

**Caracterización físico-química del propóleo
de la Escuela Agrícola Panamericana y su
efecto antioxidante en aceite de soya**

Aura Maylin Yoong Kuffó

Honduras
Diciembre, 2004

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya

Proyecto especial presentado como requisito parcial
para optar al título de Ingeniera Agroindustrial
en el Grado académico de Licenciatura

Presentado por

Aura Maylin Yoong Kuffó

Honduras
Diciembre, 2004

La autora concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor

Aura Maylin Yoong Kuffó

Honduras
Diciembre, 2004

**Caracterización físico-química del propóleo de la
Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante
en aceite de soya**

Presentado por

Aura Maylin Yoong Kuffó

Aprobada

Francisco J. Bueso, Ph. D.
Asesor Principal

Raúl Espinal, Ph. D.
Coordinador de la Carrera de
Agroindustria

Bertha Ruiz, M.Sc.
Asesor

Aurelio Revilla, M.S.A.
Decano Académico Interino

Kenneth Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios, gran líder y luz de mi vida.

A mis padres, hermanos y familiares, por su apoyo y confianza incondicional.

A mis sobrinos y nuevos miembros de mi familia, porque son alegría e inspiración para trabajar y mejorar continuamente, a ustedes nenes.

A mis maestros, quienes trabajaron conmigo a lo largo de mi formación educativa.

A los miembros del INTA-PROAPI (Tucumán), gente emprendedora y llena de buenas ideas.

A Zamorano, institución que aprecio y valoro por enriquecer mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por las bendiciones que recibo de él, por enseñarme a luchar, disfrutar y aprender en todo momento.

A mis padres, Washington Yoong y Dolores Kuffó, por su ejemplo, dedicación y la mejor herencia que pueden ofrecerme: su amor y educación.

A mis hermanos: Roggina, Lola, y Washington, por su apoyo, enseñanzas y protección.

A mis asesoras, Lic. Gladys Fukuda e Ing. Bertha Ruiz, con quienes inicié este proyecto, por su apoyo, amistad y calidad tanto humana como profesional.

A los ingenieros: Luis Maldonado, Enrique Bedascarrasbure, Alejandro Álvarez y Carlos Torné; por su apoyo, confianza y oportunidades brindadas. Por enseñarme que el trabajo es dedicación y el éxito debe ser integral.

Al Dr. Javier Bueso, asesor principal, por su colaboración a lo largo del proyecto, por fortalecer mis conocimientos y metodología de trabajo.

A amigos, especialmente a Yajaira Vergara, Ariana Torres, Maria Herrarte, Santa María Mendoza, Abel Zapet, Patrick Vilus, Armando Talavera, Juan Ochoa, Adriana Soto, Cecilia González, Joe Jarrín, Ing. Dina Fernández y José Araya, por brindarme su apoyo y amistad sincera.

A Paúl Mantilla, por acompañarme durante cuatro años aún sin estar presente.

RESUMEN

Yoong, A. 2004. Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya. Proyecto Especial de Programa de Ingeniero en Agroindustria, Zamorano, Honduras. 50p.

El propóleo es elaborado por abejas melíferas y posee propiedades benéficas para la salud humana. Se estudió la calidad de 12 muestras de propóleo cosechado por medio de mallas provenientes del Apiario Local (AL), Monte Redondo (MR) y Pantanal (P), evaluando características físico-químicas como: humedad, cenizas, ceras, resinas, impurezas mecánicas, fenoles totales, flavonoides totales, índice de oxidación, espectrograma UV y contenido de plomo. Hubo tal variación entre composiciones, que no todos los propóleos cumplieron totalmente la Norma IRAM-INTA 15935-1 argentina. El AL presentó mayor contenido de fenoles que P y MR respectivamente. El 83.3% de muestras absorbió luz UV-visible con un pico máximo entre 270-315 nm, donde se presentan flavonoides (no caracterizados). Se detectó plomo en dos muestras (0.3 ppm), aunque bajo límites permitidos (10 ppm). Se evaluó el efecto antioxidante del extracto etanólico de propóleo (EEP) al 15% en aceite de soya sin preservantes, mediante la adición de 0%, 0.5%, 1% y 1.5% de EEP (midiendo valor de TBA e índice de peróxido). No hubo un efecto favorable. El 1.5% alcanzó un IP máximo inferior a los otros tratamientos, aunque sobrepasó los 10 meq/kg de peróxidos permitidos en menos de una semana. A mayor porcentaje de EEP, menor valor de TBA. Sólo el control y 0.5% EEP sobrepasaron el límite (0.2) en la segunda semana. El propóleo varió su calidad según la vegetación circundante, teniendo que ser estandarizado por el contenido de resinas para ajustar compuestos fenólicos y aprovechar su actividad biológica.

Palabras clave: compuestos fenólicos, flavonoides totales, espectros UV, valor de TBA, índice de peróxido.

CONTENIDO

Portadilla.....		i
Autoría.....		ii
Página de firmas.....		iii
Dedicatoria.....		iv
Agradecimientos.....		v
Resumen.....		vi
Contenido.....		vii
Índice de Cuadros.....		ix
Índice de Figuras.....		x
Índice de Anexos.....		xi
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	OBJETIVOS.....	2
1.1.1	General.....	2
1.1.2	Específicos.....	2
2.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	DEFINICIÓN DEL PROPÓLEO	3
2.2	COMPOSICIÓN DEL PROPÓLEO	3
2.3	VEGETACIÓN PREDOMINANTE	4
2.4	CLIMA.....	5
2.5	PROPIEDADES DEL PROPÓLEO.....	6
2.5.1	USOS DEL PROPÓLEO	7
2.6	COMPUESTOS FENÓLICOS	7
2.6.1	FLAVONOIDES	8
2.7	EFFECTO ANTIOXIDANTE DEL PROPÓLEO EN ACEITE DE SOYA.....	9
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1	UBICACIÓN	10
3.2	MATERIALES.....	10
3.3	COSECHA DE PROPÓLEO.....	10
3.4	MANEJO DE MUESTRAS	11
3.4.1	Extracción del propóleo.....	11
3.5	ACEITE DE SOYA	11
3.6	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	12

3.7	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL PROPÓLEO DE LA E.A.P.....	12
3.7.1	Determinación de humedad.....	12
3.7.2	Determinación de cenizas.....	13
3.7.3	Determinación de ceras totales.....	14
3.7.4	Determinación de resinas totales.....	15
3.7.5	Impurezas mecánicas.....	15
3.7.6	Índice de oxidación.....	16
3.7.7	Compuestos fenólicos totales.....	17
3.7.8	Flavonoides totales.....	17
3.7.9	Espectroscopía de absorción UV.....	18
3.7.10	Cuantificación de plomo.....	18
3.8	CORRELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES E ÍNDICE DE OXIDACIÓN.....	19
3.9	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL PROPÓLEO EN ACEITE DE SOYA.....	19
3.9.1	Preparación de tratamientos.....	19
3.9.2	Índice de peróxido.....	20
3.9.3	Valor de TBA.....	20
3.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA.....	22
4.1	Detección y cuantificación de plomo.....	27
4.2	CORRELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE OXIDACIÓN Y CONTENIDO DE FENOLES TOTALES.....	27
4.3	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO SOBRE LA OXIDACIÓN DEL ACEITE DE SOYA.....	29
5.	CONCLUSIONES	31
6.	RECOMENDACIONES	32
7.	BIBLIOGRAFÍA	33
8.	ANEXOS	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Composición del propóleo.....	4
2.	Vegetación predominante en el Apiario: Local (AL), Monte Redondo (MR) y Pantanal (P).....	5
3.	Perfil de ácidos grasos del aceite de soya.....	12
4.	Caracterización físico-química del propóleo.....	22
5.	Absorbancia máxima del espectro de luz UV a 290 nm en AL, MR y P.....	25
6.	Cuantificación de plomo en el propóleo del AL, MR y P.....	27
7.	Correlación entre contenido de fenoles totales e índice de oxidación.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Espectrograma UV visible de muestra en el Apiario Local.....	26
2.	Espectrograma UV visible de muestra en Monte Redondo.....	26
3.	Espectrograma UV visible de muestra en Pantanal.....	26
4.	Efecto cuatro niveles de EEP sobre el índice de peróxido del aceite de soya sin preservantes medido durante cuatro semanas.....	29
5.	Efecto de cuatro niveles de EEP sobre el valor de TBA del aceite de soya sin preservantes medido durante cuatro semanas.....	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Análisis de varianza y separación de medias del contenido de humedad.....	37
2.	Análisis de varianza y separación de medias del contenido de resinas totales.....	38
3.	Análisis de varianza y separación de medias del contenido de ceras.....	39
4.	Análisis de varianza y separación de medias del contenido de impurezas mecánicas.....	40
5.	Análisis de varianza y separación de medias del contenido de cenizas	41
6.	Análisis de varianza y separación de medias del índice de oxidación.....	42
7.	Análisis de varianza y separación de medias del contenido de fenoles totales.....	43
8.	Análisis de varianza y separación de medias del contenido de flavonoides.....	44
9.	Espectrograma de absorción UV visible del propóleo en el Apiario Local (a).....	45
10.	Espectrograma de absorción UV visible del propóleo en el Apiario Local (b).....	46
11.	Espectrograma de absorción UV visible del propóleo en Monte Redondo (a).....	47
12.	Espectrograma de absorción UV visible del propóleo en Monte Redondo (b).....	48
13.	Espectrograma de absorción UV visible del propóleo en Pantanal (a).....	49
14.	Espectrograma de absorción UV visible del propóleo en Pantanal (b).....	50

1. INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto procesado por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) que es empleado como mecanismo de defensa dentro de la colmena. Las “resinas, gomas y bálsamos son colectados a partir de la vegetación” circundante a las colmenas y procesados por las abejas para ser explotados por el hombre para su aprovechamiento debido a las valiosas cualidades que posee (Bedascarrasbure, 2000a).

Su denominación se origina del griego pro (en defensa) y polis (ciudad), pues resguarda la colmena, donde su principal función es “desinfectar y proteger a las abejas de enfermedades (bacterias, virus), reducir vías de acceso a enemigos naturales y favorecer el mantenimiento de la temperatura interna de la colmena” (Yanucci, 2002).

Consecuentemente, el interés de analizar físico-químicamente el propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana radica en conocer su composición y posibles efectos antioxidantes sobre la base del contenido total de los compuestos fenólicos; de modo que se pueda conocer la calidad y valor potencial como alimento (suplemento nutracéutico).

Con base en investigaciones realizadas en España, se realizó un ensayo comparativo para determinar el efecto antioxidante del propóleo con mayor contenido de compuestos fenólicos en aceite de soya sin preservantes.

Mediante el presente estudio se pueden establecer recomendaciones sobre prácticas apícolas para mejorar la producción de propóleo procedente de la Escuela Agrícola Panamericana y por consiguiente optimizar la calidad de sus subproductos como la miel propolizada que se ofrece en la unidad de comercialización de Zamorano y en determinados supermercados en Tegucigalpa.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 General

- Caracterizar físico-químicamente el propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y evaluar su efecto antioxidante en aceite de soya.

1.1.2 Específicos

- Analizar físico-químicamente el propóleo del Apiario local (AL), Monte Redondo (MR) y Pantanal (P) de la Escuela Agrícola Panamericana.
- Determinar la correlación entre el contenido de fenoles totales e índice de oxidación del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana.
- Evaluar el efecto antioxidante del propóleo con mayor contenido de compuestos fenólicos en aceite de soya.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 DEFINICIÓN DEL PROPÓLEO

Bedascarrasbure (2000a), define al propóleo como una sustancia resinosa, gomosa y balsámica colectada por las abejas melíferas a partir de brotes de corteza, hojas y otras partes de arbustos silvestres, árboles. La recolección del propóleo es actividad de las pecoreadoras, que extraen con sus mandíbulas sustancias de las yemas, y con ayuda del primer par de patas, la secreción de glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxidecenoico) permite el ablandamiento para tritarlo y transportarlo a las cestillas. Una vez que ingresan a la colmena, se dirigen a sitios donde se requiere de este producto y permanecen quietas mientras las abejas propolizadoras toman partículas de la sustancia para comprimirlas y agregarles cera procediendo al propolizado.

