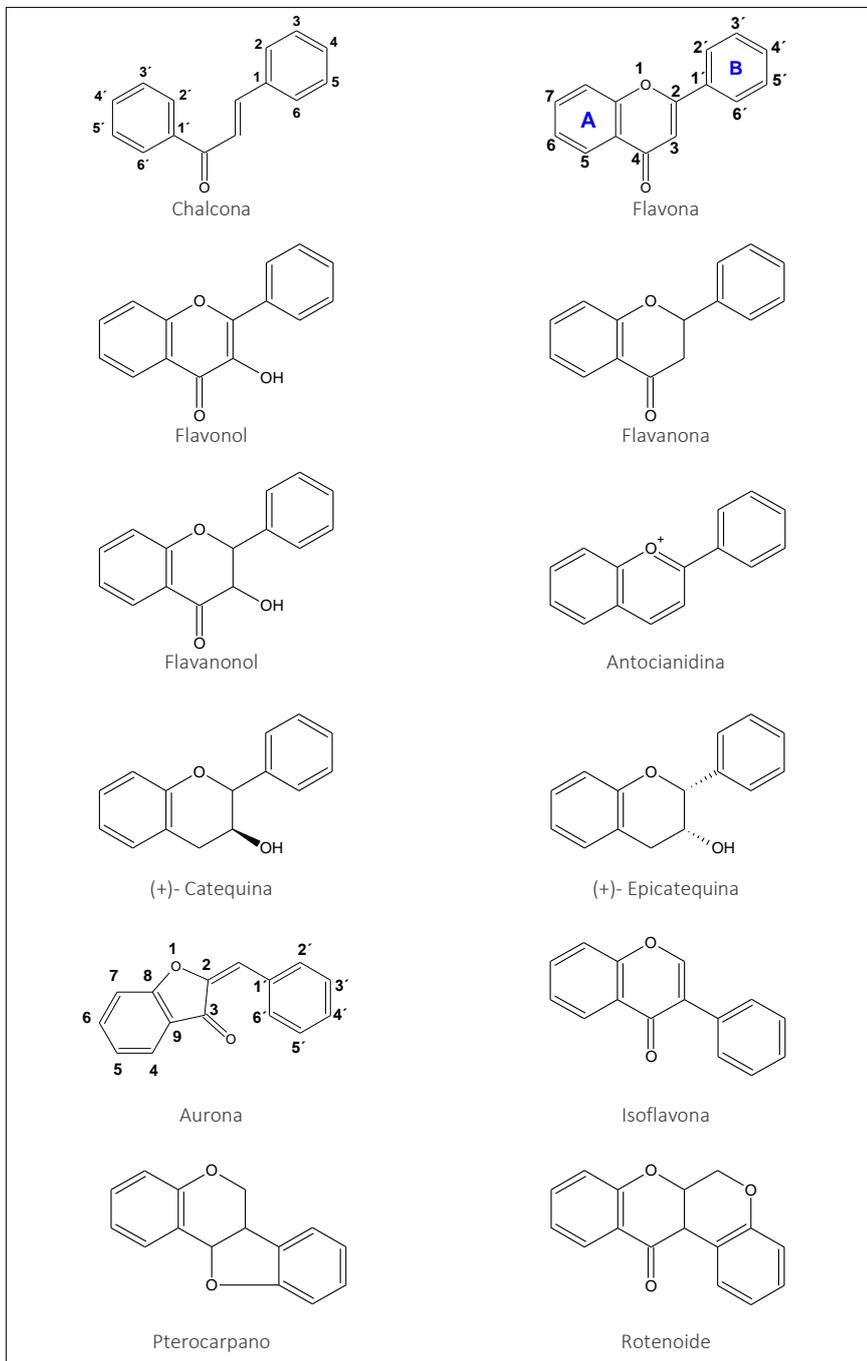


Figura 6. Diferentes tipos de flavonoides

Diversos grupos se introducen en la estructura básica (Fig. 5) a través de mecanismos de hidroxilación, metilación, acetilación, glicosilación y prenilación. Los flavonoides son frecuentemente hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7 y en las 3', 4' y 5'. Algunos de estos grupos oxidrilo son frecuentemente metilados, acetilados o sulfatados. Cuando se forma un glucósido, el enlace glicosídico se encuentra normalmente en posición 3 o 7 y los carbohidratos mas frecuentes son L-ramnosa, D-glucosa, glucoramnosa, galactosa o arabinosa. La prenilación normalmente se produce directamente sobre un átomo de carbono del anillo aromático, aunque también se han encontrados derivados O-prenilados.

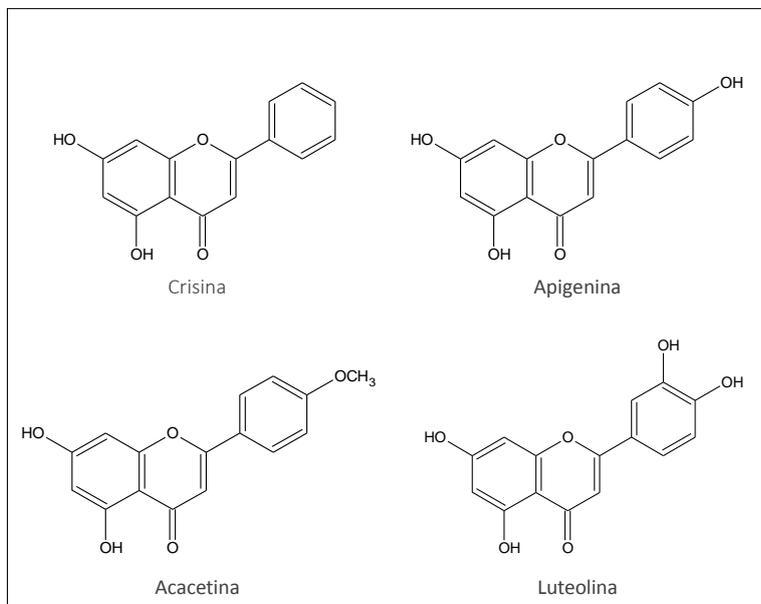


Figura 7. Ejemplos de flavonas

Los flavonoles están representados principalmente por la mircetina, fisetina, quercetina y kaempferol. La quercetina se encuentra en muchas frutas, verduras y bebidas. Es el principal flavonol en la dieta humana y es particularmente abundante en cebollas (0,3 mg/g de peso fresco) y en el té (10 – 25 mg/l).

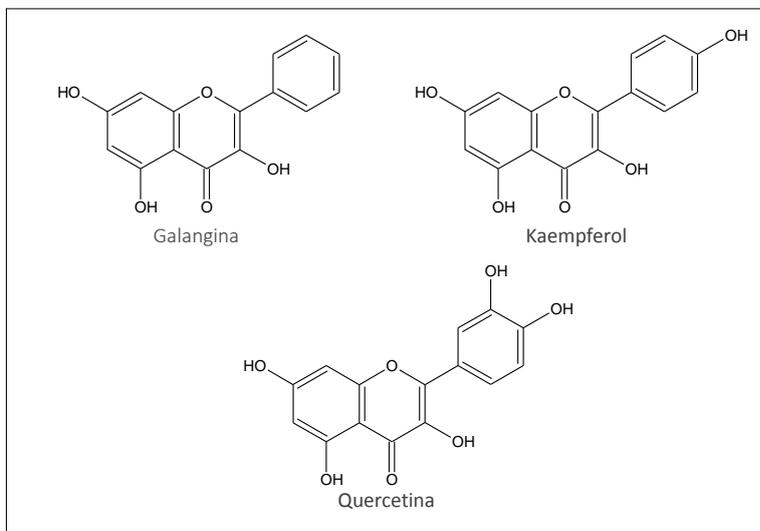


Figura 8. Ejemplo de flavonoles

Las isoflavonas están representadas principalmente por la diadzeína y la genistéina y se encuentran principalmente en los porotos de soja (aproximadamente 1 mg por gramo de semilla seca). Estas dos isoflavonas han despertado mucho interés ya que han demostrado propiedades estrogénicas y se sugiere tienen un rol en la prevención del cáncer de pecho y de la osteoporosis.

