



APROVECHAMIENTO DE PROPÓLEOS ANTIOQUEÑOS

CRITERIOS DE CALIDAD Y PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN



APROVECHAMIENTO DE PROPÓLEOS ANTIOQUEÑOS CRITERIOS DE CALIDAD Y PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN

Autores

Juan Camilo Barrientos Lezcano
Santiago Builes Toro
Luz Deisy Marin Palacio

Diseño gráfico

Santiago Arango Flórez

Este producto fue desarrollado con recursos provenientes del FONDO CIENCIAS TECNOLOGIA E INNOVACIÓN DEL SISTEMA GENERAL DE REGALIAS DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA

Medellín, 2021



I. Conozcamos el propóleo.....	7
Definición y función natural.....	7
Usos.....	8
Justificación de su comercialización.....	10



II. Buenas prácticas de recolección.....	11
¿Qué son las buenas prácticas de recolección?.....	11
Cosecha.....	12
Recolecta y transporte.....	13
Almacenamiento.....	14



III. Criterios de calidad.....	16
Contexto internacional.....	16
Medición.....	17
Humedad.....	17
Cenizas.....	18
Material insoluble.....	19
Ceras.....	20
Material soluble.....	22
Índice de oxidación.....	23
Barrido espectral.....	24
Medición de fenoles	25
Medición de flavonoides.....	25



IV. Protocolo de extracción.....	27
V. Referencias bibliográficas.....	30



Tabla 1. Ejemplo de registro en la recolección de propóleos.....	13
--	----



AGRADECIMIENTOS



Los autores desean expresar su agradecimiento a la Gobernación de Antioquia y al Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación.

Los protocolos presentados en este documento han sido desarrollados como parte de la investigación titulada “Generación de valor agregado de propóleos, en la cadena productiva apícola antioqueña”, estoy pendiente de verificar este convenio N°.80740-005-2019 de 2019. La elaboración de los protocolos ha sido posible gracias al la Gobernación de Antioquia, al respaldo del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación y a la participación de asociaciones apícolas de Antioquia como DAPPCE de San Rafael, Campo dulce del Bagre, Miel del Bosque tropical de Necoclí y a la asociación de apicultores de Salgar. De igual manera, agradecemos el acompañamiento recibido por parte de los miembros de la Universidad EAFIT y la Universidad CES.





INTRODUCCIÓN



Esta cartilla, denominada **APROVECHAMIENTO DE PROPÓLEOS ANTIOQUEÑOS. Criterios de calidad y protocolos de extracción**, está dirigida específicamente a los apicultores de la región antioqueña, y tiene como objetivo mejorar los procesos de recolección y extracción de propóleo en las comunidades apícolas.

Lo anterior, basados en la premisa de que, para ser competitivos, es necesario estandarizar los procesos de beneficio y transformación, de modo que se pueda asegurar la calidad final de los productos.

Esta cartilla le entrega al apicultor una herramienta para adquirir un mayor conocimiento sobre los beneficios, extracciones y criterios de caracterización fisicoquímicas de los propóleos. De esta manera, podrá aumentar el control en la recolección, transporte, almacenamiento y extracción, que le permitirá identificar la variabilidad y la calidad de los resultados y tomar acciones correctivas al revisar sus procesos y cómo mejorarlos continuamente.



1.1. Definición y función natural

El propóleo es un producto que elaboran las abejas recolectando los exudados presentes en tallos y hojas de diferentes plantas, empleándolo para la construcción, adaptación y modificación de sus panales (Dos Santos, et al., 2003). Cada especie de abeja tiene la capacidad de producir un propóleo con características fisicoquímicas diferentes, pero en la actualidad el de mayor relevancia comercial es elaborado por la especie *Apis mellifera* (Viloria, et al., 2012).

Barrera ambiental



Sellante de colmena



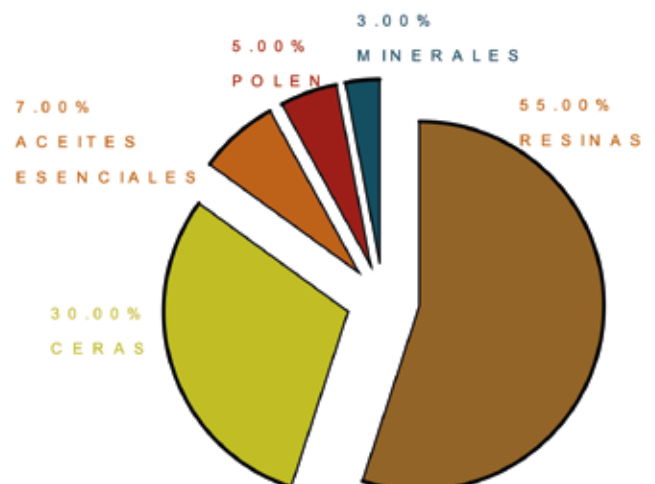
Defensa química

La palabra propóleo proviene de la palabra griega: propolis - pro, a favor o en defensa, y polis, ciudad (Tohamy, et al., 2014), y se define como una mezcla de resinas exudados vegetales que son recolectados y procesados por las abejas con el objetivo de realizar un sellamiento hermético de la colmena (Herrera, Calvo y Peña, 2019).

Mediante este proceso buscan impedir que cualquier tipo de contaminación ingrese al panal, dado que el propóleo, es considerado un antimicrobiano, antifúngico, antiviral y antiparasitario (Banskota, Tezuka y Kadota, 2001).

Se debe resaltar que “la composición del propóleo depende de la flora circundante al sitio de recolección” (Viloria, Gil, Durango y García, 2012), además, depende de el tipo de abeja que realiza la producción. El propóleo más estudiado ha sido el elaborado por la especie *Apis mellifera*, el cual se

encuentra conformado en un 55% por resinas o bálsamos, un 30% de ceras excretadas por abejas, cerca de un 7% de aceites esenciales, 5% de polen y un 3% correspondiente a materiales variados (Huang, Zhang, Wang, Q Li y Fu -Liang, 2014).