2.2 COMPOSICIÓN DEL PROPÓLEO

Según Krell (1996), los componentes del propóleo (Cuadro 1), se fraccionan en: resinas, gomas y bálsamos (compuestos fenólicos -flavonoides, ácidos fenólicos- y ésteres), de cera de abeja (ácidos grasos de cadena larga), aceites esenciales o volátiles provenientes del bálsamo, polen (proteínas -16 amino ácidos libres >1%- arginina y prolina generalmente son el 46% del total); y de materiales diversos o impurezas mecánicas.

Entre los compuestos localizados en la fracción resinosa se encuentran moléculas orgánicas como ácidos orgánicos (ácido benzoico y gálico) y ácidos-fenoles (ácido caféico, cinámico, fenílico, insofenílico y p-cumanílico). Además se han encontrado aldehídos aromáticos (vainilina, isovainilina); y cumarinas (esculetol y escopoletol).

De acuerdo con Peña (2001), los flavonoides más comunes son las flavonas como acetina, crisina amarilla, pectolinarigenina, tectocrisina; flavonoles como la galangina, izalquinina, kaempférido, quercetina, ramnocitrina y las flavononas: pinostrobin, sakuranetina y flavonoles como la pinobanksina.

En menor proporción, se encuentran vitaminas como la provitamina A, vitamina B3 y otras del grupo B.

Cuadro 1. Composición del propóleo.

Componente	%	Contenido
Resinas y bálsamos	50-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y esteres
Cera de abeja	30-40	Ácidos grasos de cadena larga
Aceites esenciales	5-10	Aceites volátiles
Polen	5	Proteínas
Materiales diversos y compuestos orgánicos	5	14 trazas de minerales, Fe y Zn (más comunes), cetonas, lactonas, quinonas, esteroides, ácido benzoico, vitaminas, azúcares

Fuente: Krell, 1996.

La composición del propóleo es bastante compleja y difícil de caracterizar o comparar mediante una norma generalizada debido a su alta variación (por cambios en vegetación, clima, manejo, ubicación). Por esto existen rangos generales que sirven para conocer la composición y las fuentes de origen de cada componente, así como sus usos (Bedascarrasbure *et al.*, 2000b).

De acuerdo con Bedascarrasbure *et al.*, 2000a, es en la fracción resinosa donde se encuentran compuestos biológicamente activos, por lo tanto un mayor fragmento de ésta puede indicar mejor calidad por las posibles propiedades y usos potenciales en la industria.

El propóleo en definitiva debe estar “libre de contaminantes tóxicos (metales pesados); contener bajos niveles de cera, impurezas mecánicas y cenizas”. Asimismo es recomendado determinar la fuente vegetal circundante de la colmena para conocer los componentes activos presentes en sus resinas y de igual forma, estimar la proporción de éstos compuestos activos en el propóleo (Bankova, 2000).

2.3 VEGETACIÓN PREDOMINANTE

La calidad del propóleo se debe mayoritariamente a la vegetación. Por esto siempre es favorable una localización estratégica del apiario, con base en una flora predominante (para producción de miel y polen) y vegetación resinosa para encontrar resinas, bálsamos (solubles en solventes orgánicos) y/o gomas (hidrosolubles) que tengan una calidad reconocida, como es el caso del “bálsamo, álamo, pino, sauce, castaños, abetos, sauces, plantas herbáceas y otras especies vegetales (Asís, 2003).

Los apiarios de Zamorano están rodeados de la vegetación y en menor cantidad cerca de plantaciones de frutales, pastos, y cultivos extensivos (granos, frijol, entre otros). Sin

embargo el riesgo de contaminación por agroquímicos es mínimo dado que no es una fuente de resinas para las abejas melíferas. En el Cuadro 2 se detallan las fuentes de resinas próximas a cada apiario, lo cual puede facilitar la caracterización de compuestos de interés biológico si se emplean las resinas y bálsamos de estos árboles para compararlo con el propóleo de las colmenas de cada localidad.

Entre las especies predominantes, sobresalen el eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*), que posee numerosos usos en la fitoterapia debido a sus resinas y bálsamos, los cuales contienen “taninos (detoxificantes), pigmentos flavónicos (heterósidos del quercetol), un heterósido fenólico complejo, así como también caliptósidos, ácidos fenólicos (gálico, caféico) y un principio amargo”. Como es de esperarse, estas resinas y bálsamos del eucalipto guardan propiedades semejantes a las que se le atribuyen al propóleo, aunque con su variaciones ya que el proceso realizado por las abejas mejora la calidad de la resina original (paginamédica.com, 2004).

Cuadro 2. Vegetación predominante en el Apiario: Local (AL), Monte Redondo (MR) y Pantanal (P)¹.

Localidad	Nombre Científico	Nombre Común
AL	<i>Eucalyptus globulus Labill</i>	Eucalipto
	<i>Guarea sp.</i>	Carbón
	<i>Pinus patula</i>	Ocote
	<i>Araucaria araucana</i>	Araucaria
MR	<i>Guarea sp.</i>	Carbón
	<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Guanacaste
	<i>Guaiacum officinale</i>	Guayacán
	<i>Acacia Xanthophloea</i>	Acacia amarilla
	<i>Eucalyptus globulus Labill</i>	Eucalipto
P	<i>Acacia Xanthophloea</i>	Acacia
	<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Guanacaste
	<i>Bursera cuneata</i>	Bursera
	<i>Aspidosperma dugandii</i>	Carreto
	<i>Guarea sp.</i>	Carbón
	<i>Teutona grandis</i>	Teca
	<i>Eucalyptus globulus Labill</i>	Eucalipto

Fuente: Linares, (2003).

¹ Linares, J. 2003. Vegetación predominante del Apiario Local, Monte Redondo y Pantanal. Zamorano, E.A.P. (Comun. Pers.).

2.4 CLIMA

La Escuela Agrícola Panamericana se encuentra a 800 m.s.n.m., posee dos estaciones marcadas: el invierno (mayo-noviembre), es la época donde se concentran las precipitaciones y el verano (diciembre-abril), cuando las lluvias son prácticamente nulas.

Generalmente las temperaturas no son extremas y en la estación meteorológica se ha registrado que el promedio anual es de 24°C, mientras que las precipitaciones anuales tienen un promedio de 1000 mm.

2.5 PROPIEDADES DEL PROPÓLEO

El extracto etanólico de propóleo ha sido sometido a estudios químicos y biológicos en los últimos 50 años.

En un estudio sobre los métodos analíticos para el control de calidad del propóleo, Pieta (2002) citó propiedades del propóleo como “anticarcinogénico (Matsuno, 1995); antiinflamatorio (Wang et al., 1993); antibiótico (Grange y Davey, 1990; Park et al., 1998; Nieva et al., 1999; Koo et al., 2000); antioxidante (Scheller et al., 1990; Yamauchi et al., 1992; Pascual et al., 1994; Basnet et al., 1997; Nieva et al., 2000), antiviral (Manolova, et al., 1985; Ghisalberti, 1979; Amoros et al., 1992; Marucci, 1995; Kujumgiev et al., 1999), antifungal (Kujumgiev et al., 1999), anestésica y citostática (Ghisalberti, 1979)”.

De acuerdo con investigaciones del propóleo como antioxidante, se afirma que esta propiedad está fuertemente relacionada con su contenido de compuestos fenólicos, los cuales dependen de su origen botánico y por tanto se afirma que el propóleo constituye una “nueva fuente de antioxidantes naturales” (Özcan, 2000).

Özcan (2000), afirma que la “actividad antioxidante de propóleo aumenta con su concentración”. Esto se comprobó mediante ensayos con extractos metanólicos de propóleo (EMP) en aceite de oliva almacenado a 60°C a partir de muestras recolectadas en España, donde las concentraciones fluctuaban entre 0.02% a 0.08%, siendo las concentraciones de “0,06% y 0,08% de EMP, las que mostraron mayor actividad antioxidante comparando con antioxidantes comerciales” como el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT) a concentraciones del 0,01%. La diferencia en efectividad es notable debido a que depende de la concentración de compuestos fenólicos que contenga el propóleo y a que tanto el BHA como BHT son antioxidantes artificiales y comercialmente empleados en la industria de grasas.

Organismos de regulación como el Codex Alimentarius (1990), han publicado ciertas normas o parámetros para aditivos (preservantes y antioxidantes) en aceites. En el caso del propóleo, como antioxidante natural no presenta regulaciones sobre cantidad máxima de adición en alimentos, mientras que los antioxidantes artificiales por reglamentación deben encontrarse hasta en un 0.02% (en total).

En el propóleo, la capacidad antioxidante se ha relacionado con la prevención de enfermedades de gran trascendencia como aterosclerosis, reuma e incluso el cáncer. Otros antioxidantes naturales, como la vitamina E (alfa tocoferol), impiden la oxidación lipídica (del colesterol de baja densidad) reduciendo así el riesgo de enfermedades cardiovasculares y neutralizando los radicales libres, que son los responsables del envejecimiento celular, lo cual le permite adquirir insospechables perspectivas de desarrollo del propóleo para el consumo humano (Bedascarrabure, 2000a).

2.5.1 Usos del propóleo

El propóleo es muy valorado y empleado en países como Japón (donde utilizan el ácido benzoico presente en el propóleo brasilero) a manera de “preservante en bebidas gaseosas pescados y mariscos”. Asimismo, en Cuba es empleado en medicina veterinaria y apiterapia; mientras que en países de Europa occidental y Asia se utiliza principalmente para elaborar productos medicinales, nutracéuticos, alimenticios y cosméticos (Yanucci, 2002).

De acuerdo con Sloan (2004), en la revista “Food Technology”, menciona que el consumo de productos naturales es de gran importancia dadas las recientes tendencias por consumir alimentos nutracéuticos y funcionales. La industria del propóleo puede ser muy rentable y entra en esta denominación de productos naturales y/o nutracéuticos; por esto también existen países donde se ha intensificado la investigación y el desarrollo de productos que conlleven beneficios al consumidor; principalmente sobre la base de fines medicinales, suplementos dietarios y cosméticos.

La industria alimentaria lo comercializa como suplemento dietario y se han desarrollado productos como miel propolizada, gomas de mascar, bebidas nutracéuticas, extracto blando y otros. En el área de cosmética es muy empleado en la fabricación de cremas, jabones, talcos, shampoos, enjuagues bucales, tinturas, lociones, entre otros. La industria farmacéutica también toma ventaja del propóleo para elaborar pasta dental, gotas oculares, tabletas con hierbas, ungüentos,

Las oportunidades de emplear el propóleo son extensas y continúan siendo estudiadas, pues es de gran importancia agregarle valor sin alterar sus propiedades durante los procesos que pueda sufrir.

2.6 COMPUESTOS FENÓLICOS

La amplitud de compuestos fenólicos en la naturaleza da como resultado propóleo con características físico-químicas y propiedades variables. Son elementos de interés biológico que se valoran en el propóleo, donde la mayoría de las propiedades son atribuidas a los flavonoides y ácidos fenólicos.

Los ácidos fenólicos y flavonoides son capaces de absorber radiación electromagnética del espectro uv-visible en un rango de 250 a 450 nm, lo cual representa una protección natural para el material vegetal contra la radiación solar. Sobre la base de esto, se justifica el efecto protector sobre la piel de productos a base de propóleo.

Estudios realizados por Amoros (1992) y Serkedjieva (1992), que son citados por Bankova (2000) afirman que los ésteres de ácidos fenólicos como el caféico, ferúlico (3-metilbut-2-enil cafeato, 3-metilbutil ferulato, respectivamente) y ciertos flavonoides a manera de agliconas (luteolina, pinocembrina) presentan importantes actividades biológicas.