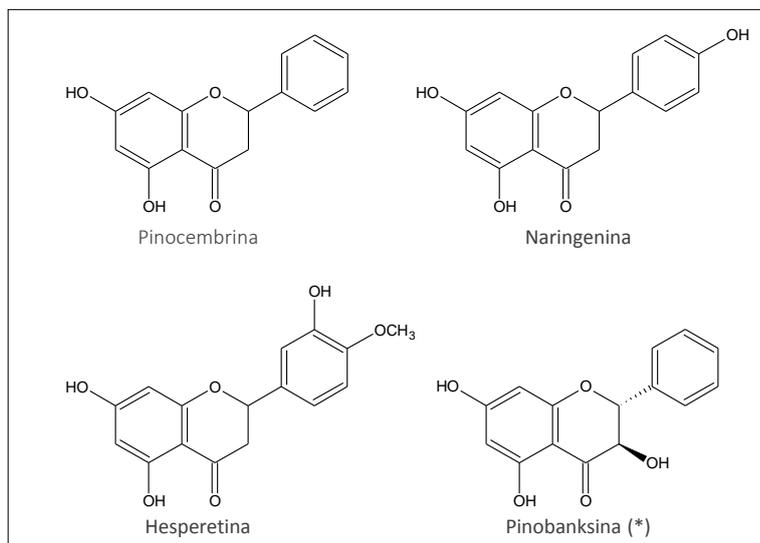


Figura 9. Ejemplo de flavononas y flavononoles (*)

Las catequinas son los principales flavonoles y son abundantes en el té. Los brotes mas jóvenes contienen entre 200 y 340 mg de catequinas, galocatequinas y sus derivados por gramos de hojas secas. Una infusión de té verde contiene 1 g/l de catequinas. En el té negro su contenido se reduce aproximadamente a la mitad debido a la oxidación a compuestos polifenólicos más complejos durante la fermentación. Otras fuentes son el vino tinto (aprox. 270 mg/l) y el chocolate. Las flavanonas están representadas principalmente por taxilofina, naringenina y hesperitina. Una de las principales fuentes de estos tipos de flavonoides son los citrus y el mas ampliamente consumido es la hesperidina de naranjas. Las flavonas son menos comunes y se han identificado en la miel y el perejil (apigenina) y el pimentón (luteolina) entre otros. (5)

Propiedades físicas (1)

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado y su forma (libre, glicósido ó sulfato). Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema conjugado son sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanonoles debido al carbono quiral C-2 presentan rotación óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos.

Como ya se mencionó, la solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Los flavonoides agliconas altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Los flavonoides agliconas altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo.

Los flavonoides con oxidrilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que hace años se utilizó para su elucidación estructural.

Los flavonoides glicosidados son sólidos amorfos que se funden con descomposición, mientras que las correspondientes agliconas son sólidos cristalinos.

Química de los flavonoides

El estado de ionización de los grupos fenólicos tiene una gran influencia en la absorción de la luz (color) y en el espectro de fluorescencia de estas sustancias, debido al fenómeno de tautomería prototrófica.

Espectroscopia UV

Los espectros de absorción en el UV de los flavonoides disueltos en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos.

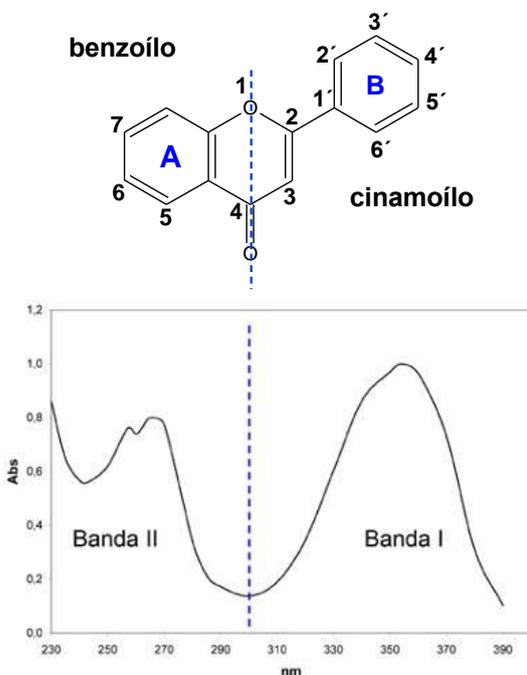


Figura 10. Bandas de absorción UV de flavonoides (cualitativo)

Las flavonas y flavonoles muestran dos máximos de absorción máxima en la región de 240 a 400 nm, que se indican normalmente como Banda I (entre 300- 380 nm) y Banda II (generalmente entre 240 – 280 nm). Se considera que la Banda I está asociada con la absorción debida al anillo B (sistema cinamoilo) y la Banda II con la absorción debida al anillo A (sistema benzoilo) (6). No obstante, a veces pueden presentarse otras bandas.

La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran entre 310-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituídos entre 330-360 nm, y los flavonoles entre 350-385 nm.

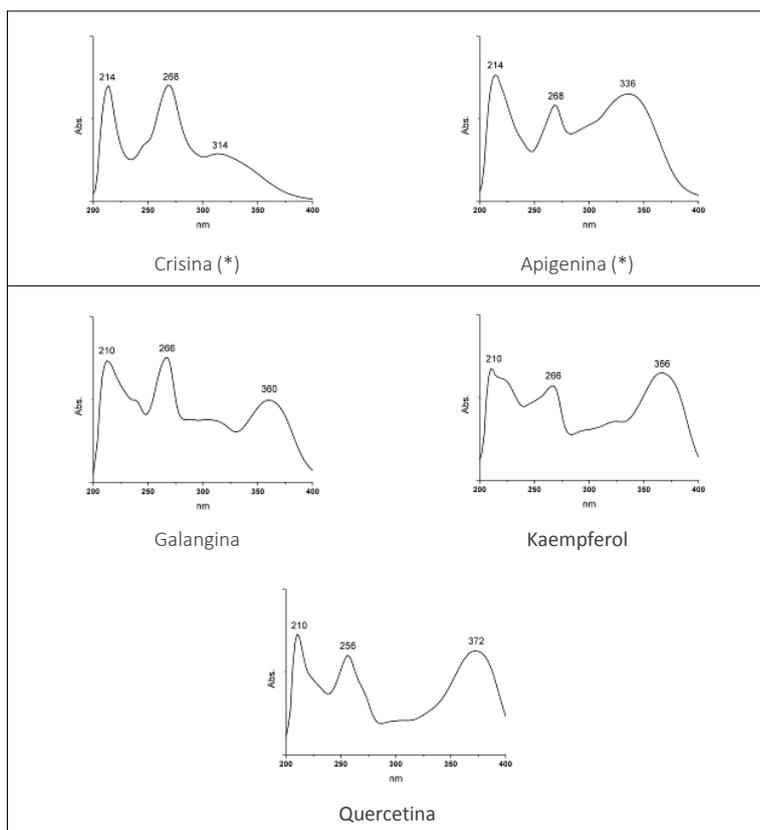


Figura 11. Espectros de absorción UV de flavonas (*) y flavonoles. (Fuente: Laboratorio de Agroindustrias – INTA EEA Famaillá)

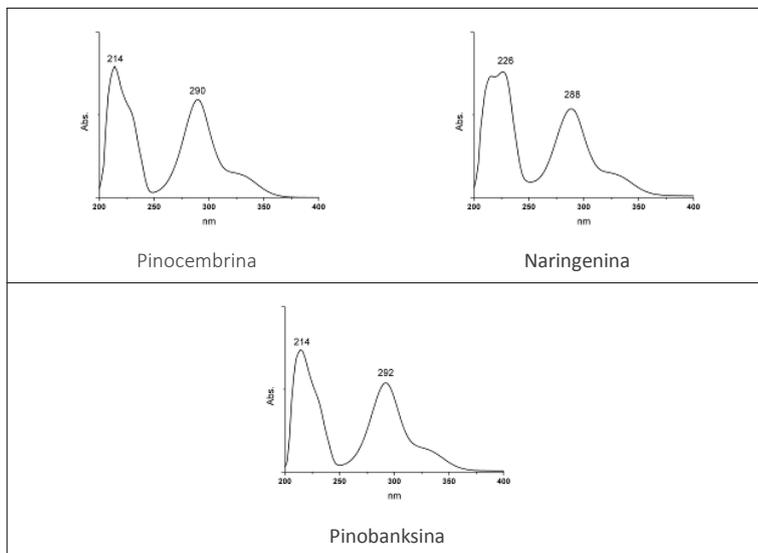


Figura 12. Espectros de absorción UV de flavanonas y flavonol (*). (Fuente: Laboratorio de Agroindustrias – INTA EEA Famaillá)

La presencia de oxidrilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento: metóxido de sodio, acetato de sodio, cloruro de aluminio, con y sin ácido clorhídrico y ácido bórico.

El metóxido de sodio es una base fuerte que ioniza los oxidrilos fenólicos presentes en la molécula y particularmente permite reconocer la existencia de grupos oxidrilos en 3 y 4'. Las flavonas 4'-hidroxiladas presentan desplazamiento batocrómico de 45-65 nm para la banda I al añadir metóxido de sodio pero la intensidad de la banda no decrece. Los flavonoles (ó 3-hidroxi flavonas) sin oxidrilo en 4', también presentan el mismo desplazamiento batocrómico de 45-65 nm, pero la intensidad de la banda se ve disminuida. En los flavonoles 3,4'-dihidroxiilados, orto-dihidroxiilados y diorto-trihidroxiilados, el espectro se descompone en pocos minutos luego de añadir el metóxido de sodio. La aparición de una banda alrededor de 330 nm (banda III) es característica de flavonas 7-hidroxiiladas.