Composición propóleo



1.2. Usos

El origen del uso del propóleo se remonta a la antigua Grecia desde el 300 a.c., donde se empleaba este producto como uno de los ingredientes principales para la elaboración de una colonia (perfume) a la cual se le adicionaban hierbas aromáticas. Los egipcios, además lo aplicaban para preservar sus cadáveres de la descomposición y curar heridas (Zabaiou, et al. , 2017). Este producto también era empleado por los árabes para realizar el mantenimiento de diferentes equipos y superficies, ya que conocían el poder que tenía como lubricante (Bogdanov y Bankova, 2016).

El propóleo cuenta con una gran cantidad de beneficios debido a la actividad biológica que posee, una de las principales aplicaciones actuales se encuentra en la industria cosmética al generar grandes beneficios para la piel; cuenta con una excelente actividad antioxidante, evitando el daño de la piel y el agrietamiento de la misma, gracias a su actividad antimicrobiana permite realizar el tratamiento del acné, tiene la capacidad de realizar la absorción de los rayos UV, además de acelerar los procesos de re -epitelización (Valero, Gomes, Baretto y Moraes, 2020). Se ha reportado su uso para el tratamiento de heridas, quemaduras, dolores de garganta y úlceras estomacales (Bankova, 2005), siendo empleado en aplicaciones de alto interés médico como tratamientos anticancerígenos (Mora, et al., 2019).

Históricamente el propóleo ha tenido otro tipo de

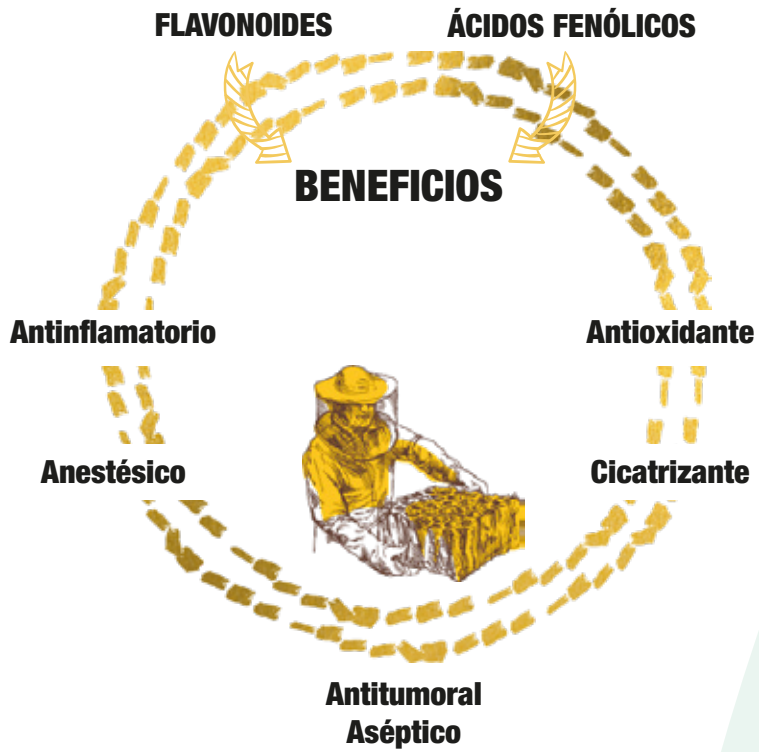
usos, como lo describen Bogdanov y Bankova (2016), desde la antigüedad ha sido empleado en la elaboración de barnices para la madera. Estos autores afirman que el propóleo es quizás el preservante más empleado en la conservación de la madera, afirmando que las pinturas con las que son recubiertas los violines de Stradivarius tienen dentro de su composición esta sustancia.

El mercado de este producto es promisorio, grandes potencias se enfocan en países de América del Sur para adquirirlo como producto o materia prima para elaboración de fármacos o cosméticos, ya que la gran variedad de flora que se encuentra en países como Brasil y Colombia, permiten que las abejas generen un producto de mayor calidad y potencial industrial.

1. Conozcamos el propóleo



1.2. Aplicaciones



Más de 300 compuestos químicos se han descrito en los propóleos de diversos orígenes.

APLICACIONES INDUSTRIALES DEL PROPÓLEO





1.3. Justificación de su comercialización

El propóleo en el ámbito nacional es un producto escaso en el comercio, por un lado al ser considerado por los apicultores como un subproducto de la extracción de la miel, por otro lado el desconocimiento que se presenta de forma general en la sociedad de sus beneficios y las características propias de esta resina natural (López-Patiño, 2011)

Sin embargo, el propóleo ha sido reconocido y usado internacionalmente como un producto medicinal natural. La incorporación del propóleo dentro del portafolio de los productos apícolas campesinos colombianos, mejoraría la economía de las familias involucradas, además de generar empleo mediante el comercio de esta sustancia nivel local y regional, igualmente se tendría un impacto en los consumidores, mejorando la calidad de vida de los mismos gracias a las aplicaciones cotidianas del propóleo en temáticas de salud.

De ahí la importancia de conocer los condicionantes biológicos y de producción que mejoran la calidad del propóleo y de estandarizar y cuantificar dichas fracciones que son fundamentales en dicha calidad. Igualmente, es importante porque se empiezan a sentar las bases objetivas para un sistema de categorización del producto.

2. Buenas practicas de recolección



2.1. ¿Qué son las buenas prácticas de recolección?

Son actividades sencillas que aseguran una buena calidad de los propóleos que se recolectan. Estas actividades comprenden la cosecha en los apiarios, el transporte y almacenamiento para conservarlos.