2.6.1 Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos y compuestos aromáticos presentes en la constitución de las plantas superiores. Se encuentran en las partes verdes y coloreadas, pero también en la savia y resinas, lo cual “constituye un mecanismo de defensa vegetal contra parásitos, bacterias, virus y hongos” (Castelo, 2002).

La coloración del propóleo depende en gran parte de la cantidad de flavonoides del mismo, aunque la cera influye y disminuye la calidad de este producto.

Martínez (2002), afirma que los flavonoides son pigmentos contenidos en el propóleo y se definen como “compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana”. Hasta el momento se han identificado más de 5000 flavonoides provenientes del propóleo, frutas, verduras, vino, cerveza, entre otros productos vegetales, que diariamente pueden aportar su “acción antioxidante, minimizando la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres”. Esta acción se debe a los grupos hidroxilos fenólicos que están en su estructura química, logrando además ejercer propiedades quelantes de hierro y metales de transición (Bedascarrasbure, 2000).

Se cree que el propóleo con mayor contenido de flavonoides es de mejor calidad, pero estudios acerca de la actividad biológica individual de componentes del propóleo demostraron que “esta creencia está alejada de la realidad, especialmente en países tropicales” (por la variedad y desconocimiento de las propiedades que ejercen las especies vegetales) (Bankova, 2000).

Sin embargo, los flavonoides son componentes clave del propóleo dado que se responsabilizan de su actividad biológica, siendo los más frecuentes: kaempferol, naringenina, acacetina, apigenina, pinocembrina, galangina. Sus diversas bioactividades, están en función de sus mínimas diferencias estructurales y que han ayudado a clasificarlos como: flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, catequizas y antocianinas (Bankova, 2000).

Por otro lado, Nazareno (2004), enfatiza que los flavonoides ejercen funciones de protección contra el cáncer, acción vaso protectora, prevención de enfermedades cardiovasculares, actividad antiinflamatoria, tratamiento de hipertensión y como mejoradores en la acción de la vitamina C.

En la naturaleza, los flavonoides se pueden encontrar glicosidados o como agliconas, es decir que pueden estar ligados a una molécula de carbohidratos o no respectivamente. El propóleo no es la excepción y se pueden presentar de ambas maneras, lo cual influye en su funcionamiento.

2.7 EFECTO ANTIOXIDANTE DEL PROPÓLEO EN ACEITE DE SOYA

El efecto antioxidante que ofrece el propóleo se debe a los compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, que desempeñan un papel importante en la salud humana pues forman parte de nuestra dieta.

De acuerdo con el estudio realizado por Özcan (2000), el extracto de propóleo puede retardar la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (como el ácido linolénico y linoléico). Este efecto se observaría en el aceite de soya por la presencia del ácido linolénico, pues a pesar de estar en pocas proporciones (7%), tiende a enranciarlo con rapidez que otros aceites. Al ejercer este tipo de funciones en ciertos alimentos, su importancia radica en la minimización de radicales libres e influencia en el desarrollo de enfermedades coronarias, arterosclerosis y determinados tipos de cáncer.

Kinsella (1993), citado por Marcucci (1998), demostró que individuos que ingieren mayor cantidad de flavonoides de origen vegetal presentan un menor riesgo de muerte por enfermedades cardiovasculares.

Un caso particular es el vino tinto, que posee relativamente altas cantidades de flavonoides y es responsable de la denominada “paradoja francesa” que se dio a conocer en Francia, pues a pesar de tener una dieta habitual rica en grasa animal, se consume sustancialmente mayor cantidad de vino (como parte de su cultura). Debido al consumo de vino, se relacionan los flavonoides presentes en él con la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares en la población, comparado con otros países como Estados Unidos en donde la incidencia de estos males ya es un problema en los adultos (Marcucci, 1998).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

Los análisis fisicoquímicos se llevaron a cabo en el laboratorio del PROAPI en la Estación Experimental Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) ubicado en Famaillá, provincia de Tucumán, Argentina; a partir de muestras del propóleo producidas en tres zonas de la Escuela Agrícola Panamericana.

De igual manera, se realizó la evaluación del propóleo como antioxidante en aceite de soya, con muestras del mismo origen en el Centro de Evaluación de Alimentos (C.E.A.) de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el Valle del Yeguaré, San Antonio de Oriente, km. 30 vía a Danlí.

3.2 MATERIALES

Para la cosecha y almacenamiento del propóleo se empleó el overol para trabajar en los apiarios, velo, ahumador, espátula, bolsas plásticas para guardar las muestras, adhesivos para rotular y una hielera para mantener las muestras.

En los estudios realizados dentro de los laboratorios se emplearon frascos ámbar, beakers, erlenmeyers, crisoles, balones, pipetas, propipetas, embudos, papel filtro, hilo de algodón, papel aluminio, pinzas, desecador. De igual manera se emplearon materiales como el propóleo, aceite de soya libre de preservantes; solventes como agua destilada, etanol, metanol, hexano; estándares como ácido gálico (Sigma & Aldrich) y quercetina dihidrato; reactivos como Folin-Ciocalteu y tricloruro de aluminio.

A nivel de laboratorio se empleó un congelador, agitador, balanza analítica, horno, mufla, extractor Soxhlet, espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A con detector de arreglo de diodos (en laboratorio del INTA-Famaillá), Spectronic (C.E.A.).

3.3 Cosecha de propóleo

La cosecha se llevó a cabo el segundo día de diciembre del 2004, al concluir la etapa lluviosa. Se cosechó por medio de mallas, las cuales fueron llevadas al congelador (-5°C por un día) para endurecer el propóleo y facilitar su remoción de las mallas.

Las muestras se recolectaron a partir de tres localidades de la Escuela Agrícola Panamericana: Apiario Local (AL), Monte Redondo (MR) y Pantanal (P). Dichas localidades fueron seleccionadas por estar ubicadas en tres sitios con relativamente distanciados y por el hecho de contar con vegetación variable.

3.4 MANEJO DE MUESTRAS

De los tres apiarios se obtuvieron 50 g de muestra a partir cuatro colmenas respectivamente, con un total de 12 muestras que fueron analizadas por duplicado.

Cada muestra de propóleo se colocó en una bolsa plástica transparente y limpia. Posteriormente, se introdujeron en una bolsa de plástico negra (para evitar exposición a la luz) y como empaque terciario, una caja de cartón sellada, almacenada a 0 a -5°C aproximadamente.

La muestra se protegió adecuadamente durante su transporte hasta el lugar de análisis en el laboratorio de Agroindustrias del Proyecto Apícola Integrado en la Estación Experimental Agrícola-Famaillá del INTA, pues se mantuvo en hielera sin verse alterada por altas temperaturas, pues en realidad la temperatura que puede afectar al propóleo es de 65°C en adelante.

3.4.1 Extracción del propóleo

Se preparó un extracto etanólico de propóleo para solubilizar la fracción resinosa y sus compuestos fenólicos. Se empleó etanol al 95% y propóleo mecánicamente limpio en una solución 85/15 (85% solvente y 15% de propóleo), la cual fue agitada durante aproximadamente 20 horas en un agitador (sin luz) y posteriormente se filtró y conservó en un ambiente fresco, seco y al abrigo de la luz.

3.5 ACEITE DE SOYA

El aceite de soya fue seleccionado para este estudio porque posee un perfil de ácidos grasos con alto grado de insaturación (cuadro 3), lo que lo hizo más inestable y permitió obtener resultados de rancidez en menor tiempo para verificar el efecto antioxidante del extracto de propóleo sobre la base de su contenido de compuestos fenólicos.

Cuadro 3. Perfil de ácidos grasos del aceite de soya.

Ácido graso	Insaturación (es)	Porcentaje
A. Palmítico	C16:0	10
A. Esteárico	C18:0	4
A. Oleico	C18:1	24
A. Linoléico	C18:2	51
A. Linolénico	C18:3	7

Fuente: Baduy, 1999.

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la caracterización físico-química del propóleo se empleó un diseño completo al azar (DCA), teniendo tres tratamientos, que fueron las localidades dentro de la EAP (AL, MR y P). Se realizó cada análisis por duplicado para determinar si la caracterización de cada apiario es igual estadísticamente ($H_0=AL=MR=P$).

El segundo ensayo utilizó un diseño estadístico de bloques completamente al azar (BCA) con medidas repetidas en el tiempo, presentando cuatro niveles de tratamiento: 0%, 0.5%, 1% y 1.5% de EEP, porcentajes seleccionados en estos rangos por los bajos contenidos de compuestos fenólicos en la muestra de propóleo.

La hipótesis nula (H_0) fue que los tratamientos tenían el mismo efecto a través del tiempo sobre la oxidación del aceite de soya. Las variables dependientes del tiempo y EEP fueron el valor de TBA e índice de peróxido, que se midieron desde la adición del extracto hasta la semana cuatro.

Ambos diseños fueron analizados en el programa de análisis estadístico SAS® (“Statistical Analysis System, 1996”).

3.7 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL PROPÓLEO DE LA E.A.P.

La caracterización físico-química se realizó en el laboratorio agroindustrial de la Estación Experimental Agrícola del INTA-Famaillá, con métodos adaptados para estudiar el propóleo bajo la norma argentina que se identifica como IRAM-INTA 15935-1:2002 para propóleo en bruto (Bedascarrasbure *et al.*, 2002).

3.7.1 Determinación de humedad

Se usó un método gravimétrico en el que se secan las muestras en un horno siguiendo el método de la AOAC 930.15 (1998) citado en la norma IRAM-INTA 15935-1:2002.

En primer lugar, se pesó la muestra en la balanza analítica una cápsula de porcelana limpia y seca (T), luego se colocaron aproximadamente seis gramos de propóleo en bruto, pesado también en balanza analítica. (C_{ph}). Finalmente se colocó la cápsula en la estufa a 100°C hasta eliminar completamente la humedad, verificando constancia de peso (al menos 20 horas). Los cálculos se fueron determinados con la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad}\% = 100 * \left(1 - \frac{(C_{TS} - T)}{(C_{TH} - T)} \right) \quad [1]$$

C_{ps} : Peso (constante) de la cápsula con muestra seca.

C_{ph} : Peso de la cápsula con muestra en bruto.

T: Peso de la cápsula vacía (tara)

El resultado se reportó en porcentaje de humedad como promedio de los duplicados, tomando en cuenta que los resultados individuales no varíen en $\pm 1\%$.

3.7.2 Determinación de cenizas

Las muestras secas en cápsulas de porcelana resultantes del análisis de humedad se colocaron en una mufla y se incineraron a 500°C durante al menos 4 horas. No se excedió de esa temperatura para evitar pérdidas de plomo por volatilización (método AOAC 923.03, 1990).

Luego se colocaron las cápsulas con cenizas en el desecador hasta verificar constancia de peso (C_z) y finalmente se cuantificó en porcentaje mediante la ecuación siguiente.

$$\text{Cenizas \%} = \frac{(C_z - T)}{(C_{ph} - T)} * 100 \quad [2]$$

C_z : Peso del crisol con cenizas.

C_{ph} : Peso del crisol con muestra húmeda.

T: Peso de la cápsula (Tara)

El resultado se reportó en porcentaje de cenizas (g/g), como valor promedio de los duplicados, tomando en cuenta que los resultados individuales no varíen en $\pm 1\%$.

3.7.3 Determinación de ceras totales

La cera total se determinó por medio de un extractor Soxhlet, empleando dos gramos de muestra adecuadamente molida. Esta muestra se colocó encerrada en papel filtro seco (P) y sujeta con hilo de algodón.

El balón donde se recogió la cera se pesó en una balanza analítica (B_{C0}), luego se colocaron 120 ml de hexano (solvente). Una vez armado el equipo, se colocó la muestra preparada en el cuerpo del extractor Soxhlet durante aproximadamente 6-8 horas, a una velocidad aproximada de 120-150 gotas de condensado por minuto.

Transcurrido el tiempo de extracción, se comprobó si había finalizado retirando por la llave lateral un par de gotas del solvente en contacto con la muestra en un vidrio de reloj. Se controló el procedimiento evaporando el hexano y se verificó que no quedaran residuos de cera.