El acetato de sodio es una base más débil que el metóxido de sodio e ioniza solo los oxidrilos fenólicos más ácidos: 3, 4' y 7. La ionización del oxidrilo en posición 7 afecta la banda II y por lo tanto el acetato de sodio es un reactivo útil para determinar la presencia de dicho oxidrilo. Si al añadir el acetato de sodio se observa un desplazamiento batocrómico de 5-20 nm en la banda II se trata de una flavona o flavonol 7-hidroxilado. Las flavanonas 5-hidroxiladas presentan un desplazamiento batocrómico de 35 nm. Los flavononoles (sin 5-OH) presentan un desplazamiento batocrómico de 60 nm. Sin embargo, Heinz y col. han reportado que se debe tener precaución en la obtención del espectro con acetato de sodio.

El ácido bórico en medio alcalino forma quelatos con oxidrilos fenólicos en posición relativa orto. La formación del quelato produce desplazamiento batocrómico en la banda I. Si el desplazamiento es de 12-36 nm se trata de un flavonoide (flavona, flavonol, aurona o chalcona) orto-dihidroxiado en el anillo B, pero si el desplazamiento batocrómico es menor, se trata de un flavonoide orto-dihidroxiado en el anillo A. Las isoflavonas, flavanonas y flavononoles orto-dihidroxiadas en el anillo A muestran desplazamiento batocrómico de 10-15 nm pero en la banda II.

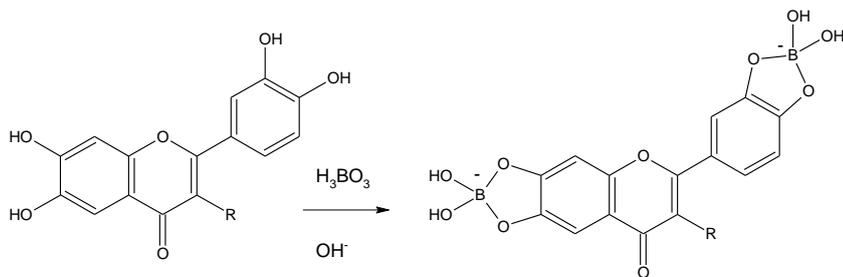


Figura 13. Reacción de los flavonoides con H₃BO₃ en medio alcalino

El cloruro de aluminio anhidro también forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxiados, 3-hidroxiados y 5-hidroxiados. En el caso de los orto-dihidroxiados el quelato es inestable a pH ácido, mientras que los quelatos formados con 3- y/o 5-hidroxiados son estables.

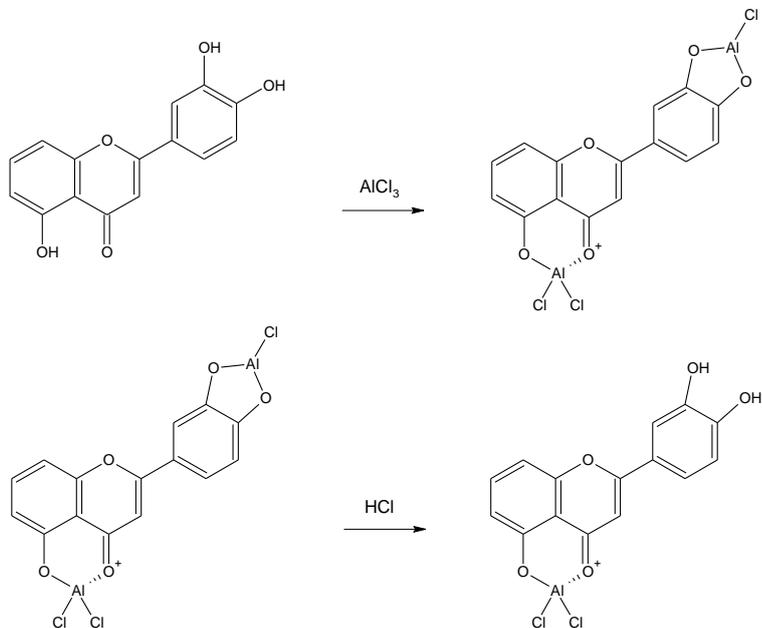


Figura 14. Reacción de los flavonoides con AlCl₃

Por lo anterior, si al determinar el espectro con cloruro de aluminio y ácido clorhídrico se mantiene un desplazamiento batocrómico de 35-55 nm en la banda I (comparando con el espectro metanólico) se trata de una flavona o un flavonol 5-hidroxiado. Si el desplazamiento es de 17-20 nm se trata de una flavona o un flavonol 5-hidroxiado y 6-oxygenado. Si el desplazamiento es de 50-60 nm se trata de una flavona o un flavonol 3-hidroxiado (con o sin 5-OH).

En el caso de flavonoides (flavonas y flavonoles) orto-dihidroxiados en el anillo B (sin 3-OH ni 5-OH) al añadir el cloruro de aluminio se obtiene un desplazamiento batocrómico de la banda I de 30-40 nm, el cual se pierde al añadir el ácido clorhídrico. Los orto-dihidroxiados en A (sin 3-OH ni 5-OH) muestran un desplazamiento de la misma banda de 20-25 nm, el cual se pierde también al añadir el ácido clorhídrico.

Otros flavonoides como las flavanonas, isoflavonas y flavanoles presentan desplazamientos batocrómicos pero en la banda II. Las auronas, chalconas y antocianidinas también presentan desplazamientos batocrómicos en la banda I.

Fluorescencia

Otra característica interesante de los flavonoides desde el punto de vista electrónico es su fluorescencia. Aún no se ha establecido si esta característica es utilizada fisiológicamente, pero podría serlo puesto que a través de la fluorescencia se pueden transferir pequeñas cantidades que pueden ser suficientes para activar los pigmentos asociados a los genes sensibles a la luz. La gran diversidad de los flavonoides hace que estos pigmentos resulten convenientes para una clasificación taxonómica. Su utilidad para este caso es realzada por la estrecha relación entre los flavonoides y los genes vitales, especialmente los implicados en la regulación del crecimiento. Se esperaba que tales genes fueran particularmente sensibles a las señales ambientales y, por lo tanto, reflejaran la naturaleza del biotopo y la fuerza competitiva de la especie.

Reacción con los metales pesados. (3)

Los metales pesados son ávidos por formar enlaces, incluso en sistemas biológicos y como ejemplos se pueden mencionar la hemoproteína, la cobalamina (vitamina B12). Entre los metales pesados que son esenciales para los sistemas bioquímicos se encuentran: hierro (Fe^{2+}), cobre (Cu^{2+}), cinc (Zn^{2+}), manganeso (Mn^{+2}), cobalto (Co^{+3}), níquel (Ni^{+2}).

Sin embargo, otros iones de metales pesados son fuertes inhibidores de los grupos sulfidrilos en los sitios activos de las enzimas anabólicas y protectoras, por ejemplo la γ -ácido levulínico sintetasa, la ferroquelatasa, todas las kinasas y dehidrogenasas. Entre los iones que presentan esta actividad indeseable se encuentran: mercurio (Hg^{+2}), cinc (Zn^{2+}), estaño (Sn^{2+}) y también los antes mencionados si se encuentran en exceso.

Los elementos libres correspondientes a estos iones son menos tóxicos (entre 100 y 1000 veces menos) ya que estos elementos en forma de metales son menos solubles y químicamente más inertes. Sin embargo, las especies de oxígeno reactivas y los oxidantes fuertes en el organismo son capaces de oxidarlos. Por otra parte, los metales pesados en su forma elemental tienen tendencia a acumularse en el tejido adiposo y en el hígado y desde allí es muy difícil movilizarlos debido a su baja reactividad y a su inaccesibilidad por los solventes, aunque a largo plazo también resultan tóxicos.

Se conocen muchos casos de intoxicación crónica con metales pesados. Por ejemplo la ingestión de sales de mercurio, intoxicación con plomo debido a fallas en las amalgamas de plomo utilizadas en odontología.

Miles de pacientes han sido y son intoxicados por metales pesados y hasta ahora, los mejores agentes curativos que se han aprobado para el uso clínico han sido compuestos sintéticos de poli sulfidrilos. Sin embargo estos compuestos presentan problemas para detoxificar debido a su baja solubilidad en agua, por lo que deben ser administrados en forma oral y se absorben en el intestino, solamente en una pequeña proporción. La parte que alcanza a circular, probablemente es transportada por las micelas biliarias. Solo una muy baja concentración de polisulfidrilos logra alcanzar el hígado y debido a la fuerte asociación de los metales pesados con los depósitos de lípidos, solo una pequeña cantidad de los componentes tóxicos pueden ser movilizados y excretados por la bilis.

La ventaja de los flavonoides como agentes terapéuticos consiste en que podrían movilizar efectivamente (especialmente los derivados solubles en agua) los metales pesados. Una vez que reingresan en el torrente sanguíneo podrían eliminarse por diálisis combinada con afinidad cromatográfica sobre una matriz que contenga grupos poli sulfidrilos. Al presente, una terapia que combine el uso de polímeros de poli sulfidrilo junto con flavonoides parece ser un tratamiento promisorio.

Toxicidad aguda de los flavonoides

La determinación de la LD50 en animales se determinó inyectando grandes cantidades de solución de flavonoides agliconas en la sangre de ratas. Se obtuvo un valor de ± 2 g/kg de peso corporal.