La *calidad* del propóleo se refiere a mantener su pureza y características propias con la presencia mínima de contaminantes biológicos e inertes externos.

2.2. ¿Qué se necesita?

Además del equipo apicultor de protección y del cuidado de las abejas, para la recolección de propóleo es necesario:

1 Malla recolectora de propóleo. Debido a su facilidad para recolectar los propóleos. Poseen un espaciamiento de 1.6 mm y 928 ranuras.

2 Bolsas de plástico negra. Evita el contacto con el suelo y otros elementos que se podrían impregnar a la malla y también el contacto directo con la luz ya que los compuestos químicos de interés en los propóleos son fotosensibles, (es decir, se degradan bajo la presencia de luz).

3 Congelador a temperaturas menores de 4°C. El propóleo se debe conservar en frío para mantener sus propiedades un mayor tiempo, además al solidificarse, se desprenden de la malla mas fácilmente.

4 Etiquetado. Es necesario realizar un seguimiento y control de la producción conociendo su procedencia, fecha, y propiedades.

5 Molino de Café o Pica todo. Para aumentar área superficial y mejorar la transferencia de masa en las extracciones.





2.3. En la Cosecha:

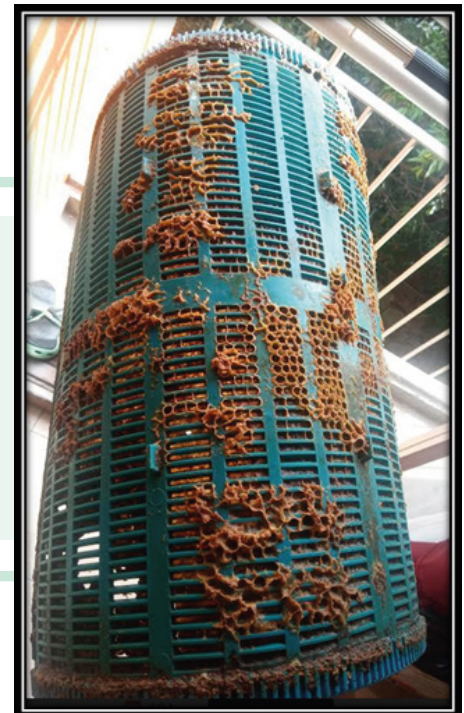
El proceso de cosecha más limpio es el uso de mallas o trampas de propóleo, debido a la reducción de impurezas externas. Estas mallas se colocan entre los cuadros y la entretapa para que las abejas llenen los intersticios de las mallas con el propóleo. Se debe tener la precaución de tener las mallas limpias y evitar contacto con residuos o contaminantes externos.

La cantidad y la calidad del propóleo recolectado variará fuertemente dependiendo de la fortaleza de la colonia, su genética y condiciones ambientales. (Butler, 1949; Wilson, Brinkman, Spivak, Gardner, & Cohen, 2015).

En condiciones ambientales óptimas, una colonia puede llenar completamente una trampa de propóleos en un par de semanas. (Manrique & Soares, 2002).



Sin embargo, algunas colonias nunca sellarán las ranuras completamente o usarán principalmente cera para sellarlas, esto es debido múltiples causas, como por ejemplo: genética de las abejas, la salud de la colmena, el clima o la accesibilidad floral (Nicodemo, Malheiros, De Jong, & Couto, 2014).



2. Buenas practicas de recolección



2.4. En la Recolección y transporte:

Es necesario empacar directamente del cajón a la bolsa negra sin apoyar la malla en el suelo y asegurar la bolsa para evitar pérdidas.

Se debe revisar la salud de la colmena y el clima presente, para colocar una malla limpia y seguir recolectando propóleo.

Se debe etiquetar la bolsa para realizar control de la producción de las colmenas y llenar formatos de registro como se muestra en la tabla 1.



Tabla 1. Ejemplo de registro en la recolección de propóleos

MUNICIPIO:	NOMBRE APIARIO:	VEREDA:	APICULTOR(a):		
Número de la colmena:	Fecha de la colocación de la malla en la colmena:	Fecha de retiro de la malla	Color del propóleo	Cantidad del propóleo	Altitud
1					
2					

2. Buenas practicas de recolección



2.5. En el Almacenamiento:

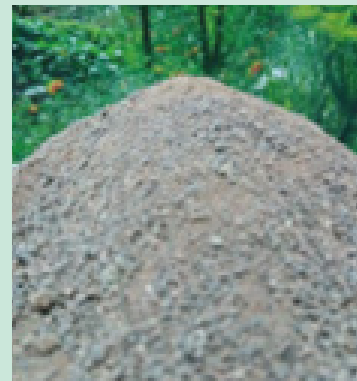
Es necesario mantener las mallas en temperaturas de congelación por mínimo 3 horas, esto causa que los propóleos estén duros y quebradizos para retirar de la malla.

Luego con pequeños golpes a la malla y con ayuda de un raspador, retirar los propóleos y ubicarlos en una bolsa debidamente etiquetada registrando peso recogido. Seguidamente, se mantienen en congelamiento.



2.6. En la trituración:

Con el objetivo de obtener una extracción exitosa de compuestos bioactivos, se debe reducir el tamaño de los propóleos almacenados y aumentar su área superficial. Es necesario tener en cuenta que la trituración de propóleos se debe realizar en frío, es decir, manteniendo el propóleo a bajas temperaturas para evitar aglomeración y estancamiento en los ejes de las cuchillas del equipo ya que los propóleos poseen una naturaleza resinosa y pegajosa.





2.7. Paso a paso en el manejo de propóleos

- 1** Ubicar la trampa de propóleos encima del marco superior de la colonia y cúbralo con una tapa de colonia convencional.
- 2** Separar las mallas propolizadas de las colmenas.
- 3** Empacar las mallas en bolsas plásticas que las proteja de la luz directa.
- 4** Congelar las mallas empacadas mínimo durante 3 horas.
- 5** Separar los propóleos de las mallas.
- 6** Trituración en frío de los propóleos.
- 7** Almacenamiento de propóleos triturados en congelación.