La muestra encerrada en el papel se sacó del extractor, se secó y se reservó para las determinaciones de resinas e impurezas mecánicas.

En el balón quedó la cera disuelta en hexano y para el cálculo se retiró el exceso de solvente. El excedente se recuperó en el equipo de destilación a baño maría (70 – 75 °C), que una vez recuperado se puede reutilizar en el mismo tipo de análisis.

La cera y el balón que la contenía fueron colocados en una estufa a 80°C para evaporar los restos de hexano. Después de seis horas, se retiraron de la estufa y se colocaron en un desecador a temperatura ambiente para ser pesados. Se repite el último procedimiento hasta lograr constancia de peso (B_{C1}) y mediante la ecuación 3:

$$\text{Cera \%} = \frac{(B_{c1} - B_{c0})}{m} * 100 \quad [3]$$

B_{c1} : Peso del balón con cera (seco)

B_{c0} : Peso del balón vacío (seco)

m: Peso de la muestra.

Se asumió que los compuestos arrastrados por el hexano eran el contenido total de ceras y finalmente, el resultado se reportó en porcentaje, como el valor promedio obtenido de las muestras y sus duplicados, tomando en cuenta que los resultados individuales no varíen en $\pm 1\%$.

3.7.4 Determinación de resinas totales

A partir de la muestra libre de ceras se extrajo (con extractor Soxhlet) la resina de la muestra empleando 120 ml de etanol de 96° durante al menos seis horas, a una velocidad de aproximadamente 120-150 gotas de condensado por minuto.

El final de la extracción se indicó por el color del alcohol (inoloro). En este punto, se llenó el cuerpo del extractor y se descargó por la llave lateral. El contenido del balón se vació un matraz aforado de 100 ml (V_R) y se llevó al volumen con etanol 96°.

Se pipetearon 50 ml (V_{R1}) y se colocaron en un erlenmeyer previamente pesado en balanza analítica (B_{R0}). Luego se evaporó completamente el alcohol en una estufa a 80 °C (P.E. normal del etanol 96°: 79°C) durante 4-6 horas aproximadamente.

Los restantes 50 ml se colocaron en un frasco color ámbar, con tapa y capacidad para 100 ml. Como el análisis se realiza por duplicado, se dispuso de otros 50 ml que se colocaron en el frasco, obteniéndose así 100 ml de extractos alcohólicos de las muestras para otras determinaciones (Fenoles Totales, Flavonoides Totales, Espectro UV).

Las resinas que quedaron en el erlenmeyer (el conjunto) se retiraron de la estufa, se colocó en un desecador a temperatura ambiente y se pesó en la balanza analítica. Se repitió el pesado hasta lograr constancia de peso, por duplicado (B_{R1}). Trabajando bajo este método, se calculó el porcentaje de resina total con la ecuación cuatro:

$$\text{Resinas \%} = \frac{(B_{R1} - B_{R0})}{m} * 200 \quad [4]$$

B_{R1} : Peso del balón con resinas (secos)

B_{R0} : Peso del balón vacío (seco)

m: Peso la muestra.

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

El resultado se reportó en porcentaje, como el valor promedio de los duplicados, tomando en cuenta que los resultados individuales no varíen en $\pm 1\%$.

3.7.5 Impurezas mecánicas

El resto de la muestra (encerrada en papel) luego de la extracción de ceras y resinas, fue retirada del extractor y se secó en la estufa a 80°C. Luego se dejó enfriar y se pesó en una

balanza analítica. El pesado se repite para lograr constancia de peso (P_1) y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Impurezas Mecánicas \%} = \frac{(P_1 - P)}{m} * 100 \quad [5]$$

P_1 : Peso del cartucho o papel con hilo (secos)

P: Peso del cartucho o papel vacío (seco)

m: Peso la muestra.

El resultado se informó en porcentaje, como el valor promedio de los duplicados, tomando en cuenta que los resultados individuales no varíen en $\pm 1\%$.

3.7.6 Índice de oxidación

De acuerdo con la Legislación Brasileira (2001), corresponde al tiempo de decoloración, medido en segundos (con un máximo permisible de 22 segundos), de una solución de permanganato de potasio 0.1N por acción de los compuestos oxidantes del propóleo. A menor tiempo de reacción, mejor calidad del propóleo.

Para medir el tiempo se pesaron 0.2 g de muestra de propóleo en polvo. Luego se colocó en un erlenmeyer de 125 ml y se añadieron 5 ml de etanol 96 dejando en reposo durante una hora.

Se agregaron 100 ml de agua destilada, se agitó, filtró y se recogió el filtrado en un vaso de precipitación. Del filtrado se colocaron 2 ml en un tubo de ensayo, se adicionó 1 ml de solución H_2SO_4 al 20% y se agitó durante un minuto.

Por último, se agregó una gota de solución de permanganato de potasio ($KMnO_4$) 0.1 N y se tomó el tiempo desde que la gota se pone en contacto con la solución acidulada de propóleo hasta que desapareció el color rosado de la solución (se agitó constantemente).

El resultado se reportó como el valor promedio del tiempo (en segundos) transcurrido en cada muestra y su duplicado.

3.7.7 Compuestos fenólicos totales

Se determinó con un método cuantitativo y colorimétrico por medio del espectrofotómetro Hewlett Packard 8452 A (Lee, K. *Et al*, citado por la norma IRAM-INTA 15935-1:2002. 2002)

Partiendo de la sangría obtenida en el análisis de resinas, se obtuvieron 100 ml de mezcla del extracto etanólico de propóleos (V_S). Luego se midieron cinco ml de sangría (V_t) y se colocaron en un matraz aforado de 100 ml (V_1). Se completó con agua destilada y se agitó vigorosamente para estabilizar la emulsión formada.

Se tomó 1 ml (V_{T1}) de la solución anterior y se colocó en un matraz aforado de 25 ml (V_C), se agregaron 10 ml de agua destilada y 1 ml del reactivo de Folin Ciocalteu, se agitó suavemente y permaneció en reposo durante 2 minutos.

Seguidamente se añadieron 4 ml de la solución de carbonato de sodio al 15% y se completó al volumen con agua destilada, sin agitar. Se calentó en baño maría a 50°C durante cinco minutos y se enfrió en baño de agua durante 15 minutos, hasta llegar a la temperatura ambiente.

La absorbancia fue leída en el espectrofotómetro a 765 nm, contra un blanco preparado en las mismas condiciones, con los reactivos y utilizando 1 ml de agua destilada en lugar de muestra.

Con el valor de absorbancia obtenido, se interpola en una curva de calibración, construida con ácido gálico como referencia y se cuantifica el contenido de fenoles totales.

El resultado fue expresado como ácido gálico en gramo de compuestos fenólicos por 100 g de propóleo (g/100g). Se tomó promedio obtenido de la muestra y su duplicado tomando en cuenta que los resultados individuales no varíen en $\pm 1\%$.

3.7.8 Flavonoides totales

Se realizó de acuerdo con estudios de Woisky, R.; Salatino A., 1998 citado por Bedascarrasbure (2002).

De igual forma se cuantificó sobre la base de la combinación de 50 ml de cada uno de los extractos alcohólicos provenientes de la determinación de resinas al procesar la muestra simple, su duplicado y se colectaron 100 ml de sangría.

Se pipeteó 0,1 ml de sangría mezcla (V_t) en un matraz de 25 ml (V_c), se agregaron 0,5 ml de solución de tricloruro de aluminio al 5% y se enrasó con metanol.

El blanco se preparó de la misma manera, empleando 0,1 ml de alcohol etílico en lugar de la muestra del extracto etanólico. Se dejó por 30 minutos en la oscuridad y se leyó la absorbancia a 425 nm. El contenido de fenoles totales se calculó empleando la formula 6.

$$Fl = \frac{Abs}{\delta * b} * \frac{Vc}{10000 * Vt} \quad [6]$$

Donde:

Fl: Contenido de flavonoides totales [gramos/100 gramos de extracto etanólico].

Abs: absorbancia de la muestra a 425 nm

V_t : Volumen tomado del extracto etanólico.

V_c : Volumen del matraz.

δ : Densidad de la tintura [g/ml], se asume que es = 1 por la dilución que tiene.

El resultado se expresó en gramos de flavonoides por 100 gramos de extracto etanólico (g/100g o %), como el valor promedio obtenido de la muestra y su duplicado tomando en cuenta que los resultados individuales no varíen en $\pm 1\%$.

3.7.9 Espectrofotometría de absorción UV

El espectro de absorción de cada muestra se obtuvo a partir de la dilución del extracto etanólico (obtenido al extraer resinas totales) y $AlCl_3$ como reactivo de arrastre. Esto se pudo detectar con un espectrofotómetro UV Hewlett Packard 8452A con detector de arreglo de diodos (Markham, 1982).

Las diluciones se midieron en un rango de 240 a 420 nm y debieron presentar dos bandas características entre 270 y 315, siendo el espectrograma resultante de la sumatoria de absorciones de los ácidos, ésteres, alcoholes, flavonoides, chalconas, etc (a excepción de ácidos fenólicos y flavonas).

Inicialmente el método fue fijado por los japoneses para identificar flavonoides. El laboratorio del INTA-PROAPI también lo emplea pues determina la cantidad y calidad de flavonoides de interés sin la necesidad de recurrir a métodos más complejos y costosos como la cromatografía líquida de alta resolución.²

3.7.10 Cuantificación de plomo

El plomo es un metal pesado que se incluye dentro de los parámetros de calidad del propóleo por tratarse de un producto que puede captarlo del medio ambiente o según el manejo de la colmena y método de cosecha.

Su valor máximo permitido es de 0.5 ppm y la metodología se desarrolla sobre la base del método general de ditizona de la AOAC Official Method 934.07 – Lead Food – citado por Alvarez *et al.*, (2002).

² Maldonado, L. 2004. Espectroscopia de absorción UV en propóleo. INTA-Famaillá. Argentina (Comun. Pers.)

Este método empleó la ceniza de propóleo acidificada, que contenía determinada cantidad de plomo. Se mezcló con una solución reductora de citrato-cianuro amoniacal, y luego el plomo se extrajo con ditizona en cloroformo para formar un complejo de ditizonato de plomo color rojo. Por último se midió el color en el espectrofotómetro a 510 nm y el resultado se reportó en ppm de plomo.

3.8 CORRELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES E ÍNDICE DE OXIDACION

A partir los datos obtenidos en la caracterización, se estimó una correlación simple, para determinar el grado de asociación de la relación lineal entre el contenido de compuestos fenólicos e índice de oxidación en las doce muestras analizadas por duplicado.

3.9 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL PROPÓLEO EN ACEITE DE SOYA.

La actividad antioxidante del propóleo fue medida a nivel de laboratorio, empleando extracto etanólico de propóleo al 15% en aceite de soya sin antioxidantes y/o procesos de hidrogenación, mediante la adición de diferentes porcentajes de dicho extracto.

El propóleo evaluado correspondió a la muestra con mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. Estadísticamente podía emplear dos muestras del Apiario Local o una de Pantanal. Para este caso se empleó la muestra número uno del Apiario Local ya que hubo mayor disponibilidad de dicha muestra. Esta muestra contenía 9.1% de compuestos fenólicos y 7.185% de flavonoides sobre la base del contenido de resinas totales.

Como ya se mencionó anteriormente, el extracto etanólico de propóleo se adicionó al aceite de soya (seleccionado por su disponibilidad y por ser inestable dado el alto grado de insaturación), para facilitar la observación del efecto del extracto de propóleo. Se evaluó la rancidez del aceite con cuatro diferentes tratamientos, los cuales permanecieron bajo condiciones de temperatura extremas (60°C) por cuatro semanas.

3.9.1 Preparación de tratamientos

Se evaluaron cuatro porcentajes de extracto etanólico de propóleo (EEP) agregadas a cada unidad experimental de 200 ml de aceite de soya. Se analizaron semanalmente (tiempo: 0, 1, 2, 3) el índice de peróxido y valor de ácido tiobarbitúrico (TBA).

