

## **Criterios de calidad para el análisis de propóleos**

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

**Proyecto 1216-805-63102**

**Ejecutado por la Universidad CES y Universidad EAFIT**

**Con apoyo de Minciencias y Gobernación de Antioquia**

**2021**

## Criterios de calidad para el análisis de propóleos

Juan Camilo Barrientos Lezcano<sup>1</sup>, Luz Deisy Marín Palacio<sup>1</sup>, Santiago Builes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería de Procesos. Universidad EAFIT

El propóleo es una sustancia resinosa recolectada por las abejas de las yemas y exudados de varias plantas mezclado con enzimas de abeja, polen y cera (Sforcin, 2016), que las abejas usan para alisar las paredes internas de la colmena con el fin de protegerla de agentes extraños. Su composición química varía ampliamente con las condiciones geográficas y climáticas del sitio de recolección. El propóleo está compuesto principalmente de resina, cera, aceites esenciales, polen y en menor proporción de otros compuestos orgánicos (Gargouria., et al. 2019). Su color puede variar dependiendo del origen desde rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante (Pobiega., et al, 2019). En la Tabla 1 se presentan las principales características organolépticas presentes en el propóleo para los parámetros de aroma, color, sabor y consistencia.

Tabla 1. Características organolépticas que presentan los propóleos (DOF, 2017; SPRI y SAGPA 2008).

Parámetro	Característica
Aroma	Característico de este producto: resinoso o balsámico, según su origen botánico y/o geográfico.
Color	Amarillo, pardo, verdoso, rojizo, marrón y sus tonalidades, variando conforme a su origen botánico y/o geográfico.
Sabor	Variable, de suave y balsámico a fuerte y picante, según su origen botánico y/o geográfico.
Consistencia	Maleable o rígido, según su origen botánico y/o geográfico. Aspecto: Homogéneo o heterogéneo, de preferencia en trozos no comprimidos.

Los extractos de propóleo presentan actividades antimicrobianas y antioxidantes, que lo convierten en un ingrediente potencial para su uso en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Calavaro., et al. 2019). El propóleo y otros productos apícolas han ido ganando interés en consumidores y empresas gracias a sus propiedades y la creciente demanda por productos saludables y que proporcionen beneficios fisiológicos. Es por esto que con el fin de proteger tanto a los consumidores como a los productores es necesario establecer buenas prácticas de recolección y estándares de calidad para la comercialización de estos productos (Stan., et al. 2011).

El proceso de recolección es la primera etapa para la obtención de los extractos de propóleo y por eso se deben seguir una serie de precauciones durante la misma porque de ella depende en gran medida la calidad del producto obtenido. Para evitar la contaminación del propóleo en la etapa de recolección

es necesario que esta se realice con materiales libres de residuos, evitando durante la recolección la exposición a los rayos del sol. Adicionalmente, posterior a la recolección debe almacenarse el propóleo en un congelador (a una temperatura entre -10 °C y -20 °C) por lo menos durante una hora para que la resina se torne rígida y quebradiza para evitar la formación de conglomerados (DOF, 2017), y de esta manera no afectar la calidad del producto. Posteriormente se puede retirar del congelador, para almacenarlo en un lugar fresco y seco, protegiéndolo de la luz solar y las altas temperaturas.

La obtención de extractos del propóleo como producto apícola de origen vegetal es similar al de las plantas medicinales que se basa en la concentración de componentes biológicamente activos. Por la diversidad de composiciones que presentan los propóleos no existe un criterio químico único y uniforme para la estandarización y el control de calidad de estos productos. Los criterios de calidad se basan en la concentración de metabolitos secundarios bioactivos dependiendo del tipo de propóleo. De esta manera, la Comisión Internacional de la Miel sugiere los valores para la concentración de componentes biológicamente activos para los dos tipos de propóleos más extendidos, el propóleo de tipo álamo europeo y el propóleo verde brasileño (Bankova., et al. 2019). Los criterios específicos y los valores mínimos para algunas sustancias químicas presentes en los propóleos tipo álamo y verde brasileño se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios específicos y valores mínimos para el contenido de componentes bioactivos en el propóleo.