Debido a la baja solubilidad de los flavonoides agliconas en agua, al corto tiempo de residencia en el intestino y al bajo coeficiente de absorción, es casi imposible que se produzcan efectos tóxicos agudos en humanos por el consumo de flavonoides, con la excepción de la aparición de algún tipo de alergia que se produce raramente.

La concentración de flavonoides después de la infusión de formas solubles, como por ejemplo de hidroxietilrutósidos directamente en la sangre, con el propósito del control de la presión arterial o para la fortificación de vasos sanguíneos debilitados ha alcanzado como máximo 2 a 3 órdenes de magnitud inferiores a la LD50 para ratas.

El margen de seguridad para el uso terapéutico de los flavonoides en humanos, es por lo tanto muy grande y probablemente no sea sobrepasada por ninguna otra droga en uso actualmente.

Sin embargo se debe notar que el uso de flavonoides impuros, extraídos de plantas y por vía endovenosa puede resultar riesgoso, debido a las otras sustancias que pueden encontrarse en el extracto, pudiendo llegar a producir un shock anafiláctico o una crisis inmunológica.

Potencial de Oxidación – Reducción de los flavonoides

Como todos los compuestos fenólicos, los flavonoides tienen tendencia a oxidarse a quinonas. Este proceso, que puede estar acompañado por una ruptura del anillo en el C1, como sucede con la antocianidinas, se produce muy fácilmente con luz UV, especialmente si se encuentran presentes iones de metales pesados.

Debido a que los flavonoides pueden proteger a los ácidos grasos insaturados en las membranas y al ascorbato de la oxidación es posible estimar sus potenciales de oxidorreducción.

La existencia de una gran variedad de flavonoides sugiere que deben existir diferencias en sus potenciales de oxidación – reducción. Debido a que una gran cantidad de flavonoides coexisten en las células de las plantas, en el sistema de transporte de la savia y en los productos de las plantas se podría esperar un espectro de catalizadores de transferencia electrónica que podría acelerar la oxidación de sistemas fisiológicos.

Los Flavonoides y su mecanismo de acción

Las propiedades químicas de los polifenoles en términos de la disponibilidad de sus hidrógenos fenólicos como barredores hidrógeno-donadores de radicales predicen su actividad antioxidante. Para que un polifenol sea definido como un antioxidante debe satisfacer 2 condiciones básicas:

1. cuando está presente en baja concentración relativa a un sustrato oxidable puede demorar, retardar o prevenir la autoxidación o la oxidación mediada por radicales.
2. el radical resultante luego de la captación debe ser estable respecto a oxidación ulterior, a través de combinación de hidrógeno intramolecular (7).

Los flavonoides actúan como “scavengers” de varias especies oxidantes, por ej. anión superóxido, radical hydroxyl o radical peróxido. Se ha demostrado que un grupo carbonilo en C-4 y un doble enlace entre C-2 y C-3 son también importantes para brindar mayor actividad antioxidante (8).

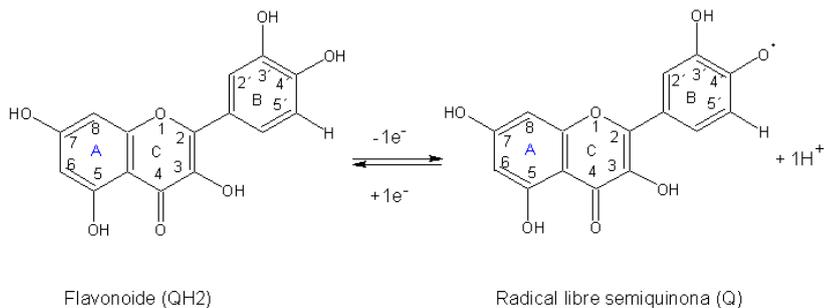


Figura 15. Representación de una posible reacción de los flavonoides con los RL.

Un antioxidante como el radical libre semiquinona del flavonoide, entrega el electrón al radical libre y lo reduce a su forma neutra, evitando que el RL reaccione con el O₂ y provoque la peroxidación de los ácidos grasos de la membrana celular (envejecimiento) peroxidación de lípidos en las partículas de LDL (arterioesclerosis), daño al ADN (cáncer), modificaciones irreversibles en las proteínas (cataratas) o activación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (cuadros inflamatorios crónicos), entre otros efectos.

Por otro lado, el radical Q. puede atrapar especies radicalarias más activas formando un enlace covalente (efecto "scavenger"). En tercer lugar, la semiquinona puede sufrir otra oxidación y transformarse en la forma quinona. Por otra parte también se ha descrito que los flavonoides protegen la vitamina C de su degradación, además **estos polifenoles, uno de los principales componentes del propóleo poseen la capacidad de actuar en sinergismo con el ácido ascórbico** (9,10). Se ha determinado que los fumadores tienen una reducción de dicha vitamina plasmática en alrededor del 40 % con respecto a los no fumadores (11). Este es un mecanismo indirecto por el cual el propóleo también contribuye con los mecanismos antioxidantes del organismo. Considerando lo expuesto, este grupo de la población debería incrementar su consumo de flavonoides para reducir el riesgo de afecciones vinculadas con los radicales libres.

Los nutricionistas dieron gran importancia a las vitaminas, minerales y oligoelementos, sin embargo los flavonoides no fueron considerados importantes en la alimentación. Ahora estos parecen ser la siguiente frontera en las ciencias alimenticias. El interés por los flavonoides ha crecido en los últimos años al conocerse que la quercetina, considerado el principal flavonoide en la alimentación, inhibe la carcinogénesis inducida en ratas e inhibe la proliferación de células tumorales de colon in vitro. (13) Además la quercetina cede electrones con lo que atrapa Radicales Libres (scavenger) como el anión superóxido e inhibe la peroxidación lipídica (14), que de acuerdo a la teoría del estrés oxidativo, sería el primer paso hacia la aterosclerosis. Además la quercetina protegería de la oxidación el alfa tocoferol presente en las partículas de LDL. Para los investigadores esta sería una cualidad destacable de estos antioxidantes naturales que también ha contribuido con su desarrollo.

Además, como ya se mencionó anteriormente, poseen la capacidad de quelar metales, especialmente hierro y cobre, que los hace actuar indirectamente como antioxidantes ya que inhiben la acción de los metales como catalizadores previniendo la formación de radicales libres. La quercetina inhibe la oxidación de LDL a concentración de 2 μ M/ml. Para diversos investigadores los flavonoides "pueden ser componentes antiaterosclerosis naturales de la dieta, aunque ello dependerá en mayor grado de su farmacocinética" (15).

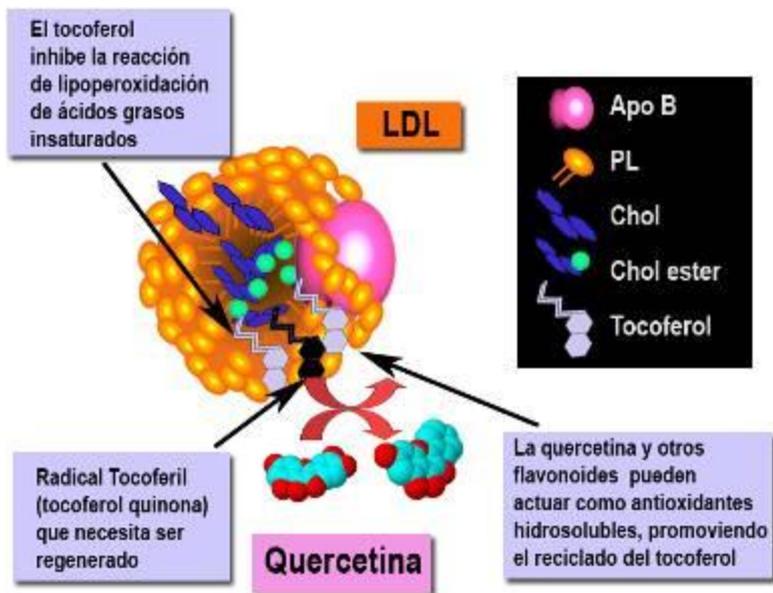


Figura 16. Mecanismo de acción antioxidante de los flavonoides a nivel de LDL.
(Reproducido con autorización: Referencia (12))

Entre otras interesantes observaciones están los reportes que indican que el kaempferol y quercetina suprimen eficientemente la citotoxicidad inducida por LDL oxidada a concentraciones de 5 mM/ml. También otros flavonoides son activos pero solo a altas concentraciones (16). En adicción los flavonoides inhiben la enzima ciclo oxigenasa, lo cual puede reducir trombosis. La combinación de ambos mecanismos explicaría la acción preventiva de Infarto de Miocardio que muestran los flavonoides. El criterio químico para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides (17) es el siguiente:

- Presencia de estructura o-dihidroxi en el anillo B; esto le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura 2-3 en conjunción con la función 4-oxo del anillo C
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C son necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

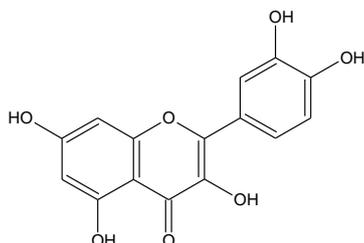


Fig.17. Estructura de un flavonoide (quercetina)

Datos epidemiológicos: enfermedades cardiovasculares y alimentación. Los flavonoides previenen enfermedades.