1. 200 ml de aceite y 0% de EEP
2. 200 ml de aceite y 0.5% de EEP
3. 200 ml de aceite y 1% de EEP
4. 200 ml de aceite y 1.5% de EEP

Las concentraciones de EEP se seleccionaron sobre la base de evaluaciones de extractos similares en otros tipos de aceites más estables, por lo tanto se aumentaron relativamente para identificar el mejor tratamiento (Özcan, 2000).

3.9.2 Índice de peróxido

La primera variable a medir, permitió cuantificar el grado de rancidez del aceite de soya. Es un método químico que se basa en medir la capacidad de los peróxidos, producto de la oxidación de grasas, de oxidar iones de yoduro valorados con solución de tiosulfato de sodio (AOAC method 923.03, 1990)

En cada análisis se pesó la muestra (5 g), se adicionaron 30 ml de solución ácido acético:cloroformo, luego 0.5 ml de solución sobresaturada de Ioduro de Potasio (KI) y se agitó durante un minuto.

Posteriormente se adicionaron 30 ml de agua destilada y se procedió a titular con la solución de tiosulfato de sodio. Al perder el color amarillo se coloca 1 ml de solución de almidón (al 1%) y se titula nuevamente hasta que el color morado desaparezca.

El cálculo se realizó sobre la base de la cantidad de tiosulfato que se empleó mediante la siguiente fórmula:

$$IP = \frac{S * N * 1000}{M} \quad (7)$$

Donde:

S= ml de tiosulfato utilizado para titular la muestra (menos el titulado del blanco).

N= normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

M= peso de la muestra en gramos.

El resultado se reportó en meq. de peróxido/kg de aceite, como valor promedio de la muestra y el duplicado.

3.9.3 Valor de TBA

Es un método que colabora con el índice de peróxido pues éste tiende a aumentar a medida que la oxidación es más avanzada (con la presencia del malonaldehído). Se basa en la “reacción de condensación entre dos moléculas de TBA con una de malonaldehído en la que se produce un compuesto cromógeno de color rojo” y se midió por medio del espectrofotómetro a 530 nm (Baduy, 1999).

Se pesó la muestra, se adicionó 1-butanol y se colocaron 5 ml de la solución en un tubo de ensayo. Luego se agregaron 5 ml de solución de ácido tiobarbitúrico (TBA), se mezcló bien y se colocó en baño María durante dos horas.

Una vez que las soluciones estuvieron a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de cada muestra a 530 nm en el Spectronic. Con el resultado se calculó el valor de TBA mediante la siguiente fórmula:

$$TBA = \frac{50*(A-B)}{M} \quad (8)$$

Donde:

A= absorbancia de la muestra

B= absorbancia del blanco

M= peso de la muestra

El valor de TBA fue expresado en mg de malonaldehído/kg de aceite, como valor promedio de la muestra y su duplicado.

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y separación de medias con el estadístico de Tukey un nivel de significancia de 0.05 de las características fisico-químicas.

Por otro lado, se llevó a cabo la prueba de correlación entre el contenido de fenoles totales e índice de oxidación del propóleo.

Para concluir el estudio estadístico descriptivo, se realizó un segundo análisis de varianza (ANDEVA) de las medidas repetidas en el tiempo, con separación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para la segunda etapa del proyecto, es decir la evaluación del efecto antioxidante del propóleo en aceite de soya sin preservantes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

Se encontraron diferencias significativas entre las características físico-químicas de los propóleos, a pesar de estar no estar tan distanciados. Es probable que el comportamiento propolizador de las abejas y principalmente el tipo de vegetación circundante, fueron determinantes para obtener estas variaciones significativas.

Cuadro 4. Caracterización físico-química del propóleo de AL, MR y P.

Variable	AL	MR	P	Referencia ⁴	DMS ⁵
	Media \pm σ^3	Media \pm σ	Media \pm σ		
Humedad (%)	4.89 \pm 0.65	7.59 \pm 3.20	8.10 \pm 1.08	\leq 10	0.896
Ceras (%)	29.65 \pm 3.30	63.54 \pm 13.7	38.36 \pm 24.84	\leq 30	3.797
Resinas (%)	42.59 \pm 5.12	13.42 \pm 9.6	35.14 \pm 18.7	\geq 35	1.58
Cenizas (%)	1.66 \pm 0.12	2.12 \pm 0.52	2.24 \pm 0.34	\leq 5	0.153
Índice de Oxidación (seg.)	1.48 \pm 0.33	40.66 \pm 48.0	26.98 \pm 4.36	\leq 22 seg.	3.55
Impurezas Mecánicas (%)	23.24 \pm 3.20	14.34 \pm 2.90	21.81 \pm 7.02	\leq 25	3.13
Fenoles Totales (%)	7.62 \pm 1.85	2.59 \pm 2.35	7.29 \pm 4.62	\geq 5	0
Flavonoides Totales (%)	5.13 \pm 1.81	1.74 \pm 1.73	5.11 \pm 3.37	\geq 1	0.33

El primer parámetro medido fue humedad, que es un indicador del manejo y ambiente en que se ha producido y cosechado el propóleo. Los valores de humedad estuvieron bajo el 10% de recomendado por la norma del instituto argentino de normalización (IRAM). Los apiarios de P y MR mostraron contenidos de humedad significativamente mayores a las muestras del AL (8.1 y 7.59 respectivamente), por lo tanto el AL presenta mejor calidad, ya

³ Desviación estándar.

⁴ Norma IRAM-INTA para propóleo en bruto.

⁵ Diferencia mínima significativa.

que tendría menos tendencia de promover el deterioro del propóleo por crecimiento de hongos u otros microorganismos.

La diferencia en humedad se le atribuye al manejo, ya que del AL hay menos distancia con respecto al lugar de almacenamiento (Planta de mieles y derivados), mientras que en MR y P puede existir mayor manipulación y tiempo hasta llegar a la Planta de mieles y derivados. El clima y humedad relativa no son variables entre cada localidad, por lo tanto no debe influenciar en la humedad de las diferentes muestras.

La cantidad de ceras producidas en cada colmena fue muy elevada (más del 60% en un par de casos) y estuvo fuera de los rangos establecidos en P y MR, sin embargo el AL tampoco presentó cantidades muy inferiores a las recomendadas (<30%). Para este parámetro se encontraron diferencias significativas en las tres localidades, siendo el AL el de mejor calidad, seguido por P y MR.

El alto contenido de cera se debe al comportamiento de las abejas de rellenar las mallas para propóleo. Esto no es favorable para la calidad del propóleo, pero se presentó en ciertas colmenas (seleccionadas al azar) de cada apiario.

Las resinas se constituyen como el principal elemento del propóleo, pero no estuvieron dentro de los rangos óptimos, pues los niveles fueron inferiores y se encontraron diferencias estadísticas entre las muestras de las 3 localidades. Los mayores contenidos de resinas, fueron encontrados en el AL, seguido de P y MR.

El propóleo del AL guarda las mejores características, pues al tener mayor contenido de resinas, posee mayor contenido de compuestos fenólicos que son de gran interés en este producto. Seguidamente está P y por último MR, que en general es más irregular y por ende, no posee características tan deseadas.

La fracción de impurezas mecánicas es una de las características físicas visibles y no deseadas en el propóleo. Para el caso de las tres localidades de la E.A.P., todas estuvieron dentro de los rangos establecidos por la norma de referencia y no presentaron diferencias significativas entre las medias de cada apiario.

Un menor contenido de impurezas representa mejor calidad y en este parámetro el porcentaje de impurezas de MR fue significativamente menor a los valores mostrados en P y el AL respectivamente. Entre P y Al no se encontraron diferencias significativas, lo cual se puede deber a que las abejas tienden a depositar en las mallas mayor cantidad de resinas y con esta fracción incluyen restos de plantas, animales u otros residuos que se adhieren en el proceso de sellado de las mallas para cosechar propóleo. Cabe resaltar que es posible reducir la cantidad de materiales no deseados al momento de cosechar y retirar el propóleo de la malla.

El contenido de cenizas también estuvo dentro del rango establecido por la norma IRAM para los tres apiarios. En las muestras de MR y P las cantidades fueron iguales

estadísticamente, mientras que en el AL la cantidad de cenizas fue menor y significativamente diferente a las dos localidades mencionadas anteriormente.

Analizando los contenidos de fenoles totales, se reveló que las cantidades están sobre la cantidad establecida en la norma, exceptuando la media de MR, donde existe un deficiente contenido de compuestos fenólicos.

Se encontraron diferencias estadísticas al comparar entre los tres apiarios, siendo el AL la mejor localidad (mayor contenido de fenoles totales), seguida de P y por último MR. En el propóleo del AL se presentó un valor máximo de fenoles de 9.27% y una media de 7.62 %, mientras que los valores que se mantuvieron por debajo de la referencia recomendada fueron tres muestras provenientes de MR con 0.69%, 2.48%, 1.25% y una media de 2.59%.

Los promedios de cada apiario son resultado de una gran variabilidad existente en la calidad de propóleo producido. Generalmente esto está muy ligado a la cantidad de otros componentes, principalmente de las resinas.

El contenido de flavonoides totales del AL y P estuvieron dentro del rango establecido por la norma de propóleo en bruto y no hubieron diferencias significativas entre ambas localidades (Cuadro 4). En el caso de MR, se mostró un promedio de contenido de flavonoides muy inferior (1.74%), por tanto presentó diferencias significativas con respecto a los dos apiarios antes mencionados. Igual que el contenido de compuestos fenólicos, en el AL se cuantificaron los mayores contenidos de flavonoides, seguido de P y MR respectivamente. Esto indicó que el mayor valor biológico del propóleos se encuentra en las muestras del AL, que a su vez poseen mayor contenido de resinas y consecuentemente una mejor calidad debido a que posee mayor fuente de resinas que en P y MR. Sobre la base de la composición del propóleo de la E.A.P., se calculó que al consumir en la dieta 500 mg de propóleo en bruto por día, se incorporarían entre 0.6 y 37.5 mg de flavonoides.

En el índice de oxidación, los tres apiarios presentaron diferencias significativas dado que ciertas muestras de MR y P, tardaron más tiempo en reaccionar en comparación con el AL, donde tardaron apenas 1.48 segundos en promedio. Esto indica que los compuestos del propóleo del AL poseen una actividad antioxidante potencial mayor que en P y MR respectivamente. Estas diferencias entre los propóleos de cada apiario se dieron por a las variaciones en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de cada localidad. Por lo demás, la media del índice del propóleo de P se vio afectada por una muestra con bajo contenido de resinas, compuestos fenólicos y flavonoides.

Por último, se analizó el espectrograma UV, pues el propóleo absorbe fuertemente la luz UV el rango de 270 a 350 nm e indica una presencia importante de flavonoides que tienen valor biológico.

Cuadro 5. Absorbancia máxima del espectro de luz UV a 290 nm en AL, MR y P.

Muestra	Espectros UV del propóleo	
	Absorbancia a 290 nm	Promedio
AL	0.69	0.59
	0.46	
	0.75	
	0.45	
MR	0.53	0.63
	0.65	
	0.66	
	0.67	
P	0.79	0.52
	0.86	
	0.4	
	0.86	
Diferencia mínima significativa = 0.32		

En la figuras 1, 2 y 3 se puede observar que el comportamiento de los espectros UV de las muestras provenientes de AL, MR y P respectivamente posee perfiles que guardan un comportamiento similar, donde hubo un máximo de absorbancia de 0.86 a 290 nm. Se encontraron dos muestras sin picos máximos en ese rango longitud de onda, dados los bajos niveles de flavonoides que presentaban.

Los valores promedios no presentaron diferencias de absorción a 290 nm (Cuadro 5), no obstante, el propóleo del AL se mostró más constante en el predominio de pinocembrina. Los propóleos de MR y P presentaron sendas muestras que no mostraron el pico máximo a 290 nm, lo cual se relacionó directamente con la reducida presencia de resinas en el propóleo (en muestras con cantidad muy baja de resinas, no se detectó el pico máximo a 290 nm).

El pico máximo a los 290 nm en las muestras de propóleo se identificó como pinocembrina⁴. Además se mostraron dos bandas amplias, insinuadas, (ver anexos 1-6) y un segundo pico, a los 354 nm, particular en las muestras y generalmente no registrado en otros espectros de propóleo.

Para identificar los flavonoides que se aprecian en los anexos 9-14 serían necesarias técnicas analíticas y precisas como la cromatografía, para tipificar y deducir la calidad de flavonoides de interés biológico (Bedascarrasbure, 2004).

⁴ Maldonado, L. 2004. Espectrometría de absorción UV en propóleo. INTA-Famaillá. Argentina (Comun. Pers.).

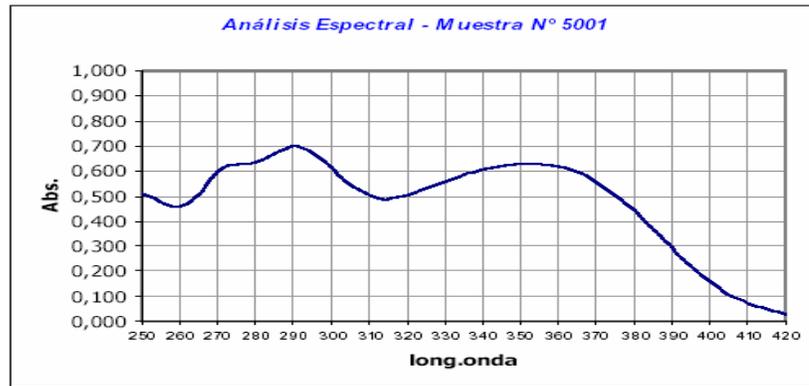


Figura.1 Espectrograma UV visible de muestra en el Apiario Local.



Figura 2. Espectrograma UV visible de muestra en Monte Redondo.

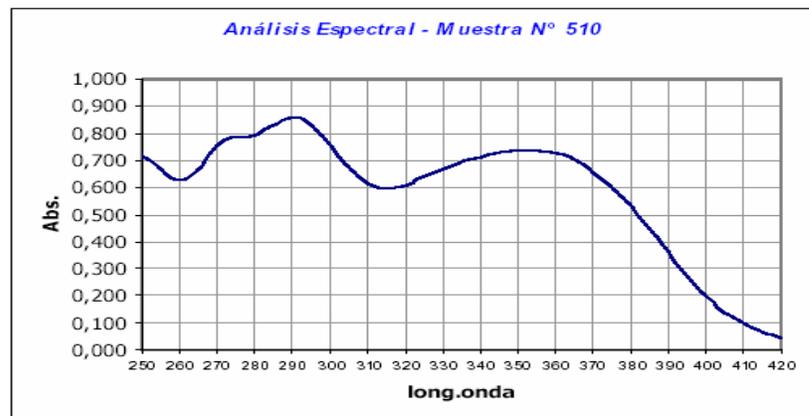


Figura 3. Espectrograma UV visible de muestra en Pantanal.

4.1.1 Detección y cuantificación de plomo

Los resultados de esta determinación fueron bastante favorables, al encontrar solamente dos muestras con plomo, pero bajo los niveles permitidos de 10 ppm, establecidos por la norma de referencia (IRAM-INTA). Diez de las doce muestras mostraron niveles no detectables de plomo.

Cuadro 6. Cuantificación de plomo en el propóleo del AL, MR y P.

Localidad	Plomo (ppm)
AL	0.29
	0.12
	<0.1
	<0.1
MR	<0.1
	<0.1
	<0.1
	<0.1
P	<0.1
	<0.1
	<0.1
	<0.1

En el Cuadro 6 figuran las muestras donde se detectaron residuos de plomo y esto es atribuido a una posible contaminación por el tipo de mallas o contaminación externa (durante el manejo de las colmenas –restos de pintura u otros-) aunque realmente no está bien definida la causa de la presencia de plomo (Pb) en dos de las cuatro muestras, ya que todas las colmenas se encontraban bajo las mismas condiciones en el AL.

4.2 CORRELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE OXIDACIÓN Y CONTENIDO DE FENOLES TOTALES.

El índice de oxidación es influenciado enormemente por el contenido de compuestos fenólicos. Entre el índice de oxidación y el contenido de fenoles totales del propóleo de la E.A.P, hubo un grado de asociación inverso (coeficiente de correlación $r = -0.79$ y $pr = 0.001$). Esto indica que a mayor concentración de fenoles totales el tiempo de la reacción es más rápido (poder antioxidante del propóleos, sobre la solución de permanganato de potasio).

Con este grado de asociación, el tiempo de oxidación puede ser capaz de predecir el contenido de compuestos fenólicos, lo cual es conveniente para estimar rápidamente estos compuestos de alto interés en el propóleo. En el caso de la E.A.P., el número de muestras para este análisis de correlación debe ser incrementado y así lograr un resultado más confiable, dado que el propóleo es bastante variable en cuanto al contenido de fenoles totales

Cuadro 7. Correlación entre contenido de fenoles totales e índice de oxidación.

<i>Muestra</i>	<i>Fenoles Totales (%)</i>	<i>Índice de Oxidación</i>
AL	9.1	1.2
	6.57	1.6
	9.27	1.225
	5.55	1.9
MR	5.94	1.75
	0.69	107.5
	2.48	10.2
	1.25	43.2
P	9.12	1.3
	10.06	1.6
	0.38	104
	9.62	1
*Coeficiente de correlación = -0.797		
Prob. = 0.001		

Como señala Maidana (2000), probablemente ciertos propóleos tengan mayor concentración de compuestos fenólicos que decoloren con más rapidez el permanganato de potasio; o bien contengan ácidos no fenólicos insaturados (como el cinámico) junto con ácidos grasos insaturados de cadena abierta, procedentes del mismo metabolismo de las abejas melíferas.

El 75% de las muestras poseen un índice de oxidación menor a 22 segundos, lo cual aparentemente indica una alta calidad y actividad antioxidante potencial. A pesar de contar con un valor máximo de fenoles totales de 10.06%, curiosamente el menor tiempo no corresponde al mayor contenido de fenoles totales. En el Cuadro 7 se observa que los mejores resultados corresponden a las colmenas del AL, donde todas las muestras decoloraron casi inmediatamente (menos de 22 segundos) el KMnO_4 , seguidas de P y MR respectivamente.

4.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO SOBRE LA OXIDACIÓN DEL ACEITE DE SOYA.

La evaluación de la susceptibilidad al enranciamiento del aceite de soya sin propóleo y con 0.5, 1 y 1.5% del EEP, se muestra en las figuras cuatro y cinco.

De acuerdo con el Codex Alimentarius, el índice de peróxido tiene un máximo permisible en aceite de soya es de 10 meq/kg. Durante el presente ensayo, el control superó este límite entre la semana uno y dos. Luego continuó ascendiendo, hasta que llegó al nivel máximo en la semana cuatro (84.5 meq/Kg).

Los tratamientos no retrasaron el tiempo de oxidación del aceite por encima del límite permitido, pues la oxidación se inició incluso antes de concluir la semana uno. No obstante, mediante el uso de extractos de propóleo se lograron reducir los niveles de peróxidos en la semana cuatro (73.8 meq/kg).

El efecto que tuvo el EEP en la muestra al disminuir la cantidad de peróxidos producidos no es comparable al efecto de un antioxidante artificial, que retrasa la oxidación por meses. Si se refiere al propóleo como un antioxidante natural, no tuvo consecuencias positivas en el aceite debido a las bajas cantidades de compuestos fenólicos. Del mismo modo, no se conoce si el tipo de compuestos fenólicos que posee tiene actividad antioxidante.

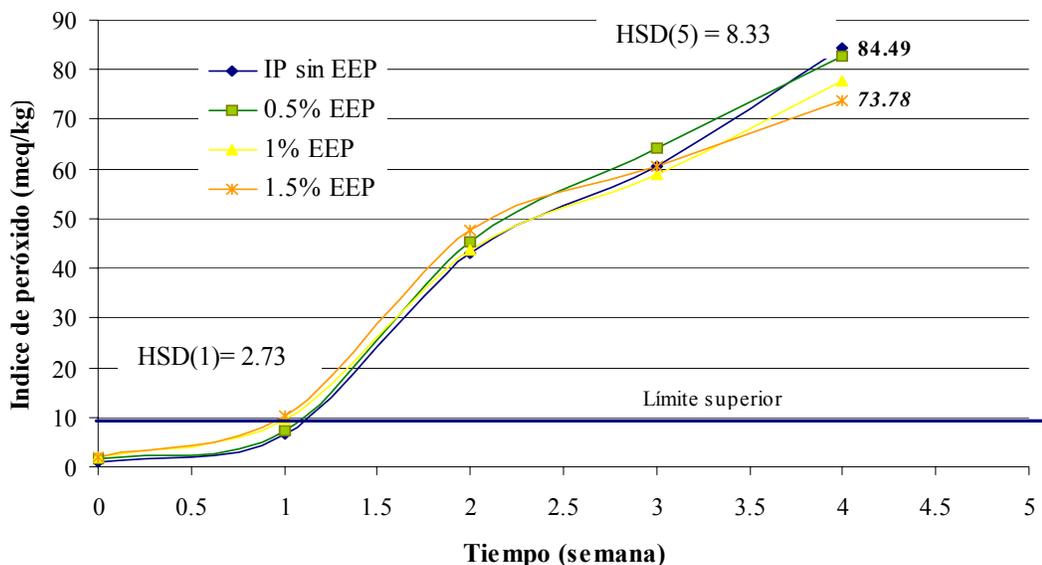


Figura 4. Efecto de cuatro niveles de EEP sobre el índice de peróxido del aceite de soya sin preservantes medido durante cuatro semanas.

Semanalmente se presentaron diferencias entre cada tratamiento. En la última semana (4), se alcanzaron los valores máximos de peróxidos y se presentaron diferencias entre el control y 0.5% de EEP, y 1-1.5% de EEP, lo cual se aprecia en la Figura 4, a partir del valor la diferencia mínima significativa (DMS). Los tratamientos 1 y 1.5% de EEP tratamiento presentaron los valores de IP más bajos después de cuatro semanas de almacenamiento.

Paralelamente, en el valor de TBA tampoco hubo un efecto de los compuestos fenólicos. El control (0% EEP) presentó un comportamiento similar al de las muestras con EEP. Únicamente en la semana 2 se mostró un cambio en el valor de TBA, pues se llegó al límite permitido (TBA= 0.2), y luego descendió drásticamente.

Los valores de TBA no tuvieron un comportamiento lógico al disminuir desde la segunda semana, sin embargo es probable que la presencia de compuestos fenólicos haya reducido la cantidad de sustancias reactivas con TBA, especialmente en la semana dos, cuando se alcanzaron los mayores valores (0.23 en 0% EEP y 0.12 en 1.5% EEP). Se menciona esto, pues se han realizado estudios en plasma sanguíneo donde polifenoles del vino, redujeron “la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico” y bajo este sentido se podría asumir que ocurrió el mismo comportamiento en el aceite de soya (Leighton, 2000).

En definitiva, los extractos preparados no mostraron un efecto antioxidante favorable en el aceite de soya, al no alargar la vida útil del producto. La reducción en cantidad de subproductos de la oxidación no fue relevante. Eventualmente a partir de estos resultados se puede concluir que el contenido de compuestos fenólicos del propóleo se debe enfocar en otras propiedades atribuidas al propóleo (antimicrobianas, antiinflamatorias u otras)

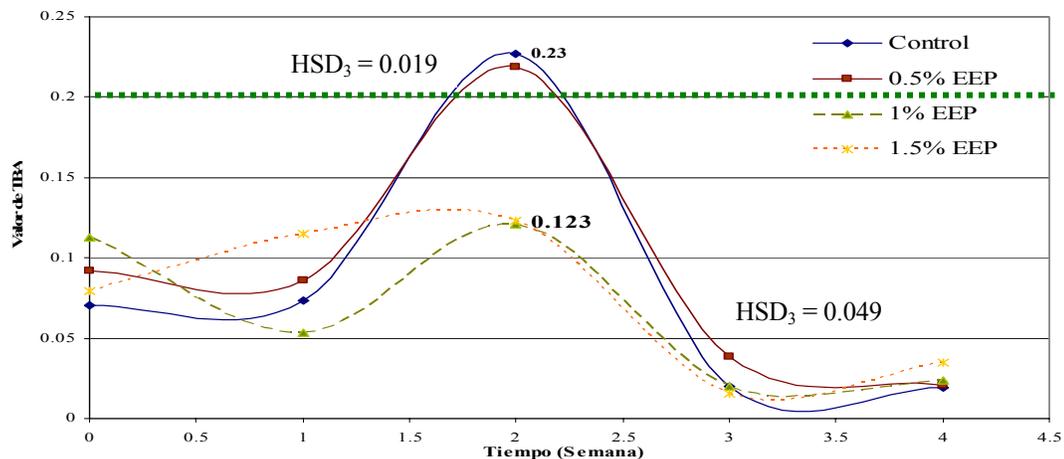


Figura 5. Efecto de cuatro niveles de EEP sobre el valor de TBA del aceite de soya sin preservantes medido durante cuatro semanas.

5. CONCLUSIONES

La cantidad de muestras resultó insuficiente para caracterizar con precisión el propóleo de la E.A.P.

Las características físico-químicas del propóleo de los apiarios difirieron a pesar de encontrarse a cortas distancias (1-2 km) por la variabilidad de la vegetación circundante.

El tiempo del índice de oxidación tuvo una relación inversamente proporcional al contenido de compuestos fenólicos, indicando confiabilidad para determinar la concentración de fenoles totales en propóleo a partir de este análisis (índice de oxidación del propóleo).

La presencia de compuestos fenólicos del propóleo de la E.A.P. no tuvo un efecto antioxidante de relevancia sobre el aceite de soya sin preservantes.

6. RECOMENDACIONES

Realizar una caracterización del propóleo con mayor número de muestras de la zona para estandarizar y posteriormente realizar ensayos biológicos sobre la base de fundamentos científicos.

Tipificar la composición de las resinas vegetales que rodean los apiarios para facilitar la caracterización de los propóleos de la zona.

Practicar el índice de oxidación, para estimar un aproximado del contenido de compuestos fenólicos.

Medir el efecto antioxidante del propóleo mediante métodos como el ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”), para determinar cuantitativamente la capacidad de ejercer su actividad antioxidante o en su defecto, evaluar otras propiedades que son atribuidas al propóleo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, A.; Maldonado, L.; Bedascarrasbure, E.; Van der Host, A. 2002. Norma para propóleos en bruto. IRAM-INTA 15935-1:2002. 2002.

AOAC Method 923.03. 1990. Métodos oficiales de análisis. 15va Edición. Association of Official Analytical Chemists. EEUU.

Asís, M. 2003. Apiterapia para todos. La Habana, Cuba. En línea. Consultado el 5 de octubre de 2004. Disponible en: <http://www.7conapi.com/7ConApi/Docs/Propoleos.aspx>

Baduy, S. 1999. Química de los Alimentos: rancidez en lípidos. Cuarta Ed. Alhambra. México. 530 p.

Bankova, V. 2000. The journal of the American apitherapy society: determining quality in propolis samples. Vol. 7, No. 2. 3 p.

Bedascarrasbure E (a), Maldonado L., Segura C., Pérez O., Alvarez A., Van der Horst A (a). *et al.* 2000. Caracterización físico-química de propóleo argentinos y sus extractos. En línea. Consultado el 3 de abril de 2003. Disponible en: <http://www.apinetla.com.ar/congreso/c13.pdf>

Bedascarrasbure E.(b), Maldonado L., Segura C., Pérez O., Alvarez A., Van der Horst A, Tabera A. 2000. Caracterización de propóleo argentinos. II- Valle Calchaquí. Anales del Congreso Internacional de Propóleo. Argentina. 103 p.

Bedascarrasbure, E. (c), Maldonado, L., Alvarez A.; Van der Host, A. 2002. Esquema A de Norma IRAM N° 15935-1.

Bedascarrasbure, E (d); Maldonado, L.; Álvarez, A.; Rodríguez, E. 2004. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleos Argentino. 7 p.

Castelo, N. 2002. Cuando las alianzas dan sus frutos. En línea. Consultado el 5 de oct de 2004. Disponible en: www.sada.org.ar/Articulos/Actualidad/alianzas.htm

Codex Alimentarius. 1990. Grasas y aceites: aceite de soya. 78 p.

Krell R. 1996. Value-added products from bee keeping. FAO Agricultural Services Bulletin 124 .

Legislación Brasileira. 2001. Legislação Brasileira - Extrato de Própolis: Regulation for Identity and Quality of Propolis Extract. Consultado 20 de nov de 2003. En línea. Disponible en: <http://www.conapis.com.br/legislacao.htm>

Leighton, F.; Urquiaga, I. 2000. Polifenoles del vino y salud humana. Consultado 5 de oct de 2004. En línea. Disponible en: <http://www.bio.puc.cl/vinsalud/publica/polifenoles.doc>.

Maidana, J. 2000. Influencia de los compuestos fenólicos del propóleos sobre el índice de oxidación. Centro de Investigaciones Apícolas-CEDIA - Facultad de Agronomía y Agroindustrias - Universidad Nacional de Santiago del Estero. Sgo del Estero. Argentina.

Marcucci, M.C. 1998. Control de calidad de propóleo , 1998 – Revista Mensagem Doce N° 48.

Markham, K.R. (1982) “Techniques of flavonoid identification”. Academic Press; London, UK

Martínez-Flores, J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Consultado 15 de oct. de 2003. En línea. Disponible en: http://www.grupoaulamedica.com/aula/nutricion/n62002/03_Los_flavonoides.pdf

Nazareno. 2004. Jornada de Actualización “Alimentos, Nutrición y Salud”. INSIBIO. Departamento de Bioquímica de la Nutrición. Conferencia recibida en marzo de 2004. Ar. 12 p.

Özcan M. 2000. Instituto de la grasa: Uso de extracto de propóleo como antioxidante natural para aceites vegetales. Consultado 22 de ago de 2003. En línea. Disponible en: <http://www.ig.csic.es/Revis/Fas51/Res51/Re51f47.html>

Paginamedica.com. Balcón alternativo: fitoterapia, eucalipto. Consultado el 29 de ago de 2004. En línea. Disponible en: http://www.paginamedica.combalcon/ver.asp?fitoterapia_2
EUCALIPTO

Peña, J. 2001. Producción de propóleos. Consultado 10 de sep de 2004. En línea. Disponible en: <http://ecologia.unex.es/apicultura/propoleos.html>

Pieta P., Gardana C., Pietta A. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. Revista ELSEVIER. 14 p.

SAS Institute. 1996. Statistical Analysis System. GLM. Version 8. Edition SAS® Institute Inc. Cary, NC.

Sloan, E. 2004. Rev. Food Technology: Top 10 functional food trends 2004. EEUU. Vol. 58. No. 12p.

Yanucci, H. 2002. Principios Básicos del propóleo (parte # 14). Boletín del Colmenar. Argentina. 3 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza y separación de medias del contenido de humedad.

The GLM Procedure

Dependent Variable: Hum

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	121.4544333	11.0413121	24.46	<.0001
Error	12	5.4169000	0.4514083		
Corrected Total	23	126.8713333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Hum Mean
0.957304	9.791634	0.671869	6.861667

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Hum

Minimum Significant Difference 0.8962
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Apiario
A	8.1013	8	Pantanal
A			
A	7.5950	8	MRedondo
B	4.8888	8	Local

Anexo 2. Análisis de varianza y separación de medias del contenido de resinas totales.

The GLM Procedure

Dependent Variable: Res

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	6472.149246	588.377204	541.36	<.0001
Error	12	13.042150	1.086846		
Corrected Total	23	6485.191396			

R -Square	Coeff Var	Root MSE	Res Mean
0.997989	3.528630	1.042519	29.54458

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Res

Minimum Significant Difference 1.3906

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Apiario
A	40.0675	8	Local
B	35.1450	8	Pantanal
C	13.4213	8	MRedondo

Anexo 3. Análisis de varianza y separación de medias del contenido de cera.

The GLM Procedure

Dependent Variable: Cera

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	10912.57798	992.05254	160.93	<.0001
Error	12	73.97240	6.16437		
Corrected Total	23	10986.55038			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Cera Mean
0.993267	5.662170	2.482814	43.84917

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Cera

Minimum Significant Difference 3.3118
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Apiario
A	63.536	8	MRedondo
B	38.355	8	Pantanal
C	29.656	8	Local

Anexo 4. Análisis de varianza y separación de medias del contenido de impurezas mecánicas.

The GLM Procedure					
Dependent Variable: Impmec					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	773.8437333	70.3494303	23.74	<.0001
Error	12	35.5620000	2.9635000		
Corrected Total	23	809.4057333			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Impmec Mean	
	0.956064	8.695085	1.721482	19.79833	

The GLM Procedure				
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Impurezas mecánicas				
Minimum Significant Difference				2.2962
Means with the same letter are not significantly different.				
Tukey Grouping	Mean	N	Apiario	
A	23.2375	8	Local	
A				
A	21.8138	8	Pantanal	
B	14.3438	8	MRedondo	

Anexo 5. Análisis de varianza y separación de medias del contenido de ceniza.

The GLM Procedure

Dependent Variable: Cz

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	3.96184583	0.36016780	27.80	<.0001
Error	12	0.15545000	0.01295417		
Corrected Total	23	4.11729583			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Cz Mean
0.962245	5.682532	0.113816	2.002917

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Cz

Minimum Significant Difference 0.1518
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Apiario
A	2.24375	8	Pantanal
A			
A	2.10750	8	MRedondo
B	1.65750	8	Local

Anexo 6. Análisis de varianza y separación de medias del índice de oxidación.

The GLM Procedure

Dependent Variable: Indox

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	35980.16865	3270.92442	460.66	<.0001
Error	12	85.20625	7.10052		
Corrected Total	23	36065.37490			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Indox Mean
0.997637	11.56566	2.664680	23.03958

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Indox

Minimum Significant Difference 3.5544
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	apiario
A	40.663	8	MRedondo
B	26.975	8	Pantanal
C	1.481	8	Local

Anexo 7. Análisis de varianza y separación de medias del contenido de fenoles totales.