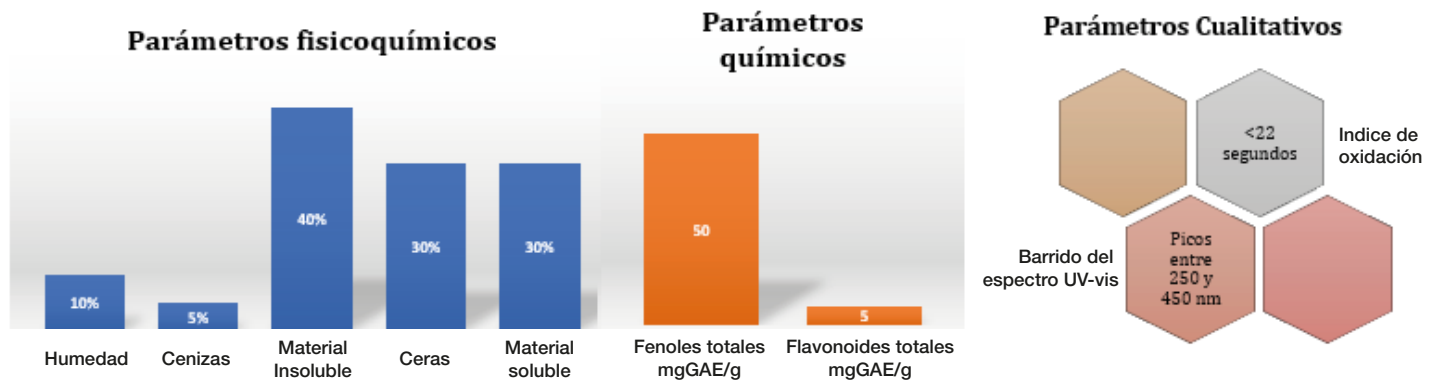




3.1. Contexto internacional

Los criterios de calidad representan una caracterización fisicoquímica de los propóleos delimitando unos valores específicos para catalogar propóleos aptos para aprovechamiento y consumo. Estos parámetros permiten evaluar de forma indirecta la salud de la colmena, el manejo del propóleo (desde su cosecha y transporte, hasta su almacenamiento) y así como también la evaluación de productos adulterados.

En países latinoamericanos como Argentina, Brasil, México y Chile existen normas para la producción y el procesamiento de propóleos. Esta normatividad busca estandarizar y generar unos parámetros cuantificables que den cuenta de la calidad del propóleo la recolección y procesamiento de propóleos para garantizar sus características y propiedades físicas, químicas y biológicas, y para las propiedades que contemplan dichas normatividades son: contenido de humedad, ceras, cenizas, material soluble e insoluble, barrido del espectro UV-vis, índice de oxidación y cuantificación de fenoles y fomentan la competitividad del sector apícola en los mercados nacionales e internacionales.



3. Criterios de calidad



3.2. Medición

Para la cuantificación de estos parámetros fisicoquímicos son necesarios protocolos de higiene y asepsia haciendo uso de guantes, batas y puestos de trabajo limpios para evitar contaminación o interferencias en los métodos propuestos por las normas internacionales.

Los equipos de laboratorio necesarios son: mufla, horno, nevera, agitador, baño ultrasonido, centrifuga, espectrofotómetro, desecador y balanza.

A continuación se presenta en detalle cada uno de estos parámetros:

3.2.1 Humedad

Este parámetro analiza el contenido de agua presente en el propóleo y deben tener un valor máximo de 10% según las normas internacionales.

Representa la exposición del propóleo al ambiente externo y la cantidad de agua que puede estar alojada en la matriz.

La humedad excesiva es un indicativo de mala calidad, y es debido al almacenamiento inadecuado y pobres condiciones de manipulación, y puede favorecer el desarrollo de hongos en la superficie los cuales se manifiestan en forma de capas blancas y verdosas y pueden generar toxinas.

Protocolo de medición de humedad en propóleos

1. Pesar 5 gramos de propóleo triturado y congelado (2.7) y se registra como peso muestra.

2. Secar a en horno de secado a 105°C por 5 horas.

3. Registrar el peso final y aplicar la ecuación 1.

4. Registrar peso final.
5. Calcular % Humedad.



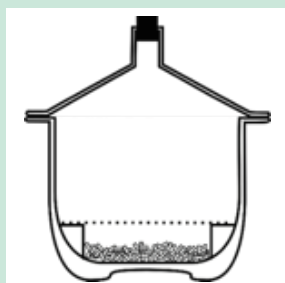
PROPÓLEO



BALANZA ANALÍTICA



HORNO DE SECADO



DESECADOR



$$\text{Ecuación 1. } \% \text{Humedad} = \frac{(\text{Peso muestra} - \text{Peso seco})}{\text{Peso muestra}} * 100\%$$

3. Criterios de calidad

3.2.2. Cenizas



Este parámetro analiza el contenido de material inorgánico presente en los propóleos y no debe ser mayor de 5%.

La determinación de cenizas está asociada con las propiedades terapéuticas del producto. Las posibles causas del exceso de ceniza son la presencia de impurezas como tierra, piedras, arena, que se adquieren por la mala manipulación en la colecta y transporte de los propóleos o también, como propóleo adulterado con gravillas.

Protocolo de medición de cenizas en propóleos

- 1 Colocar el crisol en la mufla a 550 °C durante 1 hora para asegurarse de que las impurezas en la superficie del crisol se quemen.
- 2 Pesar 2.5g de propóleo (peso muestra) en el crisol (peso crisol) y taparlo.
- 3 Calentar en una mufla a 550°C durante 3 horas.
- 4 Revisar que la muestra torne de color gris. Si no cambia su coloración ingresar a la mufla para continuar produciendo ceniza.
- 5 Enfriar el crisol en un desecador.
- 6 Pesa la ceniza con el crisol y registrar el peso de final del crisol y la ceniza.
- 7 Aplicar la ecuación 2.