El estudio MONICA realizado por la OMS en 1989 contribuyó en el creciente interés que se ha despertado por los flavonoides. Dicho estudio confirmó que las tasas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en Francia eran mucho menores que en otros países industrializados como EE.UU. y el Reino Unido, vinculado ello con el mayor consumo de estos fitonutrientes. (18)

Según datos de la OMS, las enfermedades no transmisibles son responsables de cerca del 60% de la mortalidad en todo el mundo y del 45% de la morbilidad. Los expertos señalan como principales factores de riesgo el sedentarismo, las dietas no saludables y el consumo de tabaco. La OMS estima que el déficit en la alimentación de frutas y verduras provoca cada año 2,7 millones de muertes y se encuentra entre los diez factores de riesgo que contribuyen a la mortalidad. Este anuncio fue realizado en el marco del encuentro anual para la prevención y el control de enfermedades no transmisibles, que se celebró en el 2003 en Río de Janeiro. "Hay una fuerte y creciente evidencia de que un consumo suficiente de verduras y frutas ayuda a prevenir numerosas enfermedades y favorece un buen estado de salud. Sin embargo, una gran parte de la población mundial consume muy poco estos alimentos", destacó el director de la OMS en el área de Prevención y Promoción de la Salud.

Múltiples estudios epidemiológicos han evidenciado reducción del riesgo de enfermedad coronaria en sujetos con alto consumo de flavonoides. Un estudio longitudinal llamado Estudio "Zutphen" (9) concluyó que el consumo regular de flavonoides puede reducir el riesgo de muerte por enfermedad coronaria cardíaca y menor incidencia de infarto de miocardio. El consumo promedio de flavonoides en esa población es de 26 mg /día (DS 14,5), cuyo origen 61 % es del te. En 1996 se publicó un estudio de cohorte realizado en Finlandia, cuya conclusión fue que las personas con muy bajo consumo de flavonoides tienen más riesgo de enfermedad coronaria (10). Se han conocido datos contradictorios en otros estudios que se deberían al consumo de te con el agregado de leche, pues las grasas afectarían la biodisponibilidad de los flavonoides.

Uno de los estudios más importantes fue realizando 16 cohortes en 7 países, entre sus resultados destacaron que el más bajo consumo fue 2,6 mg/día en el Oeste de Finlandia y el más elevado de 68,2 mg/día en Ushibuka Japón. La quercetina representó entre un 100 % del total de flavonoides consumidos en el cohorte finlandés y 3un 9 % en Zutphen Holanda **El consumo de flavonoides y quercetina presentó una fuerte correlación con un coeficiente =0,92 (r) y el consumo de flavonoides estuvo inversamente relacionado con la mortalidad por enfermedad cardiaca coronaria. (19)**

Tabla 1: Nivel de flavonoides en algunos alimentos.

Nivel de flavonoides		Alimentos
Bajo	< 10 mg/kg	Espinaca, repollo, zanahoria, naranja.
Medio	> 10 mg/kg < 50 mg/kg	Lechuga, tomate, uva, vino tinto, te, manzana.
Alto	> 50 mg/kg	Cebolla, brócoli, apio.

Fuente: Referencia (19)

El principal origen de los flavonoides en la dieta fueron vegetales, frutas, jugos de frutas, te y vino.

En 1999 se publicó otro importante estudio llamado "Róterdam", allí se evaluó la acción de los flavonoides del te protegiendo de la aterosclerosis (20). Se trató de un estudio prospectivo que incluyó 7983 hombres y mujeres mayores de 55 años. La información se entró en un modelo de regresión lineal múltiple, con aterosclerosis aórtica como la variable dependiente. La edad fue ajustada por Odds Ratios (ORs) con un intervalo de confianza del 95 %, estableciéndose que existe una correlación inversa y significativa entre el consumo de te y aterosclerosis aórtica. ORs decreció de 0,54 a 0,31 de las personas de menor consumo a aquellas de mayor consumo. El estudio concluye que el consumo de te protege frente a enfermedades cardíacas isquémicas.

En una revisión del tema, publicada en el 2004 en British J. Cardiology, se concluye que la evidencia de que los flavonoides pueden aportar una importante contribución a la salud cardiovascular ha crecido a un grado que no puede continuar siendo ignorado. (21)

El ASAP (22) (Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention), es un estudio que evaluó la capacidad que poseen las vitaminas E y C asociadas, retardando la progresión de aterosclerosis carotídea en el hombre. 803 personas fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos: 1) placebo, 2) Vit. E, 3) Vit. C y 4) ambas Vitaminas. El estudio tuvo un seguimiento de 3 años, y concluyó que se retarda 74 % (95% CI 36-89%, P=0,003) la progresión de la aterosclerosis carotídea en hombres fumadores que recibieron ambas vitaminas que aquellos que solo recibieron placebo. Los autores concluyeron que esto puede implicar beneficios con respecto a otros eventos basados en aterosclerosis.

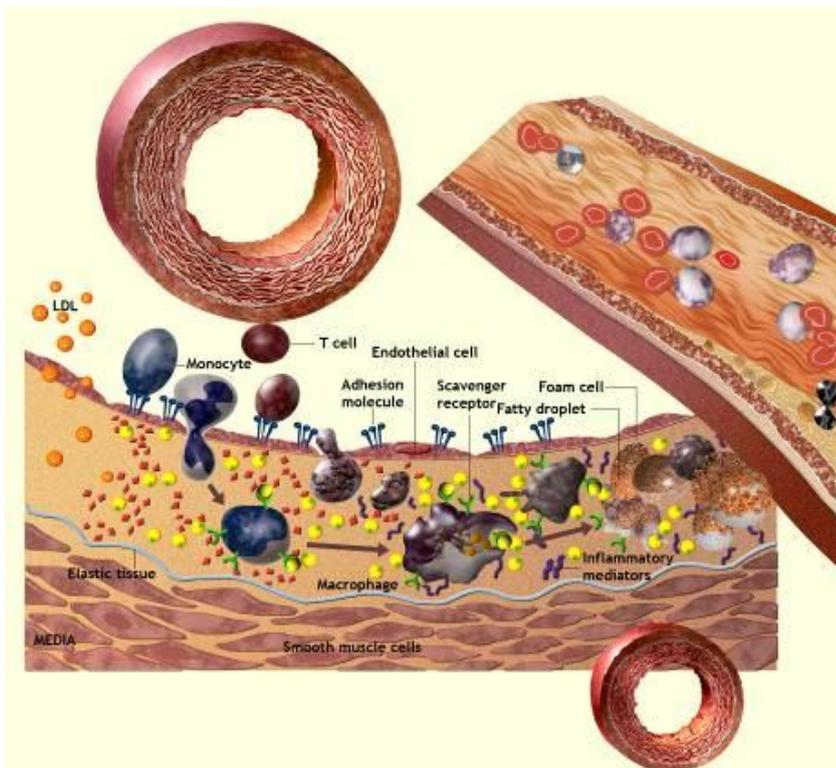


Figura 18: Representación del inicio de la formación de la placa de ateroma en la pared de una arteria. EL LDL oxidado es fagocitado por los macrófagos quienes dan inicio a la estría grasa y esta a la placa de ateroma. Reproducido con autorización: Referencia (12).

Los flavonoides reducen la disfunción endotelial

Recientes investigaciones señalan que una de las principales vías por las cuales los flavonoides pueden influir en la prevención de enfermedades cardiovasculares, es sobre la síntesis del óxido nítrico (NO) y esto puede revertir la disfunción endotelial. Actualmente se atribuye gran importancia a la disfunción endotelial en la génesis de las enfermedades cardiovasculares y las patologías diabéticas. (23,24)

El consumo de alimentos ricos en flavonoides, especialmente frutas y verduras, ha sido asociado con una pequeña pero significativa reducción de la presión arterial sistólica y diastólica en pruebas clínicas. (25)

Un estudio publicado en *Circulation*, se concluye que los polifenoles del vino tinto incrementan la actividad de la óxido nítrico sintetasa (eNOS) y subsecuentemente la producción a nivel endotelial de NO. El incremento de la actividad de la eNOS puede antagonizar el desarrollo de la disfunción endotelial y aterosclerosis, una hipótesis que apoya la visión que el vino tinto realmente puede tener a largo término propiedades cardiovasculares protectoras mediadas por sus polifenoles. (26)

Niraldo Paulino llevó a cabo un estudio de los mecanismos farmacológicos de la acción del extracto estandarizado (Universidades del Sur de Santa Catarina y Bandeirantes de San Pablo). El autor hace referencia que ha sido demostrado experimentalmente que extractos de propóleos poseen actividad antioxidante, sea a través de secuestro de radicales libres de oxígeno reactivo, sea a través de inhibición de su formación. Estos mecanismos pueden prevenir la degradación del óxido nítrico (NO), potenciando su acción endógena, y por consiguiente sus efecto sobre los sistemas celulares. Es conocido que formas radicalares de oxígeno reactivo, compiten directamente con el NO endógeno, contribuyendo para a su rápida degradación. La remoción de estas formas radicalares de oxígeno reactivo, principalmente por la presencia de compuestos fenólicos en la muestra de propóleos testada, pueden explicar, por lo menos en parte, la relativa importancia que la vía de NO desempeña en la respuesta biológica producida por el propóleos. (27)