Tipo de propóleo	Compuestos químicos	% en peso en propóleo crudo (mínimo)	Referencia
Álamo	Fenoles totales	21	Popova., et al. 2004
	Flavonas y flavonoles totales	4	Popova., et al. 2004
Verde brasileño	Fenoles totales	5	Sawaya., et al. 2011
	Flavonoides totales	0.5	Sawaya., et al. 2011

Adicional a estos parámetros específicos de calidad del propóleo existen una serie de pruebas generales que permiten rápidamente evaluar la calidad del propóleo obtenido. Dentro de estos parámetros se encuentran: el índice de oxidación, que refleja de manera indirecta la capacidad antioxidante del propóleo; el máximo porcentaje de humedad, el cual influencia directamente la capacidad de que el producto sufra procesos de degradación; o las impurezas mecánicas, refleja las manipulaciones incorrectas que pudo tener el propóleo durante el proceso de recolección. En la tabla 3 se resumen los principales parámetros de calidad de los propóleos con sus valores de referencia mínimos o máximos según el caso.

Tabla 3. Criterios adicionales que se aplican al propóleo

<i>Parámetro</i>	<i>Característica</i>	<i>Referencia</i>
Humedad	máximo 8%	Bankova., et al. 2019
Contenido de ceras	máximo 25%	Bankova., et al. 2019
Contenido de cenizas	máximo 6%	Bankova., et al. 2019
Impurezas mecánicas	máximo 25 %	SPRI y SAGPA
Material soluble en etanol	mínimo 30%	SPRI y SAGPA 2008
Índice de oxidación:	máximo 22 s	DOF, 2017; SPRI y SAGPA 2008
Espectrograma UV-VIS	$\lambda_{\max}$ 270 y 315 nm	SPRI y SAGPA 2008
Contenido de Pb (base seca)	máximo 0,2 mg kg <sup>-1</sup>	SPRI y SAGPA 2008
Contenido de As (base seca))	máximo 0,1 mg kg <sup>-1</sup>	SPRI y SAGPA 2008
Residuos de plaguicidas y antibióticos	ausencia	SPRI y SAGPA 2008
Actividad antioxidante (CA50)	mínimo 100 mg/ml	DOF, 2017

A continuación, se explican en detalle los procedimientos necesarios para la determinación de estos parámetros de calidad.

### **Preparación de la muestra**

Conservar el propóleo durante 12 h en un congelador a -20 °C. Colocar la muestra congelada en un molino de café o un dispositivo de trituración similar para reducir el propóleo a polvo o gránulos finos (Bankova., et al. 2019, CONACYT, 2003).

### **Preparación del extracto etanólico**

Tomar una muestra de propóleo y agregar etanol al 70 %, usando una relación 1:30 peso:volumen, es decir, por cada gramo de propóleo, 30 ml de la solución etanólica. Mantener el contacto de la muestra durante 24 horas a temperatura ambiente bajo agitación a intervalos durante este periodo. En lugar de esto, se puede someter la suspensión a un baño de ultrasonido durante 20 min a 20 °C. Posteriormente, se debe filtrar la suspensión resultante usando un filtro de papel (Bankova., et al. 2019) y conservar el extracto en refrigeración y protegido de la luz hasta el momento de realizar el análisis.

### **Determinación de los parámetros de calidad**

#### *Determinación de material soluble en etanol al 70%*

Tomar 2 ml del extracto etanólico y secar preferiblemente en vacío hasta sequedad constante (Bankova., et al. 2019). También se puede llevar a estufa a temperatura de 100 °C por 60 min hasta

peso constante (CONACYT, 2003). Para calcular el porcentaje de bálsamo (P) en la muestra de propóleo se usa la fórmula:

$$P = \frac{g \times 100}{2M} \times 100$$

Donde: g: peso del residuo después de la evaporación

M: peso de la muestra de propóleo crudo en gramos

#### *Humedad*

10 g de propóleo triturado se dispone en un horno a 105 °C por 5 horas. Se enfría a temperatura ambiente en un desecador y se calcula el porcentaje de contenido agua (Bankova., et al. 2019).