Ecuación 2.

$$\%Ceniza = \frac{(Peso\ final - Peso\ crisol)}{Peso\ muestra} * 100\%$$



3.2.3. Materia Insoluble

Este parámetro analiza el contenido de material apolar no soluble en etanol y no debe exceder el 40%.

El material insoluble es una de las características no deseadas en el propóleo y es referido a toda la fracción no extractable en etanol. Un elevado contenido de este parámetro disminuye la calidad ya que representa material orgánico e inorgánico de no interés en la extracción. Mayores cantidades de materiales insolubles de lo habitual puede deberse principalmente a una mala manipulación desde la recolección hasta el almacenamiento, una adulteración, o poca accesibilidad floral.

Protocolo de medición de material insoluble

1

Agregar 1 g de propóleo (peso muestra) a 100 ml de etanol.

2

Extraer mediante agitación por 24 horas o por ultrasonido por 30 minutos.

3

Filtrar para separar el extracto y residuo en un papel filtro previamente pesado (Peso del filtro).

4

Calentar el papel filtro con el residuo a 60°C durante 3 horas.

5

Desecar el papel filtro 30 minutos.

6

Pesar el residuo en el papel filtro (peso final) y aplicar la ecuación 3.



Ecuación 3.

$$\%Material\ Insoluble = \frac{(Peso\ final - Peso\ filtro)}{Peso\ muestra} * 100\%$$



3.2.4. Ceras

Este parámetro analiza el contenido de material inerte soluble en etanol y debe tener un contenido máximo de 30%.

Un aumento del contenido de ceras podría ser asociado a una baja calidad, debido a que las sustancias que conforman esta fracción corresponden a compuestos de naturaleza no polar, a los cuales no se les ha atribuido una actividad biológica y se les consideran inertes. El exceso de ceras puede ser resultado de la época del año en que se recolectó el propóleo ya que, en verano, las abejas durante el proceso del propóleo mezclan las resinas con ceras por la escasez de fuentes de exudados aunque también puede deberse a una mala manipulación del producto por parte del apicultor en la recolección. El contenido de ceras se puede determinar por dos tipos de pruebas.

3.2.4.a Protocolo de medición de ceras por enfriamiento

1 Recolectar extracto realizado para material insoluble (3.2.3.) y enfriar a 4°C por 24 horas. Hay que recordar que el peso de la muestra es de 1 gramos de propóleo.

2.1 Filtración

- i. Filtrar el extracto en un papel filtro previamente pesado (peso recipiente/filtro)
- ii. Secar el papel filtro con el retenido a por 3 horas.
- iii. Desecar a temperatura ambiente y registrar el peso (peso de retenido).
- iv. Aplicar la ecuación 4.



2.2 Centrifugación

- i. Colocar el extracto en tubos para centrifuga previamente pesados (peso recipiente /filtro)
- ii. Centrifugar 4500 rpm por 10 minutos.
- iii. Secar el precipitado en los tubos de centrifuga en horno a 60°C hasta por 5 horas.
- iv. Desecar a temperatura ambiente y registrar el peso (peso de final).



Ecuación 4.

$$\%Ceras = \frac{(\text{Peso final} - \text{Peso recipiente ó filtro})}{\text{Peso muestra}} * 100\%$$



3.2.4.b Protocolo de medición de ceras por calentamiento

1

Añadir 25ml de agua desionizada a 2g de propóleo en polvo (peso muestra) en un tubo con tapón de rosca. Es necesario mezclar constante y cuidadosamente para evitar la flotación del propóleo en la superficie.

2

Cerrar la tapa sin apretar para evitar la acumulación de presión mientras se calienta y se debe colocar los tubos verticalmente en un aparato de microondas doméstico.

3

Ajustar el tiempo de calentamiento sin llevar a ebullición la fase de agua (1min).

4

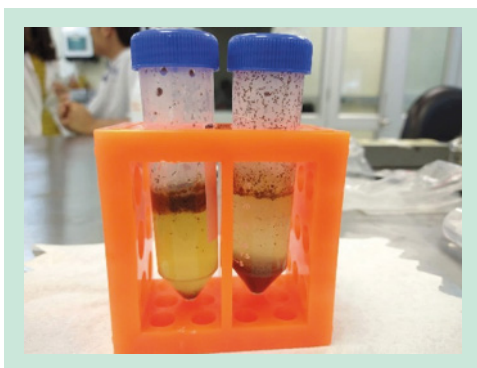
Enfriar la muestra a temperatura ambiente. Se forma un sistema de 3 capas en el tubo: La cera (superior), agua (medio), y el propóleo desparafinado (fondo).

5

Con una espátula de acero inoxidable, transferir la cera de la capa superior a un papel filtro previamente pesado (Peso filtro) para la eliminación del agua restante.

6

Pesar la cantidad de cera extraída (Peso final) y calcular el contenido de cera como un porcentaje del peso de la muestra original de acuerdo con la ecuación 5.



Ecuación 5.

$$\%Ceras = \frac{(Peso\ final - Peso\ filtro)}{Peso\ muestra} * 100\%$$



3.2.5. Protocolo de medición de material soluble

Este parámetro analiza el contenido de material soluble en etanol y debe tener un valor mínimo de 30%.

Este parámetro representa el material que es extraído del propóleo, (excluyendo las ceras que representa el material inerte soluble también en etanol) en el cual se encuentran los compuestos químicos de interés. Cuanto mayor sea su valor, mejor será en términos de rendimientos de extracción y en la calidad del producto final, ya que allí se encuentran los compuestos con actividad biológica. por lo que al tener un valor pequeño se puede inferir problemas en la accesibilidad floral de las abejas.