La Hipótesis oxidativa de aterogénesis

En 1991 el Dr. Daniel Steinberg, organizó en Estados Unidos una reunión sobre el papel de los antioxidante en la prevención de la aterosclerosis humana, ya había un gran preocupación a nivel mundial por conocer la relación que existe entre daño oxidativo y aterosclerosis. En los 90 se produjo una clara vinculación entre radicales libres (RL) (agentes oxidantes) y la aparición de importantes patologías en humanos al superarse las defensas antioxidantes como la aterosclerosis (28,29), responsable del 40 % de las muertes en los países industrializados, existiendo abundante información surgida en el laboratorio que apoya la conexión entre antioxidantes de la dieta y la reducción del riesgo de aterosclerosis (30,31). Los RL también participan en la génesis de procesos inflamatorios, patología neurodegenerativa, oncogénesis, y el propio envejecimiento (32). Estudios in vitro han demostrado que muchos polifenoles naturales como la Quercetina, son incluso más potentes que los AO más consumidos como las vitaminas E y C (33,34)

La hipótesis oxidativa propone que sólo las partículas LDL oxidadas serían responsables del proceso de aterogénesis. Por lo tanto el colesterol elevado sería inconveniente en cuanto represente una posibilidad aumentada de generar partículas de LDL oxidadas. Normalmente, los glóbulos blancos circulan libremente en el torrente sanguíneo. Al comienzo del proceso de aterosclerosis los monolitos que son un tipo de glóbulo blanco, empiezan a pegarse sobre la superficie del vaso, hasta que llega un momento en que se inmovilizan y finalmente cruzan entre las células endoteliales que tapizan el vaso. En el espacio subendotelial los monocitos se diferencian a macrófagos. Los macrófagos captan lipoproteínas oxidadas ricas en colesterol, transformándose en células espumosas que se acumulan, iniciándose la formación de la placa o ateroma, elemento central en la lesión vascular aterosclerótica. Lo esencial en esta hipótesis es que los macrófagos captas solamente las LDL oxidadas y lo hacen porque estas células tienen receptores específicos para este tipo de partículas.

La activación de las células endoteliales vasculares por las LDL oxidadas lleva a la producción de una serie de mediadores que permiten o aumentan la adhesión y la entrada de los monolitos a la íntima del vaso sanguíneo. Entre los mediadores hay factores de transcripción como NF- κ B. Este factor es una proteína que interactúa con algunos genes en el DNA del núcleo estimulando la expresión de estos.

La activación de los factores de transcripción lleva a la expresión aumentada de una familia de proteínas relacionadas con adhesión llamadas selectinas, tales como P-selectina, E-selectina, ICAM-1, VCAM-1.

Cuando los antioxidantes de las LDL se agotan los ácidos grasos se oxidan generando fragmentos reactivos que dañan la proteína de la partícula. El daño de la proteína modifica sus cargas de superficie y la hace reconocible por los receptores de las células endoteliales vasculares y los receptores de aseo de los macrófagos. Simultáneamente se hace irreconocible por los receptores para LDL nativa o no oxidada presentes en general en todas las células con excepción de los macrófagos.

Una revisión sobre los flavonoides realizada en el Departamento de Farmacología molecular y toxicología de la Facultad de Farmacia en la Universidad del Sur de California, expresa que son compuestos fenólicos de la familia de los fitoquímicos, derivados de los vegetales y con potencial beneficio sobre la salud. La amplia gama de efectos atribuidos a los flavonoides constituye la expresión de la funcionalidad de su grupo químico, incluyendo propiedades redox, mutagénicas, anticarcinogénicas, y citotóxicas (17). Además interactúan con los mecanismos de transmisión de señales y poseen efectos benéficos sobre el sistema inmunológico. La acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres. Los flavonoides pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos, pero también son prooxidantes y con capacidad de inhibir diversas enzimas.

El autor concluye: “es evidente que los flavonoides juegan un papel más amplio que el de ser antioxidantes y, por lo tanto, se requiere un vigoroso movimiento de investigación en estos terrenos. Así mismo, es necesario adquirir información e identificar los alimentos ricos en estos componentes y que pueden resultar beneficiosos para la salud.”

Frankel de la Universidad de California Davis, midió que la peroxidación de las lipoproteínas de alta densidad (LDL) fue inhibida en un 60 y 98 % respectivamente, por la adición de 3,8 y 10 μ M/l de vino tinto. El vino diluido conteniendo 10 μ M/l de fenoles tuvo la misma actividad antioxidante que 10 μ M/l de quercetina para inhibir la oxidación de LDL. Efectuando un estudio comparativo, el alfa tocoferol evidenció solamente el 60 % de la potencia inhibitoria que el vino y la quercetina (33).

En los últimos años han ocurrido significativos avances en el conocimiento del propóleos, sin embargo aún no ha logrado la penetración y el impacto a nivel de la comunidad científica internacional y de la población en general, que si lograron otros AO naturales como el vino, las frutas y verduras. Por ejemplo la "**Paradoja Francesa**", hipótesis que intenta explicar el hecho de con iguales niveles de colesterol en sangre, los franceses mueren dos a tres veces menos que los norteamericanos por infarto de miocardio.

La hipótesis vincula el consumo de vino tinto con la menor incidencia de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, atribuido a los polifenoles presentes en la bebida (35,36). En el libro "Salud Pública y consumo moderado de vino" editado en 1999 por el Prof. Leighton de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, aparece una revisión de los estudios de intervención en humanos (37). De esta bibliografía extractamos la siguiente información que es relevante para el tema que venimos desarrollando:

- a) El aporte de un vino tinto con capacidad AO muy alta, aumenta la capacidad AO del plasma entre un mínimo de 51 % y un máximo de 117 %.
- b) Después de la ingesta de vino tinto con la comida, la capacidad AO del plasma subió rápidamente alcanzando un máximo a los 90 minutos, persistiendo más de 4 horas.
- c) El principal antioxidante del vino sería el flavonoide quercetina, el cual sería absorbido por el intestino.

También tiene fuerte repercusión el hábito del consumo de frutas y verduras.

En un estudio prospectivo de cohorte, publicado en JAMA durante 1999, realizado durante 14 años, que incluyó más de 110.000 personas, concluyó que el consumo de frutas y verduras disminuye la incidencia de accidente vascular isquémico (aterosclerosis), atribuyendo dicho beneficio a los flavonoides presentes en dichos alimentos. (38)

NORMATIVAS SOBRE PROPÓLEOS Y EXTRACTOS DE PROPÓLEOS

Normativas de Rusia

Los países de Europa Oriental y la ex Unión Soviética fueron los primeros en establecer estándares de calidad para el propóleo y sus extractos. Así es posible citar los estándares propuestos por Tikhonov y col. en 1978 y la Norma Regional Rusa RSFSR (Russian Regional Standards, 1977).

Tabla 2 .Estándares propuestos por Tikhonov y Norma Rusa RSFSR

Parameters	Tikhonov	RSFSR
Extractable substances	21.93 +/- 2.22%	
Oxidizability value	17.08 +/- 5.52%	< 22.0%
Resinous-balsam substances	46.18 +/- 1.15%	
Waxes	27.11 +/- 7.68%	< 30.0%
Polyphenols	14.66 +/- 2.34%	> 20.0%
Polysaccharides	2.26 +/- 0.32%	
Mechanical impurities	9.76 +/- 1.81%	< 20.0%
Iodine number		> 35.0

Normativa de Japón

En la década del 90, Japón se convirtió en el más importante consumidor de propóleos como suplemento dietario después del boom originado por las propiedades difundidas en la 50ª Reunión Anual de la Japanese Cancer Association (1991). A partir de este hecho, la Japanese Propolis Conference (asociación de 250 compañías que producen o venden productos con propóleos) estableció estándares para extractos etanólicos y otros productos a base de propóleos (40).

Tabla 3. Estándares establecidos por la Japanese Propolis Conference

Parámetro	Extractos	Tabletas, granulados	Cápsulas blandas
Extracto seco	Minimo: 8 % w/v	Minimo: 8 % w/v	Minimo: 8 % w/v
Quercetina	Detectable	Detectable	Detectable
Absorción en UV	275-315 nm	275-315 nm	275-315 nm
E. Coli		Negativo	Negativo
Indice de peróxido			≤ 5 meq/kg
Indice de oxidación			15 o menos

Normativa de Brasil

El Ministerio de Agricultura de Brasil, que es uno de los principales exportadores de propóleos, y proveedor del mercado japonés, estableció en 2001 un conjunto de especificaciones para el propóleos en bruto y para los extractos, que pueden verse a continuación.

Regulamentos técnicos para fixação de identidade e qualidade de própolis

1. ALCANCE:

1.1. OBJETIVO: Estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender a Própolis.

1.2. ÂMBITO DE APLICAÇÃO: O presente Regulamento refere-se à Própolis destinada ao comércio nacional ou internacional.

2. DESCRIÇÃO:

2.1. Definição: Entende-se por Própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas pelas abelhas, de brotos, flores e exudatos de plantas. As abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração final da Própolis.

2.2. Classificação – Quanto ao teor de flavonóides a Própolis será classificada em:

2.2.1. Baixo teor: até 1,0 % (m/m)

2.2.2. Médio teor: > 1,0 – 2,0 % (m/m)

2.2.3. Alto teor: > 2,0 % (m/m)

2.3. Designação (denominação de venda): Própolis

3. REFERÊNCIAS:

3.1. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington, AOAC.

3.2. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.

3.3. I.C.M.S.F.

3.4. Codex Alimentarius CAC/VOL A 1985

4. COMPOSIÇÕES E REQUISITOS:

4.1. Composição: A Própolis compõe-se de resinas e produtos balsâmicos, cera, óleos essenciais, pólen e micro elementos.

4.2. Requisitos:

4.2.1. Características Sensoriais:

- Aroma: característico (balsâmico e resinoso) dependendo da origem botânica.
- Cor: amarelada, parda, esverdeada, marrom e outras, variando conforme a origem botânica.
- Sabor: de suave balsâmico a forte e picante, dependendo da origem botânica.
- Consistência (à temperatura ambiente): maleável e rígida, dependendo da origem botânica.

4.2.2. Requisitos físico-químicos:

- Umidade: máximo de 8%.
- Cinzas: máximo de 5%.
- Ceras: máximo de 25 %.
- Massa mecânica: máximo de 40%.
- Compostos fenólicos: mínimo de 5% (m/m).
- Solúveis em etanol: mínimo de 35% (m/m).
- Flavonóides: mínimo de 0,5 % (m/m)
- Índice de oxidação: máximo de 22 segundos

5. ADITIVOS: Proíbe-se expressamente a utilização de qualquer tipo de aditivos.

6. CONTAMINANTES: Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores ao limites estabelecidos pelo Regulamento específico

7. HIGIENE

7.1. Considerações gerais

Proposta de regulamento de identidade e qualidade de extrato de própolis

1. ALCANCE

1.1 OBJETIVO: Estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender o Extrato de Propolis.

1.2. ÂMBITO DE APLICAÇÃO - O presente Regulamento refere-se ao Extrato de Própolis destinada ao comércio nacional ou internacional.

2. DESCRIÇÃO

2.1. DEFINIÇÃO - Entende-se por Extrato de Própolis o produto proveniente da extração dos componentes solúveis da Própolis em álcool neutro (grau alimentício).

2.2. DESIGNAÇÃO (Denominação de Venda) : Extrato de Própolis.

3. REFERÊNCIAS:

- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington, USA
- Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.
- I.C.M.S.F
- Codex Alimentarius CAC/VOL A 1985
- Tese de mestrado do Dr. Ricardo Woisky

4. COMPOSIÇÃO E REQUISITOS:

4.1 COMPOSIÇÃO: O extrato de própolis compõe-se basicamente de própolis, álcool e água.

4.2. CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS

4.2.1. Aroma: característico (balsâmico e resinoso) dependendo da origem botânica.

4.2.2. Cor: variada, dependendo da origem e da concentração.

4.2.3. Sabor: de suave a forte, amargo e picante.

4.3. REQUISITOS FÍSICO-QUÍMICOS:

4.3.1. Extrato seco : Mínimo de 11% (m/v)

4.3.2. Cera : máximo 2% do extrato seco (m/m)

4.3.3. Compostos flavonóides : Mínimo 0,25%(m/m)

4.3.4. Compostos fenólicos (expresso em ácido gálico) : Mínimo 0,25% (m/m)

4.3.5. Propriedades anti-oxidantes : max 22 seg.

4.4. PROVAS QUALITATIVAS

4.4.1. Espectro de Absorção de Radiações Ultravioleta e Visível - O extrato de própolis deverá apresentar 2 bandas características das principais classes de compostos fenólicos entre 200 e 400 nm.

4.4.2. Acetato de chumbo - Positivo

4.4.3. Hidróxido de Sódio - Positivo

4.4.4. Reação de magnésio em presença de ácido clorídrico: Positivo

4.4.5. Formação de emulsão em água: Positivo

4.5. ACONDICIONAMENTO: Deverá ser embalado em material bromatologicamente apto e que confira ao produto uma proteção adequada.

5. CONTAMINANTES: Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo Regulamento específico.

5.1. Metanol : máximo 0,40 mg/l.

5.2. Sulfas, Tetraciclina, Oxitetraciclina e Clortetraciclina: Ausentes.

6. HIGIENE

6.1. Considerações Gerais: As práticas de higiene para elaboração do produto devem estar de acordo com o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico - sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos.

6.2. Critérios Macroscópicos e Microscópicos: O produto não deverá conter substâncias estranhas, de qualquer natureza.

7. PESOS E MEDIDAS: Aplica-se o Regulamento Específico

8. ROTULAGEM: A rotulagem deverá atender à legislação específica e incluir a frase : "extrato seco - mínimo ___%" garantido, em percentuais de massa/volume.

9. MÉTODOS DE ANÁLISE: Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Qualidade.

Normativas de Argentina

En Argentina, la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) propuso incorporar el propóleo al Código Alimentario Argentino como suplemento dietario, a través de un nuevo artículo del Código (marzo de 2004), pero aún la resolución no fue aprobada por el Ministerio de Salud. Las especificaciones propuestas por la CONAL para ser introducidas en el Código Alimentario Argentino, fueron las siguientes:

Esquema 1 de Norma IRAM-INTA 15935-1: “Propóleo en bruto”

Requisitos sensoriales: la determinación de cada requisito se debe realizar mediante los sentidos.

- Aroma: característico, balsámico o resinoso, dependiendo de su origen botánico y/o geográfico.
- Sabor: variable; de suave, balsámico a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico y/o geográfico.
- Color: amarillo, pardo, verdoso, marrón, rojizo y otros similares, variando conforme su origen botánico y/o geográfico.
- Consistencia (a 20°C): maleable o rígido, dependiendo de su origen botánico y/o geográfico.
- Aspecto: heterogéneo, preferentemente en trozos sueltos, sin comprimir.

Requisitos físico-químicos: el propóleo en bruto debe cumplir los requisitos siguientes.

Tabla 4 - Requisitos físicos y químicos

Requisito	Unidad	Mínimo	Máximo	Método de ensayo
Pérdida por calentamiento (humedad)		-	10,0	(ver Capítulo IV. Metodología analítica)
Cenizas		-	5,0	
Sustancias extraíbles (ceras)	g/100 g	-	35,0	
Resinas solubles en etanol		35,0	-	
Impurezas mecánicas		-	25,0	
Compuestos fenólicos		5,0	-	
Flavonoides		1,0	-	
Índice de oxidación	S	-	22	
Espectrograma UV	-	Debe presentar un pico de absorción entre 270 nm y 315 nm		

Aditivos. No se debe agregar al propóleo ningún tipo de aditivos.

Contaminantes. Se consideran contaminantes las sustancias y elementos siguientes. Se indican en la tabla 5 los requisitos que se deben cumplir.

Tabla 5 – Contaminantes

Requisito	Unidad	Máximo	Método de ensayo
Plomo, expresado como Pb	mg/kg	2,0	(ver Capítulo IV.
Arsénico, expresado como As		1,0	Metodología analítica)

Residuos de plaguicidas. Se debe cumplir con la legislación vigente referida a la presencia de residuos de plaguicidas.

Residuos de medicamentos veterinarios: se debe cumplir con la legislación vigente referida a la presencia de residuos de medicamentos.

Esquema 1 de Norma IRAM-INTA 15935-2: “Extractos de propóleos”

Requisitos sensoriales: La determinación de cada requisito se debe realizar mediante los sentidos.

- Aroma. Característico de este producto: resinoso o balsámico, según su origen botánico.
- Color. Variable, según su origen botánico y su concentración.
- Sabor. Variable, de suave a fuerte, amargo y picante.

Requisitos físico-químicos: el extracto de propóleos debe cumplir los requisitos siguientes.

Tabla 6 - Requisitos físicos y químicos

Requisito	Unidad	Mínimo	Máximo	Método de ensayo
Extracto seco (materia seca)		10,0	-	Ver Capítulo IV
Sustancias extraíbles (ceras)	g/100 g	-	2,0	
Compuestos fenólicos		0,25	-	
Flavonoides		0,25	-	
Índice de oxidación	S	-	22	
Espectrograma UV	-	Debe presentar un pico de absorción entre 270 nm y 315 nm		

Aditivos. No se debe agregar al extracto de propóleos ningún tipo de aditivos.

Contaminantes. Se consideran contaminantes las sustancias y elementos siguientes. Se indican en la tabla 7 los requisitos que se deben cumplir.

Tabla 7 – Contaminantes

Requisito	Unidad	Máximo	Método de ensayo
Plomo, expresado como Pb	mg/kg	0.2	(ver Capítulo IV.
Arsénico, expresado como As		0.1	Metodología analítica)

Residuos de plaguicidas. Se debe cumplir con la legislación vigente referida a la presencia de residuos de plaguicidas.

Residuos de medicamentos veterinarios. Se debe cumplir con la legislación vigente referida a la presencia de residuos de medicamentos veterinarios.

Referencias

1. Martínez, A. Apuntes de Química Farmacéutica. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Colombia.
2. Lee, H.S. Food Analysis by HPLC. Edited by L.M.L. Nollet. Chapter 19. HPLC Analysis of Phenolic Compounds. Second Edition. (2000). ISBN 0-8247-8460-X. U.S.A.
3. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002 Nov-Dec;96(2-3):67-202 .
4. Merken, H.M.; Beecher, G.R. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. March 2000. Volume 48, Number 3.
5. Tapiero, H.; Tew, K.D.; Nguyen Ba, G.; Mathe, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomed Pharmacother* 2002; 56 200-7. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS.
6. Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. The systematic identification of flavonoides. 1970. Springer Verlag; New York, USA, 354 pp.
7. Rice-Evans C., Miller N., Paganga J. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant. Science* 1997;2:152-159.
8. Havsteen B.H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids *Pharmacology & Therapeutics* 96 (2002) 67-202.

9. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoides and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993;342:1007-1011.
10. Knekt P, Jarinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996;312:478-481.
11. Heitzer T, Hanjorg J, Munzel T and col. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996;94:6-9.
12. Gugliucci, A. Effects of water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* on human low density lipoprotein oxidation. International Scientific Conference on Complementary, Alternative and Integrative Medical Research, Harvard Medical School and UCSF, San Francisco, May 2001.
13. Erma A, Jonson J, Gould M, Tanner M. Inhibition of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene and N-nitrosomethylurea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetina. *Cancer Res*. 1988;48:5754-5788.
14. de Whalley, C, Rankin S, Houlst J. and col. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Parharmacol* 1990;39:1743-1750.
15. Negre-Salvagyre A, Salvagyre R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized low-density lipoproteins by macrophages. *Free Radic Biol. Med*. 1992; 12:101-106.
16. Nakayama et al. Supresión of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochem Pharmacol*. 1993; 45:265-267. (Introduction to flavonoids)
17. Cadenas E. Sustancias flavonoides. Antioxidantes y calidad de vida 1998;5:6-11.
18. World Health Organisation. The WHO MONICA project: a worldwide monitoring system for cardiovascular diseases. World health statistics annual 1989. Geneva: WHO 1990.
19. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, and col. Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med*. 1995; 155:381-386.
20. Hertog M, Hollman P, Katan M. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Neterlands. *J Agric Food Che*. 1992; 40:2379-2383.

21. Geleijnse J, Launer L, Hofman A, Huibert A, Wttermann J. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999; 159:2170-2174.
22. Salonen J, Nyyssönen K, Salonen R, Lakka H, Kakkonen J, Porkkala-Sarataho E and col. Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J. of Internal Medicine* 2000; 248:377-386.
23. Endemann D, Schiffrin E. Nitric oxide, oxidative excess, and vascular complications of diabetes mellitus. *Curr Hypertens Rep* 2004; 6:685-9.
24. Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers for endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2004; 291:1978-86.
25. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1997; 336:1117-24.
26. Leikert J, Räthel T, Wohlfart P, Cheynier V, and col. Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells. *Circulation*. 2002; 106:1614-1617.
27. Paulino N. Mecanismo Farmacológico de ação da própolis no organismo. In: *Anales XIII Congresso Brasileiro de Apicultura, Florianópolis-SC*. 2000.
28. Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. Sies H. editor. New York, Academic Press 1991.
29. Steinberg D. and Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis-current concepts. *JAMA*. 1990; 264:3047-3052.
30. Riemersma R, Wood D, Macintyre C, Elton R, Gey K, Oliver M. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C and E and carotene. *Lancet* 1991; 337:1-5.
31. Stephens N, Parsons A, Schofield P, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson M, Brown M. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347:781-786.
32. Ames B, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90:7915-7922.

33. Frankel E, Kanner J, Berman J, Parks E, Kinsella J. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341:454-457.
34. Conner E, Grisham M. Inflammation, free radical, and antioxidants. *Nutrition*. 1996; 12:274-7.
35. Leighton F, Urquiaga I. Polifenoles del vino y salud humana. *Antioxidantes y calidad de vida*. 2000; 7:5-13.
36. Renaud S, Ruf JC. The French paradox: vegetables or wine. *Circulation* 1994;90:3118-3119.
37. Leighton F, Urquiaga I. Bases bioquímicas de los efectos beneficiosos del consumo moderado de vino. In: Leighton F, Urquiaga I, editors. *Salud pública y consumo moderado de vino*. 1ª ed. Santiago de Chile: Pontificia Univ. Católica de Chile Press; 1999. p. 71-85.
38. Kaumudi J, Asherio A, Manson J, Stampfer M, Rimm E, and col. Fruits and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA* 1999; 282:1233-1239.
39. JETRO (Japan External Trade Organization). 1991. <http://www.jetro.go.jp/australia/sydney/info/publi/03foodguide/propolis.pdf>

Símbolos, unidades, abreviaturas y acrónimos

% p/p	Porcentaje en peso (x gramos de sustancia por cada 100 gramos de producto)
δ	Desviación estándar
$\mu\text{g/ml}$	microgramos por mililitro
$\mu\text{M/ml}$	micromoles por mililitro
ADN	Acido desoxirribonucleico
AER	Agencia de Extensión Rural (INTA)
AHA	American Heart Association
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ANPCyT	Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (http://www.agencia.secyt.gov.ar)
AO	Antioxidante
Artepillin C	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinámico. Idem: ácido 3-[4-hidroxi-3,5-bis(3-metil-2-butenil)fenil]-2-propenoico
ATB	antibiótico
CAPE	Caffeic acid phenethyl ester. Ester del ácido cafeico
CD4, CD8	Cluster de diferenciación. Relacionados al sistema inmune.
cm	centímetro
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Radical libre empleado para determinar capacidad de un compuesto para atrapar radicales libres (scavenging) bajo condiciones controladas
e.e.	error estándar
E.E.A.	Estación Experimental Agropecuaria (INTA)
EAE	encefalomielitis autoimmune
EAP	Escuela Agrícola Panamericana (http://www.zamorano.edu)
EBP	Extracto blando de propóleos
EE.UU.	Estados Unidos de Norteamérica
EEP	Extracto etanólico de propóleos
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FDA	Food and Drug Administration
g	gramo
GC	Cromatografía en fase gaseosa

GC-MS	Cromatografía en fase gaseosa acoplada a detector de masa
GFAAS	Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito
h	hora
HL-60	Células humanas de leucemia
HLC-2	Células de Carcinoma de pulmón humano
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HSV1	Virus del herpes simple Tipo 1
HSV2	Virus del herpes simple Tipo 2
HT-HRGC-MS	Cromatografía gaseosa de alta temperatura y alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas.
IC50	concentración inhibitoria 50.
ICP-MS	Método de espectrometría de plasma acoplado inductivamente con espectrometría de masa
ICUMSA	International Commission For Uniform Methods.
Id.	Identificación - N° de la muestra
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (http://www.inta.gov.ar)
IRAM	Instituto Argentino de Normalización y Certificación (http://www.iram.com.ar)
kg	kilogramo
km	kilómetro
LD50	Dosis letal 50. Dosis de una sustancia que tiene efecto letal sobre el 50% de la población ensayada.
LDL	Low density lipoprotein. Lipoproteínas de bajo peso molecular
m.s.n.m.	Altura sobre el nivel del mar (en metros)
meq	miliequivalentes
mg	miligramos
MIC	Concentración inhibitoria mínima
min	minuto
mm	milímetro
N	Normal (unidad de concentración de soluciones)
NCCCAM	Centro Nacional para la Medicina Complementaria y Alternativa
NEA	Noreste Argentino

NF-kB	Factor de transcripción
NIH	Servicio Nacional de Salud
nm	nanómetro (10^{-9} m)
NO	Oxido nítrico
NOA	Noroeste Argentino
O ₂	Oxígeno molecular
C	Grado centígrado o Celsius.
OMS	Organización Mundial de la Salud (http://www.who.int)
p.a.	Calidad de reactivo: "para análisis"
Pb	Plomo
PROAPI	Proyecto Integrado de Desarrollo Apícola (http://www.apnetla.com.ar)
RL	Radical Libre
SAMR	Estafilococcus aureus meticilino multiresistente
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TLC	Cromatografía en capa fina. Idem: Cromatografía en capa delgada
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
UEyEA	Unidad de Extensión y Experimentación Adaptativa (INTA)
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

PROPOLEOS

Caracterización y normalización de propóleos argentinos
Revisión y actualización de composición y propiedades

Enrique Bedascarrasbure

Luis Maldonado

Walter Fierro Morales

Alejandro Alvarez



ISBN 987-9390-70-9



Colección NORTE GRANDE