#### *Contenido de ceras*

El contenido de cera puede realizarse con el método basado en medición de diferencias en densidad específica descrito por Hogendoorn et al. (2003). En un tubo con tapa-rosca adicionar 20 g de propóleo triturado y 25 ml de agua destilada, removiendo constantemente la mezcla y evitando que el polvo de propóleo flote en la superficie. Disponer el tubo verticalmente y cerrar sin apretar para evitar la acumulación de presión mientras este se calienta en un microondas doméstico a temperatura media. El tiempo de calentamiento se ajusta para que la temperatura se eleve a 100 °C evitando ebullición de la fase acuosa. El tiempo de calentamiento puede oscilar entre 1 min y 4 min dependiendo del número de muestras. Al enfriar la muestra a temperatura ambiente se forma un sistema con tres capas: cera de abejas (capa superior), agua (capa intermedia) y propóleo desparafinado (capa inferior). Con una espátula de acero inoxidable, la cera de abejas de la capa superior se transfiere un papel filtro previamente pesado para eliminar el agua restante. Luego se pesa la cantidad de cera extraída y se calcula el contenido de esta como un porcentaje del peso de la muestra original.

#### *Impurezas mecánicas*

Disponer en un cartucho Soxhlet previamente pesado, 3.5 gr de propóleo triturado, introducir el tubo en el extractor Soxhlet tapado con un algodón y extraer por 4-6 horas, utilizando 90 ml de etanol (96 % de pureza) en un balón de fondo plano de 250 ml y controlando la temperatura hasta obtener de 8 a 12 ciclos por hora. Secar el cartucho en una estufa a temperatura de 105 °C durante 2 h (CONACYT, 2003). Luego se pesa residuo después de la extracción y se calcula el contenido de estas como un porcentaje del peso de la muestra original.

#### *Contenido de cenizas*

Disponer 3 gr de propóleo en un crisol con tapa previamente secado y pesado. Calentar a 550 °C durante 12 h. Durante el calentamiento, no cubrir totalmente el crisol con la tapa. Después de que el calentamiento esté completo, tapar el crisol totalmente para evitar la pérdida de ceniza, enfriar el crisol en un desecador por una hora. Luego se pesan las cenizas y se calcula el porcentaje de estas como un porcentaje del peso de la muestra original (Bankova., et al. 2019).

### *Índice de oxidación*

El índice de oxidación es influenciado por el contenido de compuestos fenólicos. Esto indica que, a mayor concentración de fenoles totales, el tiempo de la reacción es más rápido (DOF, 2017). Para la determinación del índice de oxidación, disponer en un beaker de 100 ml, 2 ml del extracto y adicionar 48 ml de agua destilada y agitar. Tomar en un tubo de ensayo 15 ml de la dilución y adicionar 0.5 ml de agua destilada, 1 ml de ácido sulfúrico al 20%, mezclar y enfriar en baño de hielo a 18-20 °C. Agregar 50  $\mu$  l de  $\text{KMnO}_4$  0.1 N sin tocar las paredes del tubo. Cronometrar y registrar el tiempo en que tarda en desaparecer el color rosa del  $\text{KMnO}_4$  (CONACYT, 2003).

### **Determinación cualitativa de componentes bioactivos**

En el caso de los componentes bioactivos, se puede detectar la presencia de grupos fenólicos y flavonoides con los procedimientos que se explican a continuación.

#### *Pruebas cualitativas para identificación de grupos fenólicos*

En dos tubos de ensayo, colocar en cada uno 1.0 ml de extracto etanólico, agregar al primer tubo 0.5 ml de cloruro férrico al 5% y al segundo tubo 1.0 ml de hidróxido de sodio al 20%. La presencia de grupos fenólicos genera como resultado una coloración naranja pardo con hidróxido de sodio y una coloración color naranja, verde o pardo oscuro con cloruro férrico (CONACYT, 2003).