1 Realizar extracción descrita en Material insoluble (3.2.3.), remover las ceras (3.2.4.a) y recolectar extracto. Recordando que el volumen total del extracto es de 100ml.

2.1 Para el uso de Rotaevaporador.

- Tomar 10ml de extracto (volumen tomado) en un matraz de 50ml previamente pesado (peso recipiente).
- Concentrar a una temperatura de 45°C, -50 mbar,
- Medir el peso final del matraz con el extracto concentrado resultante (peso concentrado).



2.2 Para el uso de Centrifuga a vacío.

- Tomar 1ml de extracto (volumen tomado) en un tubo eppendorf previamente pesado (peso recipiente).
- Concentrar a 45°C a vacío hasta peso constante.
- Medir el peso final del eppendorf con el extracto concentrado resultante (peso concentrado).



3 Aplicar la ecuación 6.

Ecuación 6.

$$\% M. soluble = \frac{(\text{Peso concentrado} - \text{Peso recipiente})}{\text{Peso muestra}} * \frac{\text{Volumen total extracto}}{\text{Volumen tomado}} * 100\%$$



3.2.6. Índice de oxidación

Este parámetro analiza la capacidad oxidativa de los propóleos. El índice de oxidación o la capacidad oxidativa se mide en el tiempo tomado por el extracto de propóleo en decolorar un compuesto violeta, el Permanganato de Potasio (KMnO_4).

Este potencial oxidativo se le ha atribuido a los compuestos fenólicos y flavonoides, así propóleos con altos índices de estos compuestos y un buen manejo, presentan altos índices de oxidación (tiempo de reacción rápido), mientras que propóleos almacenados inadecuadamente presentan bajos índices de oxidación (tiempo de decoloración lento). Se estableció en las normas internacionales que es deseable tiempos de decoloración del permanganato de Potasio (KMnO_4) menores de 22 segundos.

Protocolo de medición del índice de oxidación

1

Tomar 2g de propóleo crudo y mezclar con 3 ml de etanol al 96% por 24 horas en agitación y oscuridad.

2

Separar el extracto (sobrenadante) del residuo (precipitado) por centrifugación.

3

Almacenar en frío a 4°C por 24 horas para separar ceras.

4

Adicionar 1ml del extracto a 24mL de agua Desionizada.

5

Transferir 0.5mL de esta solución a un tubo de prueba y adicionar 0.5mL de agua desionizada y 1mL de ácido sulfúrico.

6

Agitar la mezcla por 1 minuto.

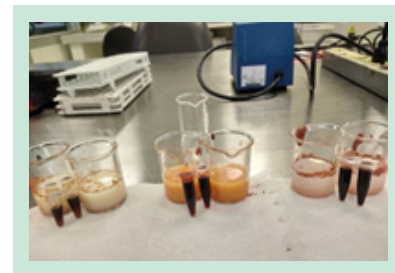
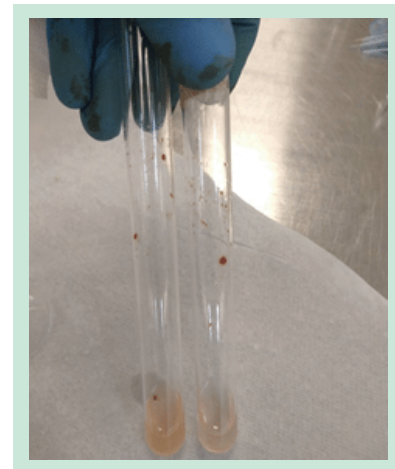
7

Adicionar 50 μL de Permanganato de potasio 0.1N.

8

Cronometrar el tiempo que el color violeta del permanganato desaparece.

23





3.2.7. Barrido espectral

Este parámetro analiza el contenido químico de manera cualitativa por medio de los picos que presenta en determinadas zonas del espectro UV visible. Deben ser observables picos entre 280-400nm

La ausencia de picos en las longitudes de bandas mencionadas infieren que no tiene presencia de los compuestos químicos de interés (fenoles y flavonoides).