The GLM Procedure

Dependent Variable: Fen

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	309.13258	28.1029621	Inf	<.0001
Error	12	0.0000000	0.0000000		
Corrected Total	23	309.13258			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Fen Mean
1.000000	0	0	5.835833

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Fen

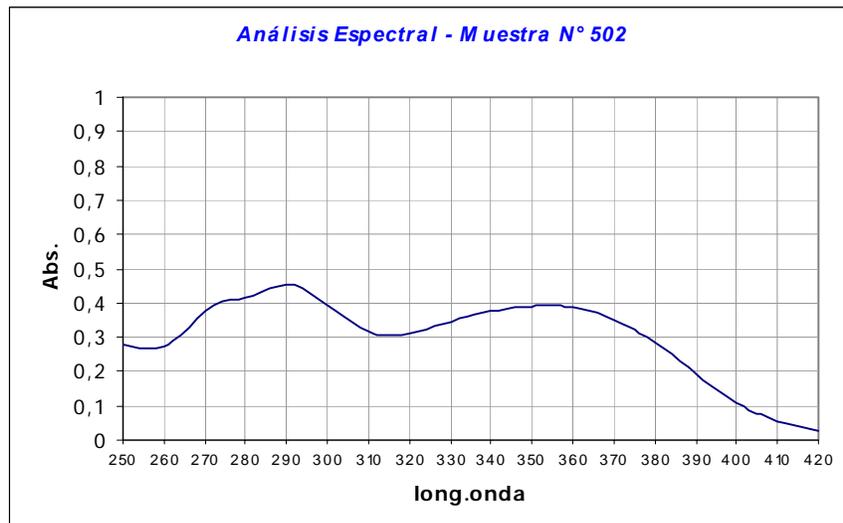
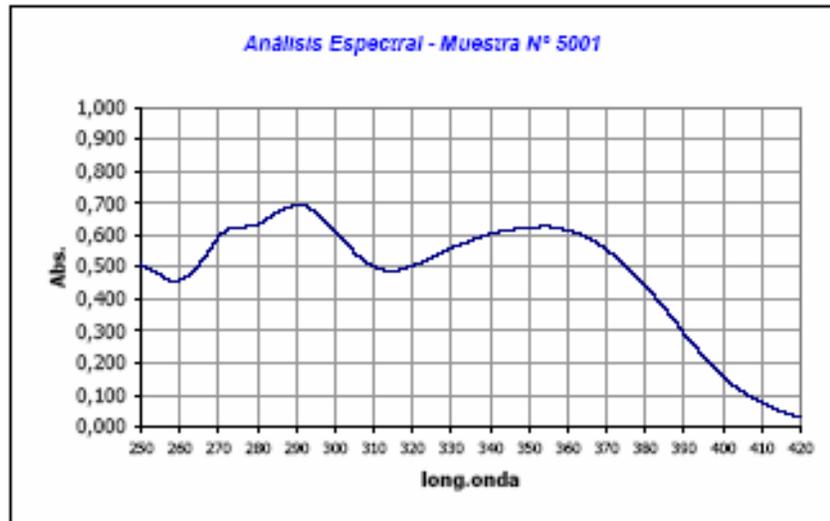
Minimum Significant Difference 0
Means with the same letter are not significantly different.

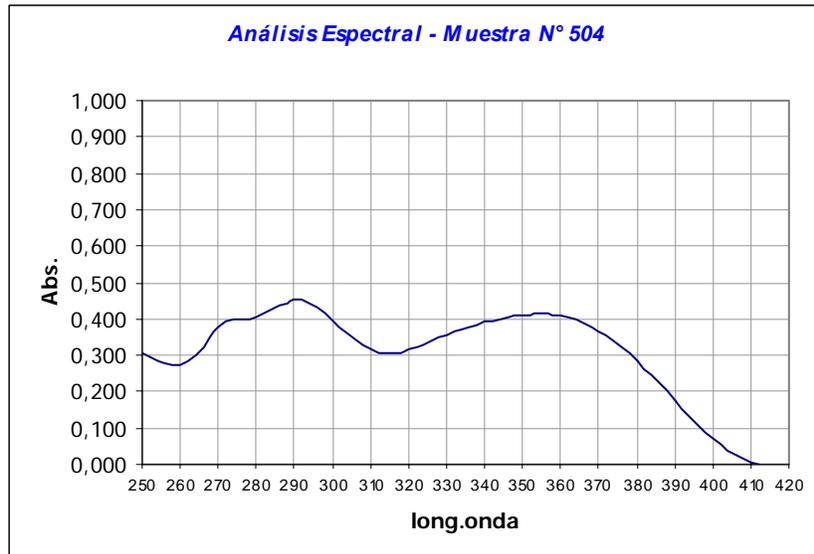
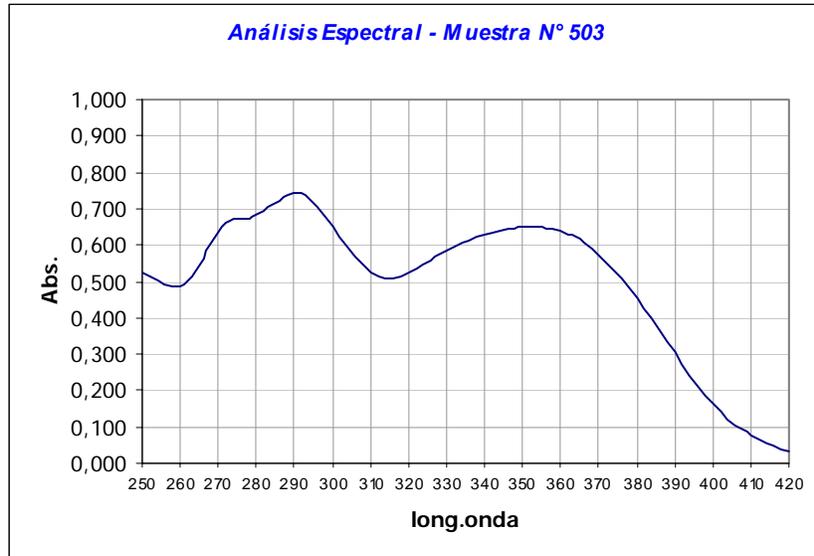
Tukey Grouping	Mean	N	Apiario
A	7.623	8	Local
B	7.295	8	Pantanal
C	2.590	8	MRedondo

Anexo 8. Análisis de varianza y separación de medias del contenido de flavonoides totales.

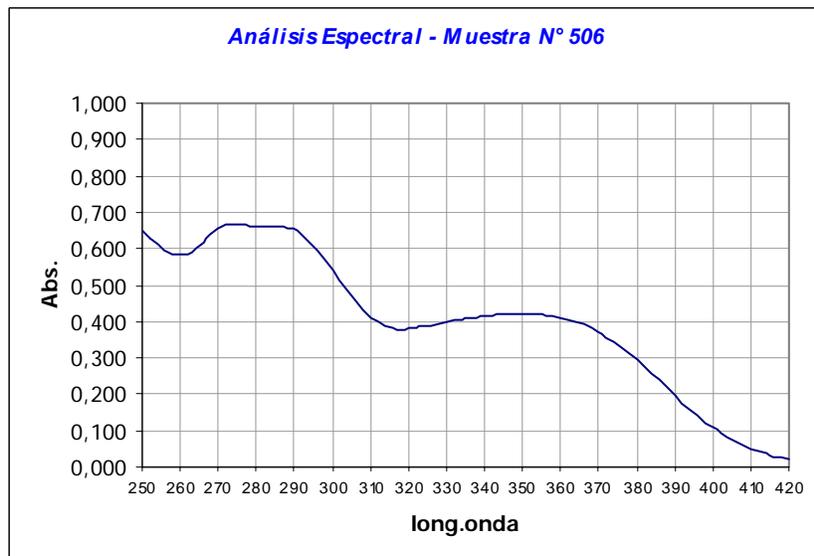
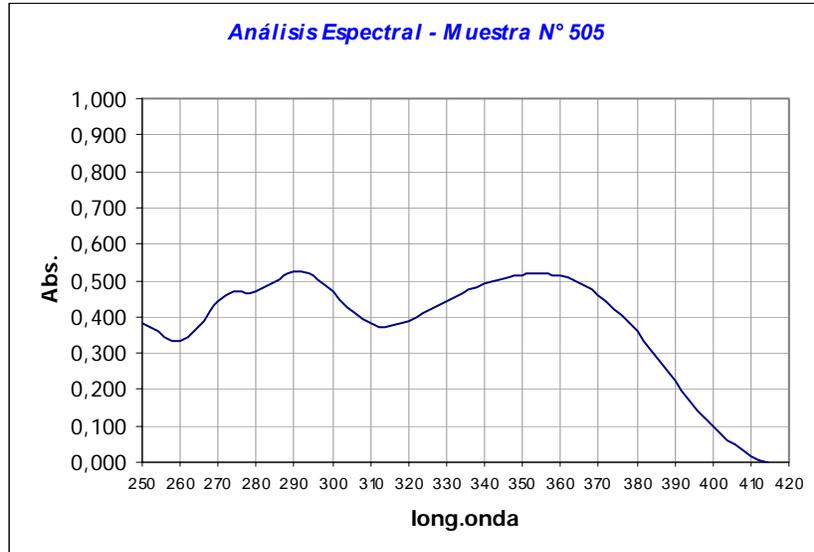
The GLM Procedure					
Dependent Variable: Flav					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	166.6349333	15.1486303	245.45	<.0001
Error	12	0.7406000	0.0617167		
Corrected Total	23	167.3755333			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Flav Mean	
	0.995575	6.221078	0.248428	3.993333	

The GLM Procedure				
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Flav				
Minimum Significant Difference				0.3314
Means with the same letter are not significantly different.				
Tukey Grouping	Mean	N	Apiario	
A	5.1300	8	Local	
A				
A	5.1100	8	Pantanal	
B	1.7400	8	MRedondo	

Anexo 9. Espectros de absorción UV visible del propóleo en el Apiario Local (a).

Anexo 10. Espectros de absorción UV visible del propóleo en el Apiario Local (b).

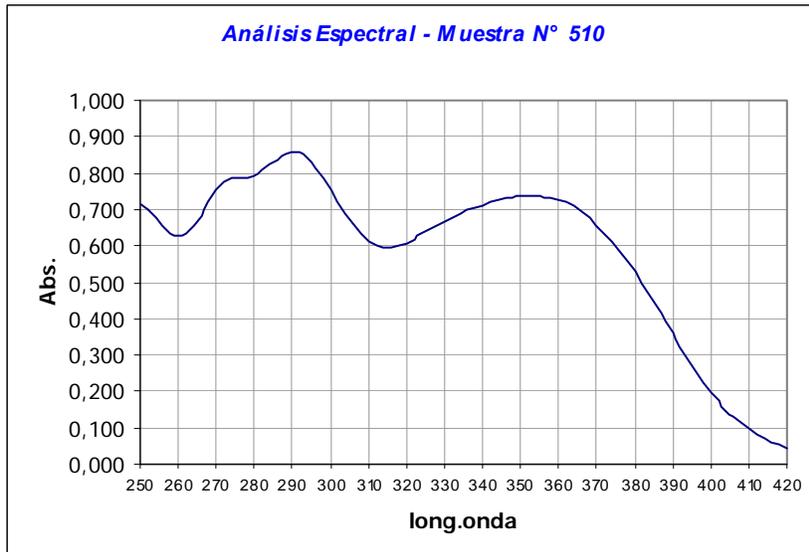
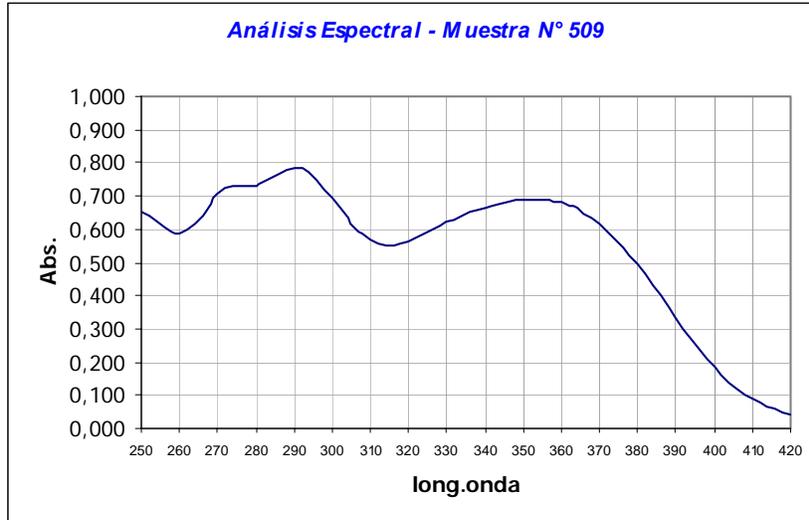
Anexo 11. Espectros de absorción UV visible del propóleo en el Apiario de Monte Redondo (a).



Anexo 12. Espectros de absorción UV visible del propóleo en el Apiario de Monte Redondo (b).



Anexo 13. Espectros de absorción UV visible del propóleo en el Apiario de Pantanal (a).



Anexo 14. Espectros de absorción UV visible del propóleo en el Apiario de Pantanal (b).