#### *Prueba cualitativa para la identificación de grupos de flavonoides*

Se puede aplicar la reacción con acetato de plomo. Para este se dispone de 2.5 ml de extracto en un tubo de ensayo y se adiciona 7.0 ml de etanol al 95% y 0.5 ml de acetato de plomo al 10%. Se agita la mezcla y se deja en reposo por 24 horas. Un precipitado amarillento o una solución turbia, color amarillo opaco es prueba positiva. La reacción de Shinoda consiste en adicionar 2.0 ml de extracto a un tubo de ensayo y adicionar una lámina de magnesio metálico y 0.3 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se deja reposar la mezcla por 10 minutos. Una coloración anaranjada roja, verde, azul o violeta es prueba positiva de la presencia de flavonoides (CONACYT, 2003).

## Referencias

- Bankova V, Bertelli D, Borba R, Conti B J, da Silva-Cunha I, Danert C, Nogueira M, Falcão S, Isla M I, Nieva M I, Papotti G, Popova M, Basso K, Salas A, Frankland A C, Vilczaki N, Sforcin J M, Simone-Finstrom M, Spivak M, Trusheva B, Vilas-Boas M, Wilson M & Zampini C. (2019) Standard methods for *Apis mellifera* propolis research, Journal of Apicultural Research, 58:2, 1. 49, <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>
- Cavalaro R I, Gonçalves da Cruz R, Dupont S, Juliana Leite M, Ferreira de Souza T Maria. (2019). In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food Chemistry: X* 4 100054: 8 pages. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100054>
- CONACYT. (2003). Norma Salvadoreña. NSO 65.19.02:03. Calidad de propóleo crudo. Recuperado el 15 de abril de 2021. [https://www.oirsa.org/contenido/2017/EI\\_Salvador\\_INOCUIDAD/8.%20NSO%2065%2019%2002%2003%20-%20CALIDAD\\_DE\\_PROPOLEO\\_CRUDO.pdf](https://www.oirsa.org/contenido/2017/EI_Salvador_INOCUIDAD/8.%20NSO%2065%2019%2002%2003%20-%20CALIDAD_DE_PROPOLEO_CRUDO.pdf)
- Diario Oficial de la Federación (DOF). (2017). *Norma Oficial Mexicana: Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. NOM-003-SAG/GAN-2017*. Recuperado el 14 de abril de 2021. [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5500103&fecha=06/10/2017](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5500103&fecha=06/10/2017)
- Gargouria W, Osesb S M, Fernandez-Muino M A., Sancho M. T, Kechaou Nabil. (2019). Evaluation of bioactive compounds and biological activities of Tunisian propolis. *LWT - Food Science and Technology*.111: 328-336 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.044>
- Hogendoorn, E. A., Sommeijer, M. J., & Vredendregt, M. J. (2013). Alternative method for measuring beeswax content in propolis from the Netherlands. *Journal of Apicultural Science*, 57, 81–90. doi:10.2478/jas-2013-0019
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D. et al. (2019). Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *J Food Sci Technol* 56: 5386–5395 <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04009-9>
- Popova M, Bankova V, Butovska D, Petkov V, Nikolova.Damyanova B, Sabatini A G S,2 Marcazzan G L, Bogdanov S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal.* 15: 235–240. <https://doi.org/10.1002/pca.777>
- Sawaya, A.C.H.F, Barbosa da Silva Cunha, I. & Marcucci, M.C. (2011). Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal* 5 (27): 10 pages. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-27>
- Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos (SPRI) y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPA). 2008. Resolución Conjunta SPRI N° 94/2008 y SAGPA N° 357/2008. Recuperado el 14 de abril de 2021. <http://servicios.infoleg.gov.ar/infolegInternet/anexos/140000-144999/140547/norma.htm>
- Sforcin J M. (2016). Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. Review. *Phytother. Res.* 30: 894. <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>
- Stan L, Mărghitaş L A, Dezmirean D. (2011). Quality Criteria for Propolis Standardization. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies.* 44 (2): 137-140