Protocolo de medición del Barrido espectral

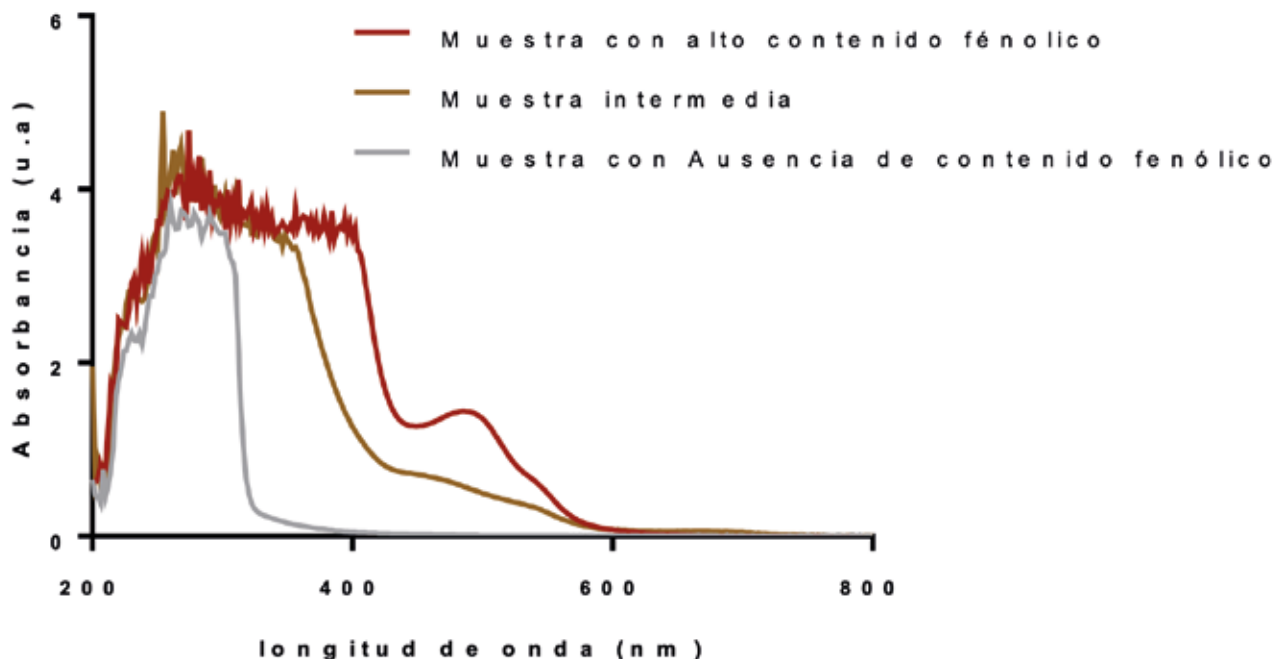


1

Tomar 10 μ L de los extractos recogidos y adicionar 990 μ L de etanol al 96%.

2

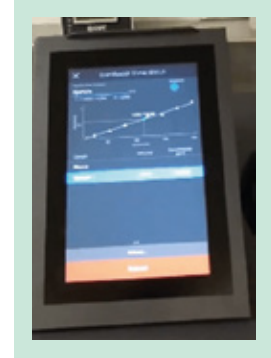
Analizar el barrido en un equipo espectrofotométrico en longitud de onda desde 200 hasta 600nm.





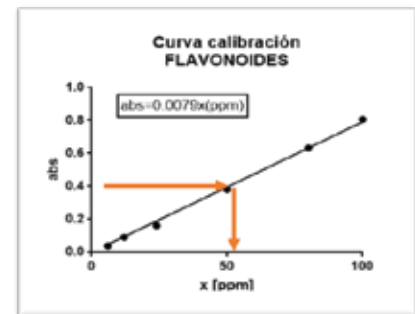
3.2.8. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides

Este parámetro cuantifica el contenido de fenoles y flavonoides presente en los extractos de propóleos, con base de estándares químicos y por absorción de luz a una determinada longitud de onda. Según las normas internacionales el contenido mínimo es de 50mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por gramo de propóleo para fenoles y 5mg de equivalente de quercetina (QE) por gramo de propóleo para flavonoides.



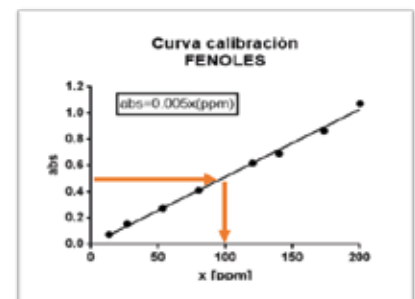
Medición Fenoles

- 1 Tomar 150µl de extracto de propóleo en un tubo de ensayo y adicionar 2400µl de agua destilada.
- 2 Agregar 150µl de reactivo de Folin Ciocalteau 1N, agitar y dejar reposar por 3 minutos.
- 3 Adicionar a la mezcla 300µl de carbonato de calcio 1N y dejar reposar en oscuridad por 60 minutos.
- 4 Leer absorbancia a 725nm.
- 5 Usar ácido gálico como estándar químico y construir una curva de calibración a 10, 20, 40, 80, 120, 140, 180, 200ppm.



Medición Flavonoides

- 1 Tomar 500µl de extracto de propóleo en un tubo de ensayo y adicionar 4300µl de metanol.
- 2 Agregar 100µl de reactivo de cloruro de aluminio al 10% y agitar.
- 3 Adicionar a la mezcla 100µl de acetato de potasio al 10% y agitar.
- 4 Leer absorbancia a 415nm.
- 5 Usar quercetina como estándar químico y construir una curva de calibración a 6, 12, 24, 50, 80, 100ppm.





3.2.8. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides

Las mediciones obtenidas tienen unidades de ppm o partes por millón (ecuaciones 7 y 8), y se definen como miligramo del componente químico por litro de la solución y al multiplicar este valor el volumen del extracto y dividir por la cantidad de propóleo que se usó en la extracción, se obtiene el contenido químico en miligramos por gramo de propóleo.

Para los fenoles las unidades se expresan mg GAE/g y para flavonoides mg QE/g debido a que fueron los estándares respectivamente usados para las mediciones. Con estos valores puedes entender de que tan buena es la calidad de tus propóleos y extractos para su aprovechamiento.

Ecuación 7.

$$\text{Concentración [ppm]} = \frac{\text{miligramos soluto}}{\text{Litro de solución}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right]$$

Ecuación 8.

$$\text{Concentración [ppm]} * \text{Volumen total extracto [L]} * \frac{1}{\text{Propóleo [g]}} = \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right]$$

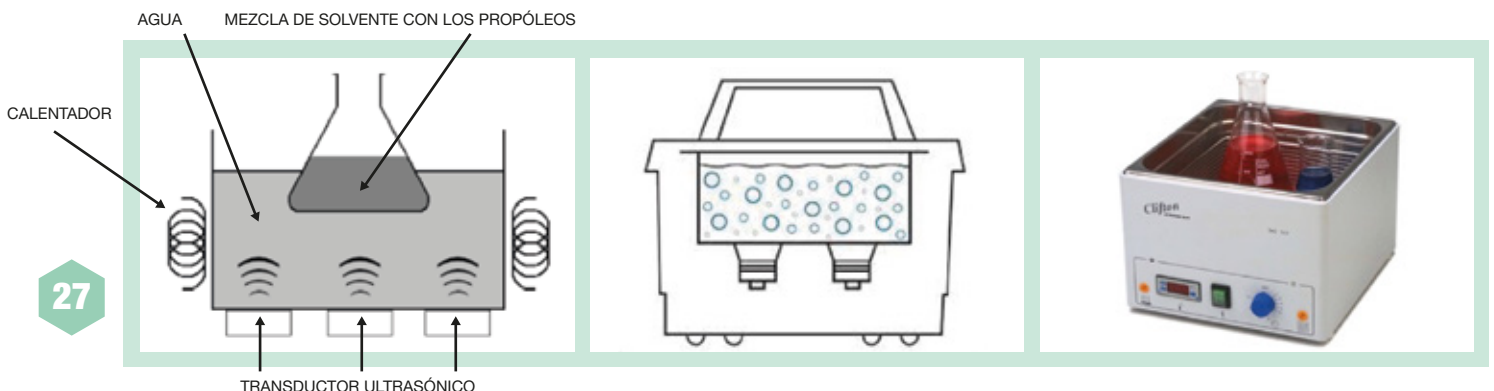
4. Protocolo de extracción

Este proceso se realiza tradicionalmente por una extracción sólido-líquido conocido como maceración, que consiste en: el contacto del material con un solvente, normalmente etanol en reposo para, extraer los compuestos químicos; una filtración para separar el residuo; y su almacenamiento. Sin embargo, por la alta variabilidad fisicoquímica de los propóleos, se han investigados innumerables procedimientos, que involucran diferentes tipos de solvente, tipos de extracción, tiempos de contacto, técnicas de separación, y concentración del producto para obtener diferentes presentaciones.



Una alternativa es la extracción asistida por ultrasonido que consiste en la ubicación la mezcla en el baño de agua del equipo, y con frecuencias mayores 20 kHz se generan ondas de ultrasonido que inducen cavitación, efectos térmicos y mecánicos en el medio de extracción que fragmenta el material biológico para mejorar la transferencia de masa sin producir cambios considerables en la estructura y propiedades de los compuestos de interés.

Todos estos efectos mejoran colectivamente la eficiencia de extracción y los rendimientos al disminuir los tiempos de extracción.



4. Protocolo de extracción

El siguiente es el protocolo de extracción de compuestos bioactivos estandarizado para propóleos colombianos:



0

Realizar pretratamiento descrito en el numeral 3 al propóleo crudo.



1

Tomar 3 gramos de propoleo crudo pulverizado y adicionar 300ml de etanol al 96% en un matraz de 500ml protegido de la luz.



Agitación / Ultrasonido



2

Agitar por 5 horas en una mesa de agitación en oscuridad a temperatura ambiente.



2

Depositar recipiente en baño ultrasonido por 30 minutos.



3

Filtrar para separar residuo y almacenar extracto en tubos de centrifuga a 4°C por mínimo 12 horas.



4

Centrifugar a 4500rpm por 10 minutos y separar sobrenadante de las ceras precipitadas.



5

Almacenar extractos a 4°C. Embotellar en recipientes ámbar.





Los propóleos son un producto de alto potencial comercial y medicinal por sus grandes propiedades químicas y biológicas, además, por su fácil proceso de extracción pueden ser añadidos a tu catálogo de productos apícolas ¡ánimate y empieza a extraer propóleo!

Hasta pronto.



Graikini, D.; Papachristoforou, A.; Mourtzinou, I. Comparison of Qualitative Characteristics of Propolis Extracts Using Different Purification Methods. *J. Apic. Res.*, 2019, 58 (5), 792–799. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1653813>.

Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts. *J. Food Compos. Anal.*, 2006, 19 (6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>.

Bag, G. C.; Grihanjali Devi, P.; Bhaigyaba, T. Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three Hedychium Species of Manipur Valley. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 2015, 30 (1), 154–159.

Bankova, V.; Bertelli, D.; Borba, R.; Conti, B. J.; da Silva Cunha, I. B.; Danert, C.; Eberlin, M. N.; I Falcão, S.; Isla, M. I.; Moreno, M. I. N.; et al. Standard Methods for Apis Mellifera Propolis Research. *J. Apic. Res.*, 2019, 58 (2), 1–49. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>.

Cunha, I. B. S.; Sawaya, A. C. H. F.; Caetano, F. M.; Shimizu, M. T.; Marcucci, M. C.; Drezza, F. T.; Povia, G. S.; Carvalho, P. D. O. Factors That Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2004, 15 (6), 964–970. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000600026>.

Horwitz, W. ; Chichilo, P. ; Reynolds, H. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists., 14th ed.; Horwitz, W.; Chichilo, P.; Reynolds, H., Ed.; WGaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997.: Washington, DC, 2010.

Sawaya, A. C. H. F.; da Silva Cunha, I. B.; Marcucci, M. C. Analytical Methods Applied to Diverse Types of Brazilian Propolis. *Chem. Cent. J.*, 2011, 1, 5–27. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-27>.

Herrera, M. G, Calvo, L. M y Peña, L. M. (2019). El propóleo y su potencial económico como producto de la industria apícola. Desde el Herbario 11. 190–194. Recuperado de https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2019/2019-09-26-Herrera-Calvo-Penia-El-propoleo-y-su-potencial.pdf

Dos Santos Pereira, A., Bicalho, B. y de Aquino Neto, F.R. (2003). Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie*. 34(3). 291-298. Recuperado de <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891783/document>

Viloria, J., Gil, J.H., Durango, D. L y García, C. M. (2012). Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del Bajo Cauca Antioqueño (Antioquia, Colombia). *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 10 (1). 77 – 86. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v10n1/v10n1a10.pdf>

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G.Q., Hu, F.L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*. 19(12). 19610–19632. doi:10.3390/molecules191219610. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25432012/>



APROVECHAMIENTO DE PROPÓLEOS ANTIOQUEÑOS
CRITERIOS DE CALIDAD Y PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN