

# PROPÓLEIS

## MANUAL DE PRODUCCIÓN DE PROPÓLEO

Técnicas basadas  
en la producción  
de propóleo verde  
brasileño.

**Esther Margarida A F Bastos**

## EL PROPÓLEO EN ANDALUCÍA

Bases para el desa-  
rrollo del propóleos  
apícola en Andalucía

**Fco. José Orantes Bermejo**





**TEXTOS:**

**Esther Margarida AF Bastos.**

**Fco. Jose Orantes Bermejo.**

*Director Laboratorios Apinevada SL (director@apinevada.com)*

Asociacion Provincial de Apicultores de Granada /ADSG

Consejo Regulador de la DOP Miel de Granada

Barrancos S/n

18420 Lanjarón

Granada

Tel-fax.- 958771196

[www.mieldegranada.com](http://www.mieldegranada.com)

[www.apicultoresgranada.com](http://www.apicultoresgranada.com)

mieldegranada@mieldegranada.com

Diseño y Realización: Transversal Arte y Estrategia

ISBN: 978-84-09-27020-0

Publicación realizada con la financiación del Programa Apícola Nacional.



# PROPOLIS

## MANUAL DE PRODUCCIÓN DE PROPÓLEO

Técnicas basadas  
en la producción  
de propóleo verde  
brasileño.

**Esther Margarida A F Bastos**





|           |                                                                                                  |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>7</b>  | <b>I. Las abejas y la producción de propóleos</b>                                                |
| <b>8</b>  | <b>II. Método de producción</b>                                                                  |
| 15        | II-a Material de apicultura                                                                      |
| 15        | II-b Instalaciones, materiales y equipos necesarios                                              |
| <b>10</b> | <b>III. Situación y manejo de las colmenas</b>                                                   |
| <b>11</b> | <b>IV. Líneas de abejas y aptitud genética</b>                                                   |
| <b>11</b> | <b>V. Época del año</b>                                                                          |
| <b>12</b> | <b>VI. Cuidado del material y herramientas utilizadas</b>                                        |
| <b>13</b> | <b>VII. Frecuencia de cosecha y protección del recolector</b>                                    |
| <b>14</b> | <b>VIII. Técnicas de estimulación y colectores de propóleos.</b>                                 |
| 14        | VIII-a - Técnicas de estimulación de la propolización sin alterar la estructura de la colmena    |
| 14        | VIII-b - Uso de colectores móviles dentro de la colmena                                          |
| 15        | VIII-c - Uso de pantallas de propolización de plástico                                           |
| 15        | VIII-d - Técnicas de estimulación de la propolización con alteración de la estructura de la caja |
| <b>21</b> | <b>Limpieza, clasificación, secado y envasado de propóleos</b>                                   |
| <b>22</b> | <b>Embalaje de propóleo y almacenamiento</b>                                                     |



---

## I. Las abejas y la producción de propóleos

---

El término propóleos se deriva del griego «pro» que significa defensa y «polis» que significa ciudad, es decir, «defensa de la ciudad de las abejas» (CASTALDO & CAPASSO, 2002). Es una resina natural producida por las abejas de diversas partes de las plantas, como brotes, capullos, cortezas y exudados resinosos. Estos componentes son biotransformados, mezclados con cera y la enzima 13 - glucosidasa, producida en las glándulas salivales de las abejas, causando hidrólisis de flavonoides glucosilados a sus respectivos aglicones. (PARK et al.,1997). Luego se deposita en las colmenas, donde juegan un papel importante en el sellado de grietas, en la cobertura del cuerpo de los animales muertos dentro de la colmena y en la protección contra la proliferación de microorganismos (GHISALBERTI, 1979).

El propóleos ha sido utilizado desde la antigüedad por prácticamente todas las civilizaciones antiguas como China, Tibetano, Egipto y Greco-romana para diversos fines: alimentos, cadáveres de embalsamamiento, enjuague bucal, curación y por su reconocida actividad antimicrobiana, incluyendo informes de su uso por la civilización Inca (CASTALDO & CAPASSO, 2002).

El primer trabajo científico sobre propóleos apareció en 1908 y describió sus propiedades químicas y su composición (HELFENBERG, 1908 apud GHISALBERTI, 1979). En 1968 llegó el resumen de la primera patente que usaba propóleos en Chemical Abstracts (rumano, para la producción de lociones de baño) (IULIU, 1965 apud PEREIRA et al, 2002). Hasta la fecha, el número de obras supera las 450, procedentes de los cinco continentes, y más de 239 patentes (PEREIRA et al, 2002). En Brasil, la primera publicación sobre propóleos en 1994 presentó un estudio comparativo entre el efecto del extracto de propóleos y los antibióticos sobre la inhibición de *Staphylococcus aureus* (PEREIRA et al, 2002).

En Brasil, el interés por el propóleos llegó solo en la década de 1980 con el trabajo pionero de Ernesto Ulrich Breyer (1981), que demostró en su libro, *Bees and Health*, las propiedades terapéuticas del propóleos y su uso como antibiótico natural. Acostumbrado a vender miel, el apicultor de Minas Gerais encontró en el propóleos, precisamente algo que prácticamente fue desechado, otra fuente importante de ingresos en su actividad.

Inicialmente, el propóleos se obtuvo raspando la tapa y las cuchillas (entrada de la abeja en la colmena) y durante el reemplazo de cajas viejas por otras nuevas. La calidad era pobre y la productividad baja, no excedía de 100 a 300 gramos por año y, a menudo, el apicultor no tenía conocimiento de este producto de la colmena.

La fuerte demanda llevó a la aparición de un coleccionista que facilitó y aumentó el trabajo de los apicultores (GRESSLER, 2003; MENDENSON, 2004).

Los coleccionistas desarrollados tenían el principio básico de abrir las grietas en las colmenas. Abrir grietas altera el control térmico dentro del nido, compromete el flujo de información química y expone a las abejas adultas, las larvas y los alimentos almacenados a la depredación y al saqueo. Con la instalación de colectores, las abejas son inducidas a producir propóleos para sellar los trastes, estableciendo así las condiciones internas ideales de temperatura, comunicación y defensa de la colonia.

El primer método desarrollado por los apicultores de Paraná en 1993 fue el Sistema Batten, que consistía en intercalar las partes móviles de la colmena con trozos de madera o «palos», creando grietas e induciendo la recolección de resina y la preparación de propóleos por las abejas. Poco después, en 1996, surge el CPI (colector inteligente de propóleos), con las paredes laterales del nido formadas por listones superpuestos y extraíbles (Adomar César de Carvalho (MG), comunicación personal). También surgieron otros métodos y los más populares fueron el coleccionista Piraçununguense (Anónimo, 1998) o Tamprópolis (Anónimo, 1999).

El uso de estos recolectores racionales ha resultado en una serie de ventajas para el productor. Lo más notable fue el rendimiento promedio que aumentó de 100 a 300 gramos a 700 a 1000 gramos / colmena / año, aunque hay colmenas con una producción anual de 5,000 gramos. La recolección de propóleos se ha facilitado y ya no causa estrés a las abejas como método de raspado. La calidad del propóleo también ha mejorado porque ahora se produce en piezas grandes, en forma de cintas o placas, que se recogen con un mínimo de impurezas. Además, el propóleo se retiró en un promedio de 8 días entre cada recolección y ahora se sabe que los niveles de sustancias bioactivas en el propóleo viejo son aproximadamente un 20% más bajos que en los propóleos frescos (Bonvehi y Coll, 2000). Sin considerar la eficiencia de cada tipo de recolector, lo que se evidenció fue un cambio en la actitud de los apicultores. En las principales regiones productoras del estado de Minas Gerais / Brasil, el propóleo se convirtió en el principal producto de la colmena.

## II. Método de producción

### II-a/ Material de apicultura

- ✿ Colmenas de producción instaladas en cajas de madera sin pintar.
- ✿ Colmenas pobladas;
- ✿ Caballetes y cubiertas apropiadas;
- ✿ Colectores de propóleos (marcos modificados con marco lateral o marco móvil) Figura 1.
- ✿ Ropa de apicultura;
- ✿ Fumigante;
- ✿ Cíncel, plumero, colección y cuchillo de corte;
- ✿ Caja de plástico;
- ✿ Paquetes de plástico;
- ✿ Vehículo de transporte;
- ✿ Congelador
- ✿ Secadora;
- ✿ Casa de extracción, que contiene equipos y utensilios.

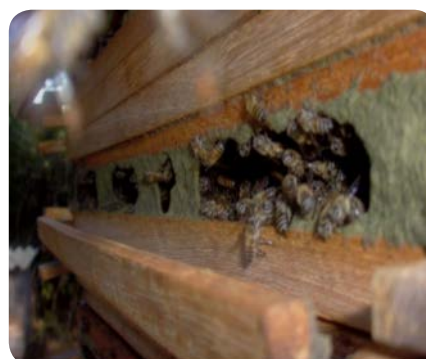


Figura 1 —Recolector instalado a los lados de las piqueras.

Para la producción de propóleos se utilizan las mismas colmenas que la producción de miel, excepto en los casos en que el objetivo principal es obtener propóleos especializados. La producción de propóleos no es compatible con la producción de polen o jalea real en la misma colmena. Todas las colmeas producen propóleos, sin embargo, su rendimiento varía dependiendo de varios factores, que se tratarán a continuación.

## II-b/ Instalaciones, materiales y equipos necesarios

Ubicación del apiario y densidad de la colmena:

La flora disponible influye en el propóleo producido.

La ubicación del apiario debe estar en una ubicación con suficiente vegetación para satisfacer la demanda de néctar y polen de las abejas, lejos de fuentes indeseables que puedan contaminar el propóleo, como los centros urbanos y las carreteras transitadas. Eventualmente, se puede encontrar abejas recolectando pintura de cercas y otras resinas artificiales que pueden contaminar el propóleo cuando no tienen buenas fuentes de resinas.

En la producción de miel y propóleos, se recomienda trabajar con colmenas de hasta 30 colmenas. En una producción especializada de propóleos, se obtienen mejores resultados con colmenas de hasta 12 colmenas. Se recomienda mantener las colmenas protegidas del sol (media sombra) en los períodos más calurosos del día, protegidas de la humedad y el viento. (Figura 2).



Figura 2 —Colmenas con aberturas laterales, cubiertas con plástico de protección contra la luz ultravioleta.

### III. Situación y manejo de las colmenas

Las colmenas deben ser pobladas, estar bien alimentadas y ocupar todo el espacio disponible. Esta situación se obtiene con un buen manejo, como: intercambio de panal, reinas productivas, disponibilidad de espacio para propolización a través de recolectores.

En los colmenares destinados únicamente a la producción de propóleos, las abejas deben alimentarse con alimentos energéticos, en Brasil, los apicultores cultivan caña de azúcar y alimentan a las abejas para la producción de propóleos verdes (Fig.3). La miel producida no puede comercializarse, pero puede usarse nuevamente como alimento para estas abejas. Colmenas alimentadas, se pueden colocar varias melgueiras con aberturas laterales y se aumentará la producción de propóleos.

Este tipo de producción se puede combinar con la producción de cera, ya que cuanto mayor es el número de abejas, mayor es la producción de cera por las abejas.



Figura 3 —Modelo creado por los apicultores para la alimentación de abejas en la producción de propóleos orgánicos. Cultivo, molienda de caña de azúcar y producción de caña para alimentación.

---

## VI. Líneas de abejas y aptitud genética

---

Es fácil de observar en un apiario de producción, donde las colmenas con la misma población, las condiciones estructurales y ambientales presentan resultados muy diferentes en la calidad y cantidad de propóleos producidos. En una selección genética para la producción de propóleos es importante observar en primer plano la capacidad de los enjambres para la producción de miel y la resistencia a las enfermedades, y de los mejores enjambres seleccione los que se destacan en la producción de propóleos. La selección de cambio de drones y drones traerá excelentes resultados. Conservación y plantación de resinas de materias primas de buena calidad.

El apicultor necesita observar e intentar averiguar qué plantas posibles proporcionan materia prima para las abejas. La investigación ha identificado el origen botánico de algunos tipos de propóleos y, por lo tanto, permite la protección y multiplicación de estas plantas.

---

## V. Época del año

---

El apicultor debe observar en qué época del año se intensifica la actividad de propulsión, para realizar mejor el manejo de las colmenas en la cosecha y obtener el mejor rendimiento posible. Hay épocas del año en que las abejas reducen o prolongan drásticamente la propolización, sin embargo, en este último caso, se debe tener cuidado de que las aperturas de estímulo no pongan en peligro la supervivencia de la colmena.

En Brasil, considerando lugares de flora silvestre, el período más productivo es de diciembre a abril, y puede variar según la región, debido a las grandes extensiones territoriales del país. Para el propóleos verdes, las técnicas utilizadas para estimular la producción, es posible producir propóleos durante todo el año por la abundancia de la fuente de resina de alecrim del campo (Fig. 4 e 5), presente en áreas antrópicas (*Baccharis dracunculifolia*).

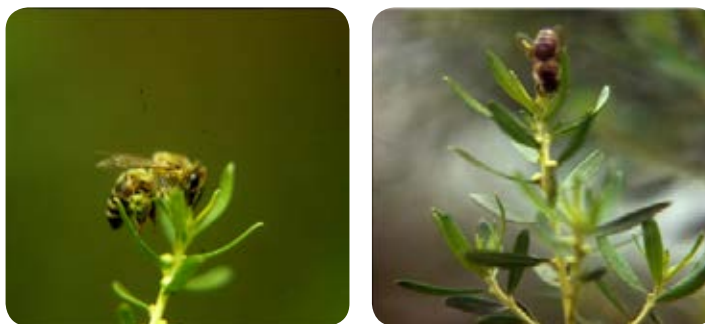


Figura 4 —Abejas recolectando en *Baccharis dracunculifolia*.

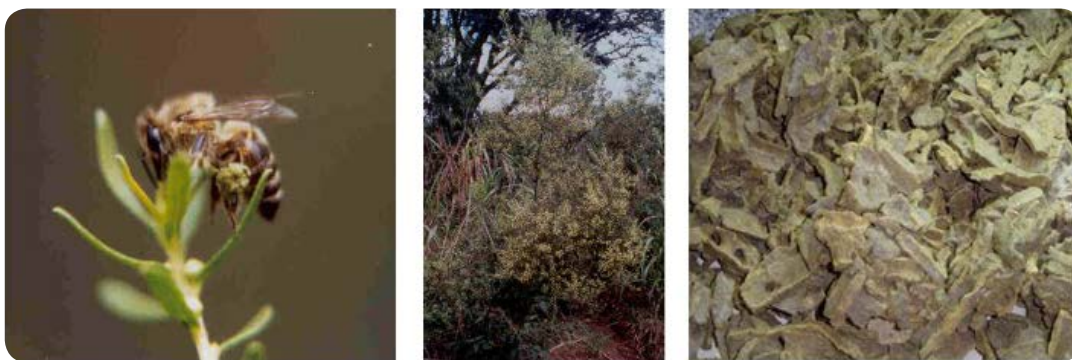


Figura 5 —Abejas con corbículas cargadas de resina de *Baccharis dracunculifolia*.

## VI. Cuidado del material y herramientas utilizadas

Las colmenas deben estar hechas de material (madera) y la pintura debe estar libre de sustancias tóxicas que puedan contaminar el propóleo. No se recomienda el uso de ningún tipo de pintura sintética debido a la presencia de metales pesados en su composición.

Se recomienda proteger las cajas de madera con barniz natural:

El proceso de fabricación del barniz es relativamente simple y económico.

### Material necesario para la producción de barniz natural:

- ☼ Virutas de propóleos: 3 kg (colmenas, fondos y tapas de propóleos raspados, que no es adecuado para otros fines);
- ☼ Alcohol normal o de cereales: 5 litros;
- ☼ Aceite vegetal: 3 litros (puede ser linaza virgen, maíz, canola u otro, pero siempre de origen vegetal y no transgénico).

**Modo de preparar:** agregue el propóleo y el alcohol en un cubo de plástico, cierre bien y agite dos o tres veces al día durante al menos 20 días para una buena disolución del propóleos.

Filtre la mezcla con un filtro fino de plástico, acero inoxidable o tela de algodón. Agregue el aceite vegetal y revuelva la mezcla otros dos o tres días para mezclar mejor los componentes. Antes de su uso, los componentes deben estar bien mezclados ya que las capas pueden estar separadas.

**Uso:** Especialmente para aplicaciones externas, en los componentes de la colmena, utilizando rodillos de espuma o cepillos de cerdas. También se puede aplicar en el interior de la caja, en marcos, fondo y tapa. Incluso se pueden bañar todas las colmenas nuevas con este barniz.

**Otros materiales y herramientas utilizados:** En el manejo de las colmenas, para revisión o también en la recolección de propóleos, se deben usar herramientas (cincel, cuchillo, etc.) que no presenten oxidación, porque el óxido puede contaminar el propóleo (Fig. 6). Se recomienda que estos utensilios estén hechos de acero inoxidable sanitario, material muy resistente y duradero. Para la recolección y empaque de marcos de propóleos, use cajas y paquetes de plástico de grado alimenticio (Fig.7).



Figura 6 —Retirada de propolis de las colmenas



Figura 7- Retirada de la cinta de propolis y colocación en una bandeja de plástico de uso alimenticio.

## VII. Frecuencia de cosecha y protección del recolector

Mientras más expuesto sea el propóleo a condiciones ambientales desfavorables como la luz, la humedad y el polvo, es más probable que pierda calidad. Se recomienda utilizar una cubierta que también proteja al colector.

La frecuencia de la cosecha es de ocho días, ya sea que las placas estén completamente formadas o no, esta medida apunta a la no oxidación del propóleo en la naturaleza con el consiguiente mantenimiento de la calidad.

## VIII. Técnicas de estimulación y colectores de propóleos

La producción de propóleos estimulados ha progresado significativamente en los últimos años. De una producción tradicional, que consistía en raspar el propóleos de las piezas de la colmena durante el manejo de rutina, evolucionó hacia técnicas de estimulación e incluso la mejora de los colectores, lo que aumentó sustancialmente la producción, la productividad y la calidad.

Se desarrollaron varios procedimientos, basados en la apertura de espacios estratégicos en la colmena para estimular a las abejas. El apicultor debe adoptar el método que mejor se corresponda con las condiciones de su región (clima, fauna y flora) y los tipos de apicultura (fija o migratoria).

### VIII-a/ Técnicas de estimulación de la propolización sin alterar la estructura de la colmena

- ☼ Bloqueo de componentes de la colmena, como la tapa y los setos (Figura 8):

Este procedimiento, aunque muy productivo, crea condiciones muy desfavorables para el enjambre, causando molestias a las abejas, con dificultad en el equilibrio térmico y facilitando la entrada de otros insectos (hormigas, avispa, arañas, polillas), así como impurezas como polvo y hojas. Además, el propóleos debe cosecharse del apiario, lo que dificulta el trabajo del apicultor y proporciona menos higiene para el producto.



Figura 8 - Apertura de la tapa abierta.

### VIII-b / Uso de colectores móviles dentro de la colmena

Ventajas:

- ☼ La estructura de la caja se puede mantener;
- ☼ Los colectores se pueden cambiar (Fig. 9), y el propóleos luego se puede eliminar en un ambiente adecuado, obteniendo un producto de mejor calidad.
- ☼ Desventajas- Dependiendo del colector (por ejemplo, marco), se crean espacios adicionales dentro de la colmena donde las abejas eventualmente construyen peines;
- ☼ Mayor mano de obra, porque el apicultor necesita abrir la colmena para quitar el colector.



Figura 9- Uso de marcos extraíbles.

#### VIII-c/ Uso de pantallas de propolización de plástico

No se recomiendan debido a la dificultad para eliminar el propóleo.

#### VIII-d / Técnicas de estimulación de la propolización con alteración de la estructura de la caja

Aberturas laterales (Fig. 10) en los setos con inserción de marco móvil (marco de propóleos):

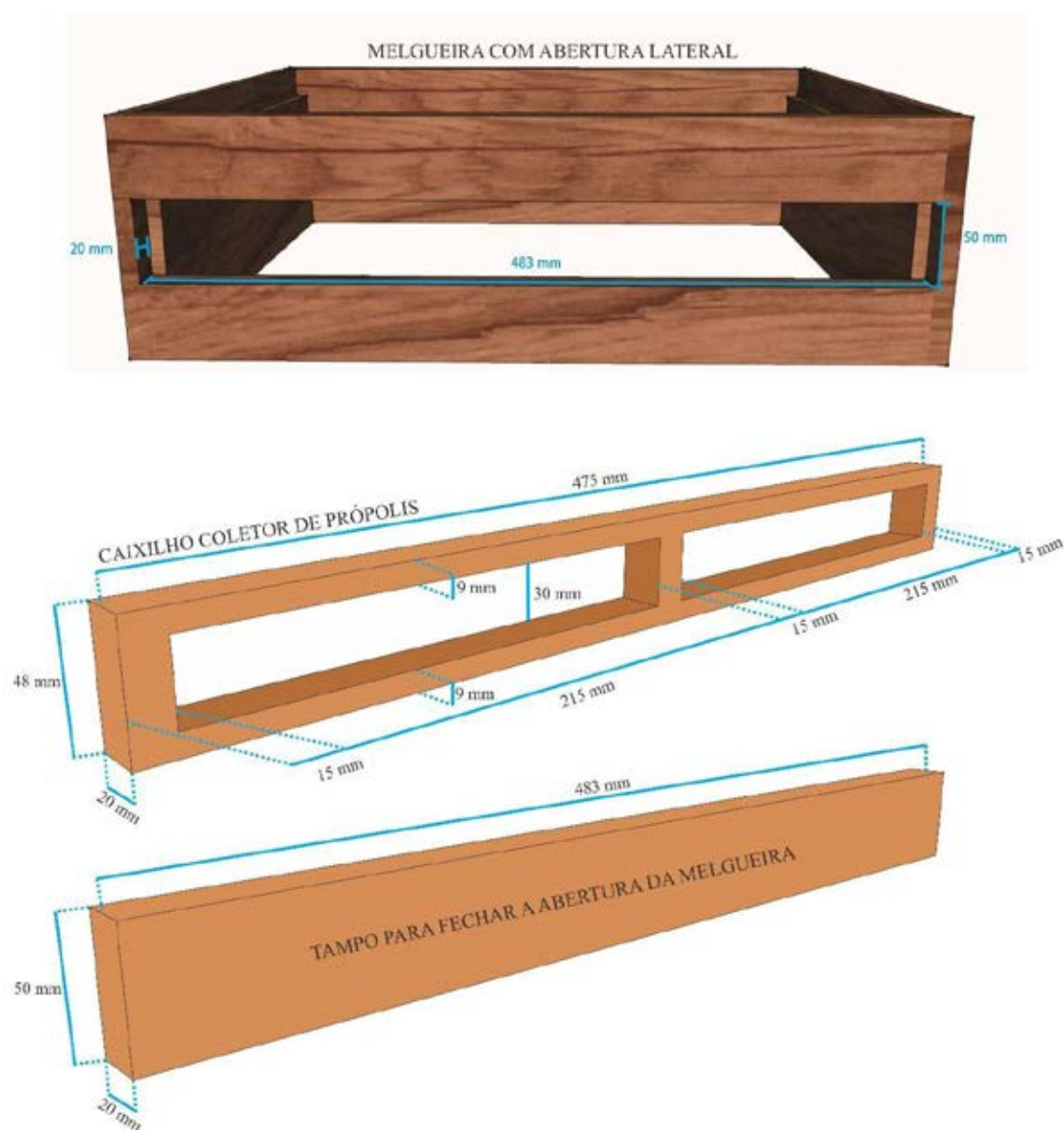


Figura 10- Recolector adaptado a la recolección de propóleos.



Figura 11: Extracción del recolector ya propolizado.

- ☼ El propóleos se puede quitar de los marcos en un ambiente adecuado (limpio e higiénico), en una habitación adecuada en la unidad de extracción del apicultor;
- ☼ La abertura exterior del marco está protegida por una cinta de plástico transparente, que proporciona un mayor confort térmico para las abejas y evita la entrada de otros insectos e impurezas;
- ☼ Después del período de producción, las aberturas se pueden cerrar reemplazando los marcos móviles con una tapa de madera perfectamente ajustada;
- ☼ La eliminación del propóleos de los marcos de tiras permite su clasificación por tipo, lo que permite satisfacer las mejores demandas del mercado.
- ☼ Desventajas
- ☼ Cambia la estructura estándar de las melgueiras, lo que requiere un manejo adicional en el caso de la apicultura migratoria;
- ☼ Es un proceso desarrollado para funcionar como un sistema estándar, donde las medidas deben ser obedecidas, para que su operación sea adecuada;
- ☼ En regiones donde hay depredadores como irara, coatíes y otros enemigos naturales, se debe tener cuidado adicional ya que estos marcos laterales facilitan el acceso a estos depredadores;
- ☼ Se debe quitar un marco de las camas de agua, dividiendo el espacio con los dos lados de la bomba de agua para que el sistema funcione.



Detalles para la fabricación, preparación y manejo de este colector (Figura 12):

- a) Preparación y colocación del recolector en la colmena.

**- Antes de llevar al colmenar:**

Pegue la cinta adhesiva de plástico (50 mm de ancho) manualmente a un lado de la placa móvil. La madera del marco debe estar bien limpia y seca para que la cinta se pegue.

Ralle los marcos durante unos días para que la cinta adhesiva expuesta se seque, evitando que las abejas se peguen (Figura 12 e 13).

Coloque los marcos en la abertura lateral del sifón adaptado al colector. Este trabajo también se puede hacer en el colmenar, reemplazando el existente allí. Recuerde dejar un plafón menos (en el estándar estadounidense (Langstroth), hay 9 fajas).

**- En el apiario**

Coloque los setos con los recolectores de propóleos en las colmenas para poder recibirlos, de acuerdo con la orientación previa. En esta gestión, divida el espacio del marco despegado entre



Figura 13 —Cinta adhesiva que proteger el colector.

los dos lados de la melgueira donde se encuentra el colector de propóleos.

Los marcos laterales están separados aproximadamente 2 cm de la estructura interna de la caja. Este es un aspecto clave para que las abejas impulsen la apertura del marco móvil (colector) y no contra el marco de panal de abeja.

b) Gestión del colector y colección de marcos propolizados en el apiario:

**- Durante el proceso de producción:**

Enjambres fuertes, que ocupan más de una choza y con buenas características de propolización pueden recibir más de un colector.

En condiciones favorables (clima, situación de enjambre), la primera colección de imágenes propolizadas se puede realizar en aproximadamente 8 días. En promedio, la mayoría de los enjambres son capaces de propolizar dos cuadros móviles (1 en cada lado del seto) en este momento.

Los marcos con propóleos se cosechan y se reemplazan por vacíos.

Los enjambres que no han propiciado aperturas dentro de los 20 días (favorable) deben identificarse para futuros intercambios de reinas.

La recolección de marcos propolizados debe hacerse con poco humo aplicado al objetivo y en el momento de retirar el colector. Los marcos propolizados se cincelan a través del espacio lateral existente, se agitan ligeramente y se dejan sobre la colmena para que las abejas puedan salir. Al mismo tiempo, se colocan los marcos móviles vacíos previamente preparados y colocados en una caja de plástico.

Una vez que este procedimiento se haya completado en todo el colmenar, devuelva los marcos recolectados propolizados en un paquete de plástico no tóxico y una caja de plástico adecuada (Figura 14).



Figura 14 —Retirar el propóleo de las colmenas y empacarlo en bolsas de plástico.

Después de recolectar los marcos propolizados, se deben hacer las notas e identificaciones necesarias para un buen control de la actividad.

Los marcos deben empaquetarse con las caras propolizadas en contacto, evitando que el propóleo toque el plástico del marco. Esto evita la contaminación externa del propóleo, así como su adherencia al plástico.

El transporte del material propulsado debe hacerse con un vehículo limpio y protegido del calor excesivo.

**- Después del proceso de producción del colmenar:**

Al final del período de producción de propóleos, los saucos se eliminan con los recolectores. En las colmenas más pobladas y surtidas en el primer casco, se retira el marco móvil y se cierra la abertura con una tapa ajustada (Fig. 15). Esta caja de resonancia no necesita ser clavada, ya que las abejas la propolizarán. En las próximas producciones se puede eliminar fácilmente.



Figura 15 —Colocación de la tapa en el período sin producción de propóleos.

Los marcos que quedan para días más largos pueden tener una capa más gruesa de propóleos, lo que aumenta su peso. El mejor rendimiento se obtiene con colecciones más frecuentes (cada 08 días).

Corte y remoción de propóleos de marcos móviles.

Para llevar a cabo este trabajo, el apicultor debe tener:

- ✿ Espacio adecuado en la unidad de extracción (casa de miel);
- ✿ Mesa de mesa o de acero inoxidable;
- ✿ Suficientes sillas o taburetes;
- ✿ Estante;
- ✿ Congelador;
- ✿ Invernadero para secar el propóleos;
- ✿ Paquetes, películas de plástico de grado alimenticio;
- ✿ Cubos de plástico herméticos;
- ✿ Cuchillos apropiados;
- ✿ Etiquetas de identificación;-Jaleco, touca, máscara e luvas.

Al llegar desde el colmenar, las cajas que contienen los marcos de propóleos deben descargarse y llevarse al sitio de procesamiento. Antes de cualquier manipulación, el apicultor o la persona que maneja el propóleos debe tomar toda la limpieza personal y ambiental necesaria y el cuidado de la higiene. Los marcos se retiran de las cajas y se rallan en la mesa o estante para que no se peguen y se sequen previamente (Figura 15).

En el mismo día o en días posteriores, el propóleos se cortará con un cuchillo afilado (hoja de acero inoxidable acortada y afilada en un lado). En este proceso, se evita cortar la cinta de plástico y la madera de los lados del marco. De esta forma se obtienen prácticamente tiras limpias y trozos de impurezas (Figura 16).



Figura 16 —Disposición de marcos de propóleos para su manipulación.

## Limpieza, clasificación, secado y envasado de propóleos

Independientemente del proceso de producción adoptado, estas precauciones deben aplicarse a cada propóleo producido.

### 6.1 Limpieza:

Se realiza en un ambiente limpio e higiénico, con operadores equipados con bata de laboratorio, gorro, máscara, guantes (opcional). La higiene del operador debe ser estricta para evitar la contaminación microbiológica. En este proceso, elimine recogiendo a mano o con pinzas y cuchillos todas las impurezas visibles, tales como: trozos de madera, abejas y sus fragmentos, otros insectos, pedazos de cera, fragmentos de pintura, plástico, propóleos oxidados viejos, etc. Si el propóleo proviene de la limpieza de los componentes de la colmena, será necesario un proceso de separación por tamiz con 2 o 3 mallas para eliminar el polvo, así como la separación y la clasificación de las piezas. Con este procedimiento se facilita la limpieza (eliminación de fragmentos).

Cuando el proceso de producción de propóleos se realiza con colectores móviles, se facilitan los pasos de limpieza y clasificación (Fig. 17).



Figura 17 —Limpieza, clasificación, secado y acondicionamiento de propóleos.

### 6.2- Clasificación de propóleos

Se recomienda adoptar una clasificación que satisfaga las principales demandas del mercado, pero en general se debe considerar:

a) Ordenar por tamaño de piezas de propóleos;

- ✿ Retirar piezas de más de 2 cm: son más fáciles de inspeccionar y separar para fines específicos.
- ✿ Los fragmentos más pequeños se pueden clasificar por tamices con aberturas graduadas.
- ✿ Los fragmentos más pequeños se clasifican como polvo;
- ✿ En este proceso, las piezas atascadas o enrolladas deben separarse.

(b) Ordenar por origen físico, organoléptico y botánico (si se conoce)

- ✿ Características físicas como el color y la consistencia: es necesario separar el propóleo más resinoso (pegajoso);
- ✿ Características organolépticas: considere principalmente el aroma, que es típico de ciertos tipos de propóleos;

## c) Ordenar por origen botánico:

Cuando se conoce el origen botánico, esta clasificación se vuelve particularmente interesante debido a su apreciación en el mercado.

Ejemplos:

- ☼ Baccharis propolis: verdoso, aroma característico y sabor picante;
- ☼ Propóleos de cola de aullador (género Dalbergia): color rojizo, sabor y aroma característicos.
- ☼ Lo ideal sería clasificar el propóleo por su composición química, que depende de la industria.

### 6.3- Secado de propóleos

Aunque el propóleo se compone básicamente de resinas, que prácticamente no retienen la humedad, debe estar lo suficientemente seco como para no favorecer el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos o mohos) y acelerar el proceso de degradación, con la oxidación de sus componentes.

El secado se puede realizar en un invernadero, con circulación de aire seco a temperatura ambiente (ideal entre 20 y 30 °C). El propóleo se coloca en bandejas, en capas de un máximo de 5 cm en tamices finos. Para secar piezas pequeñas (menos de 2 cm), encoja la capa hasta un máximo de 2 cm.

La Figura 18 muestra los detalles de un horno de secado de propóleos.

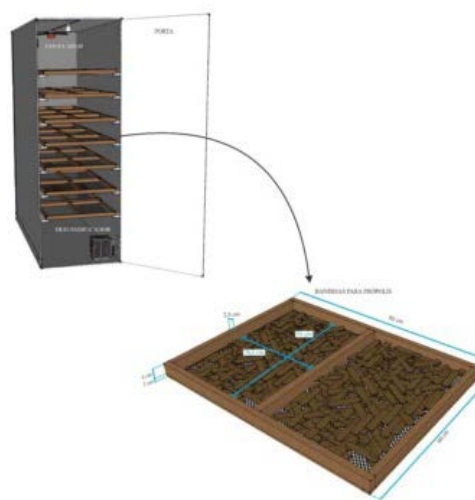


Figura 18 —Estufa de secado.

## Embalaje de propóleo y almacenamiento

### 6.4- Embalaje

Una vez clasificado y seco, el propóleo debe empacarse en envases herméticos y de calidad alimentaria, en una atmósfera modificada si es posible.

Uso de envases de plástico de grado alimenticio resistentes, no tóxicos, transparentes (no use plástico reciclado) de más de 0.2 mm de espesor.

### 6.5 Conservación y almacenamiento

El propóleo se puede almacenar y almacenar en frío es el proceso ideal para los apicultores que desean esperar más tiempo para su comercialización.

Se debe usar equipo (congelador) con capacidad proporcional a la cantidad producida, utilizado solo para este propósito (no almacenar con otros alimentos), ubicado en un ambiente limpio y seco. La temperatura debe ser inferior a -5°C (menos 5 grados). No lo guarde en el refrigerador ya que puede desarrollar moho.

La temperatura de almacenamiento del propóleo es el principal punto crítico a controlar, como medida preventiva el mantenimiento de las cualidades terapéuticas de este producto, los compuestos fenólicos y flavonoides son volátiles y las altas temperaturas, favoreciendo la pérdida de calidad de este producto.

## 6.6- Formulaciones con propóleos

### Ficha Técnica

**Producto: TINTURA DE PROPOLEOS AL 20 %.**

|                                                 | %  | 1000 ml | 300 ml |
|-------------------------------------------------|----|---------|--------|
| —Alcohol etílico al 70 % (caña o cereales)      | 80 | 800 ml  | 240 ml |
| —Propóleos bruto beneficiado molido o triturado | 20 | 200 g   | 60 g   |

### Técnica de fabricación:

#### 1. Maceración:

1. Se pesa el propóleos bruto previamente congelado y molido o triturado.
2. En recipiente de acero inoxidable, plástico o de cristal se mezclan el propóleos y el alcohol.
3. La mezcla de alcohol más propóleos se mantiene en maceración durante 7 días, agitando no menos de 3 veces al día.

#### 2. Filtración:

El filtrado se realiza en dos etapas, la primera con papel de filtro rápido y la segunda filtración con papel de filtro lento. Si fuera necesario se realiza una tercera filtración.

1. La tintura obtenida se envasa en frascos ámbar y se etiqueta.
2. Se embala en cajas por 30 frascos. Se sella y rotula.
3. Se almacena a temperatura ambiente.

### Observaciones:

Se exigen buenas prácticas de laboratorio y manufactura.

### Ficha Técnica

**Producto: TINTURA DE PROPOLEOS AL 30 %.**

|                                                 | %  | 1000 ml |
|-------------------------------------------------|----|---------|
| —Alcohol etílico al 80 % (caña o cereales)      | 70 | 700 ml  |
| —Propóleos bruto beneficiado molido o triturado | 30 | 300 g   |

### Técnica de fabricación:

#### 1. Maceración:

1. Se pesa el propóleos bruto previamente congelado y molido o triturado.
2. En recipiente de acero inoxidable, plástico o de cristal se mezclan el propóleos y el alcohol.
3. La mezcla de alcohol más propóleos se mantiene en maceración durante 7 días, agitando no menos de 3 veces al día.

## 2. Filtración:

El filtrado se realiza en dos etapas, la primera con papel de filtro rápido y la segunda filtración con papel de filtro lento. Si fuera necesario se realiza una tercera filtración.

1. La tintura obtenida se envasa en frascos ámbar y se etiqueta .
2. Se embala en cajas por 30 frascos. Se sella y rotula.
3. Se almacena a temperatura ambiente.

Observaciones:

Se exigen buenas prácticas de laboratorio y manufactura.

**Ficha Técnica****Producto: TINTURA DE PROPOLEOS AL 15 %.**

|                                                 | %  | 1000 ml | 300 ml |
|-------------------------------------------------|----|---------|--------|
| —Alcohol etílico al 70 % (caña o cereales)      | 85 | 850 ml  | 255 ml |
| —Propóleos bruto beneficiado molido o triturado | 15 | 150 g   | 45 g   |

**Técnica de fabricación:**

## 1. Maceración:

1. Se pesa el propóleos bruto previamente congelado y molido o triturado.
2. En recipiente de acero inoxidable, plástico o de cristal se mezclan el propóleos y el alcohol.
3. La mezcla de alcohol más propóleos se mantiene en maceración durante 10 días, agitando no menos de 3 veces al día.

## 2. Filtración:

El filtrado se realiza en dos etapas, la primera con papel de filtro rápido y la segunda filtración con papel de filtro lento. Si fuera necesario se realiza una tercera filtración.

1. La tintura obtenida se envasa en frascos ámbar y se etiqueta .
2. Se embala en cajas por 30 frascos. Se sella y rotula.
3. Se almacena a temperatura ambiente.

Observaciones:

Se exigen buenas prácticas de laboratorio y manufactura.

**Ficha Técnica****Producto: EXTRACTO BLANDO DE PROPOLEOS****Formulación para 1 L**

|                                                 | ml  | %  |
|-------------------------------------------------|-----|----|
| —Alcohol etílico 96 % (caña o cereales)         | 700 | 70 |
| —Propóleos bruto beneficiado molido o triturado | 300 | 30 |

## **Técnica de fabricación:**

### **1. Maceración:**

Se pesan los 300 gramos de propóleos bruto beneficiado previamente congelado y molido o triturado.

En recipiente de acero inoxidable, plástico o de cristal se mezclan el propóleos y el alcohol .

La mezcla de alcohol más propóleos se mantiene en maceración no menos de 10 días, agitando (removiendo) 2 ó 3 veces al día con ayuda de una paleta si fuera necesario

### **2. Filtración:**

El filtrado se realiza en dos etapas, la primera con papel de filtro rápido y la segunda filtración con papel de filtro lento. Si fuera necesario se realiza una tercera filtración.

### **3. Concentración:**

El extracto obtenido se somete al proceso de concentración (para la eliminación del alcohol), lo cual puede lograrse mediante destilación al vacío (industrialmente, con recuperación del alcohol) o de forma sencilla (para cantidades de 1 a 5 litros) colocando la tintura al baño María a 50° C o con ayuda de un secador de pelo o colocando la tintura en un horno a 30 ó 40° C. hasta su concentración, convirtiéndose en un extracto espeso.

#### **Ficha Técnica**

##### **Producto: MIEL CON PROPOLEOS.**

##### **Formulación para**

|                                       | %  | 500 g | 1000 g |
|---------------------------------------|----|-------|--------|
| —Miel pura de abejas                  | 97 | 485 g | 970 g  |
| —Extracto blando de propóleos diluido | 3  | 5 g   | 30 g   |

## **Técnica de fabricación:**

1. Se emplea recipiente de acero inoxidable de doble pared y agitador mecánico.
2. Se toman 200 g de miel y se le añade el extracto blando de propóleos diluido, mezclando previamente hasta total incorporación.
3. Se incorpora al resto del producto y se continúa la agitación hasta obtener mezcla uniforme.
4. Debe emplearse preferentemente a una temperatura de 38 a 40° C durante el proceso de agitación y un tiempo no menor de 30 minutos.
5. Se deja en reposo durante 2 – 3 horas y se envasa en frascos de color ámbar. Se etiqueta.
6. Se almacena a temperatura ambiente.

### Observaciones:

Se exigen buenas prácticas de laboratorio y manufactura.







# EL PROPÓLEO EN ANDALUCÍA

Bases para el desarrollo del propóleo apícola en Andalucía

**Fco. José Orantes Bermejo.**

Director Técnico de los Lab. Apinevada





|           |                                                                                                                                                 |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>9</b>  | <b>1. Propóleos</b>                                                                                                                             |
| 9         | 1.1. Definición.                                                                                                                                |
| 9         | 1.2. Composición.                                                                                                                               |
| 10        | 1.3. Uso del Propóleo en la colmena.                                                                                                            |
| 10        | 1.4. Comercio del propóleo.                                                                                                                     |
| 11        | 1.5. Usos de los Propóleos.                                                                                                                     |
|           | 1.5.1. Industria alimentaria (como conservante de alimentos)                                                                                    |
|           | 1.5.2. Medicina humana                                                                                                                          |
|           | 1.5.3. Algunas propiedades Terapéuticas                                                                                                         |
|           | 1.5.3.1. Antibacteriana.                                                                                                                        |
|           | 1.5.3.2. Antiviral.                                                                                                                             |
|           | 1.5.3.3. Cicatrizante y antiinflamatorio.                                                                                                       |
|           | 1.5.3.4. Inmunomodulador.                                                                                                                       |
|           | 1.5.3.5. Antioxidante.                                                                                                                          |
|           | 1.5.3.6. ¿Que son los antioxidantes?                                                                                                            |
|           | 1.5.3.7. ¿Qué son los radicales libres?                                                                                                         |
|           | 1.5.3.8. Los antioxidantes y los radicales libres.                                                                                              |
|           | 1.5.4. Listado de alimentos de origen vegetal y consumo habitual según su contenido en antioxidantes.                                           |
|           | 1.5.5. Capacidad antioxidante del propóleo en Andalucía y de algunas mieles amparadas con la Denominación de Origen Protegida «Miel de Granada» |
| <b>15</b> | <b>2. Métodos de recolección</b>                                                                                                                |
| 15        | 2.1. Sistema de malla o rejilla.                                                                                                                |
|           | 2.1.1. Medidas higiénicas de manejo                                                                                                             |
|           | 2.1.2. Obtención, almacenado y conservación.                                                                                                    |
| 16        | 2.2. Otros sistemas                                                                                                                             |
|           | 2.2.1. Sistema de Raspado                                                                                                                       |
|           | 2.2.2. Sistema del Colector Inteligente de Propóleos o cosecha por listones.                                                                    |
| 17        | 2.3. Control de calidad                                                                                                                         |
| <b>19</b> | <b>3. Características de algunos Propóleos cosechados en Andalucía</b>                                                                          |
| 19        | 3.1. Introducción                                                                                                                               |
|           | 3.1.1. Conocimiento del producto por parte del sector apícola.                                                                                  |
| 20        | 3.2. Muestreo                                                                                                                                   |
| 23        | 3.3. Experiencias de producción en colmenares situados en Granada.                                                                              |
| 24        | 3.4. Características organolépticas de los Propóleos ensayados                                                                                  |
|           | 3.4.1. Color, aspecto, olor, consistencia, sabor e impurezas mecánicas.                                                                         |
|           | 3.4.1.1. Color                                                                                                                                  |
|           | 3.4.1.2. Aspecto                                                                                                                                |
|           | 3.4.1.3. Olor                                                                                                                                   |
|           | 3.4.1.4. Consistencia, sabor e Impurezas mecánicas                                                                                              |
|           | 3.4.2. Humedad y cenizas                                                                                                                        |
| 28        | 3.5. Determinación del contenido en polifenoles y flavonoides.                                                                                  |
|           | 3.5.1. Determinación de fenoles totales (FT)                                                                                                    |
|           | 3.5.2. Determinación del contenido en flavonoides.                                                                                              |
|           | 3.5.3. Resultados y discusión.                                                                                                                  |
| 31        | 3.6. Determinación de la capacidad antioxidante                                                                                                 |
|           | 3.6.1. Introducción                                                                                                                             |
|           | 3.6.2. Método DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)                                                                                             |
|           | 3.6.3. Método ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid)                                                                        |
|           | 3.6.4. Resultados y Discusión.                                                                                                                  |
| 36        | 3.7. Identificación de los principales componentes de los Propóleos recogidos                                                                   |
| 42        | 3.8. Contenido en minerales y metales                                                                                                           |
| 44        | 3.9. Contaminación biótica y abiótica                                                                                                           |
|           | 3.9.1. Acaricidas, plaguicidas, fungicidas y pesticidas                                                                                         |
|           | 3.10. Antibióticos                                                                                                                              |
| <b>46</b> | <b>4. Conclusiones</b>                                                                                                                          |
| <b>47</b> | <b>5. Agradecimientos</b>                                                                                                                       |
| <b>48</b> | <b>6. Bibliografía</b>                                                                                                                          |



---

# 1. PROPÓLEOS

---

## 1.1.– Definición

El término «propóleo» proviene del griego Propóleos ('pro': delante o en defensa de, y 'polis': ciudad), es decir delante o en defensa de la colmena) y es utilizado en su acepción original, sin cambios en casi todas las lenguas indoeuropeas. En español es denominado propóleos.

Los propóleos se pueden definir como una mezcla compleja de origen biológico elaborado a partir de resinas, bálsamos, gomas y otras exudaciones de las plantas, que la abeja *Apis mellifera* recoge de las plantas y posteriormente modifica, química y físicamente, adicionándoles cera, polen y enzimas entre otros materiales. (Fotografía n° 1) *Apis mellifera* recolecta resinas desde diversas plantas (Vanhaelen y Vanhaelen-Fastré, 1979), y las modifica enzimáticamente antes de incorporarlas al propóleo (Ghisalberti, 1979), por



Fotografía n° 1.- Las abejas recolectan las resinas necesarias para elaborar los propóleos de las yemas y otras partes de los árboles (álamos, castaños, pinos, etc...).

lo tanto la composición química de los propóleos variará al menos de acuerdo a la flora de cada región (Greenaway et al., 1990; Ghisalberti, 1979; Markham et al., 1996). Los constituyentes de los propóleos varían en función del clima, la estación de recolección, el lugar de recolección y el año, siendo muy variable su fórmula química. (Ghisalberti, 1979; Cheng and Wong, 1996).

De forma general podemos decir que el Propóleo proveniente de las zonas templadas (Asia, Europa, Norte América, etc...) contiene predominantemente compuestos fenólicos recolectados principalmente de los álamos y chopos (*Populus* spp.), (Tomas-Barberan et al., 1993). El resto de fuentes principales de recolección son los castaños, robles, encinas, avellanos, jaras y pinos. En Brasil destaca el propóleo procedente de *Baccharis* sp. rico en diterpenos.

## 1.2.– Composición

Su composición química es bastante compleja. Básicamente se compone de un 50-55% de resinas y bálsamos, 30-40% de cera de abeja, 5-10% de aceites esenciales o volátiles, 5% de polen y 5% de materiales diversos (orgánicos y minerales).

La composición de los propóleos depende básicamente de las fuentes vegetales donde se originaron y de la función específica dentro de la colonia. Trabajos preliminares han encontrado mayor porcentaje de compuestos fenólicos en el propóleo que recubre los panales que en el destinado a reducir las piqueras.

Se han identificado más de 160 compuestos, de los cuales un 50% son compuestos fenólicos, a los cuales se les atribuye acción farmacológica. Los principales fenoles identificados son: flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas, triglicéridos fenólicos.

Como hemos indicado, los flavonoides y los ácidos fenólicos junto con sus ésteres, son genéricamente denominados «compuestos fenólicos», siendo los principales compuestos bioactivos del propóleo (Bankova et al, 2000). Estos compuestos tienen como misión absorber la radiación en la región ultravioleta del espectro electromagnético y protegen de la radiación solar a los tejidos vegetales más sensibles. Los flavonoides más comunes en las plantas y en el propóleo son: apigenina, kaempferol, pinocembrina, galangina, quercetina, y hesperidina. Estos compuestos poseen importantes propiedades antioxidantes minimizando la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo de esta manera a reducir el riesgo de afecciones cardiovasculares (Hertog et al., 1993) y el envejecimiento.

### 1.3.– Uso del Propóleo en la colmena

Las abejas pecoreadoras recogen el propóleo de las plantas y árboles. Para ello usan sus mandíbulas y se ayudan con el primer par de patas. En las mandíbulas, la secreción de las glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxidecanoico) permite el ablandamiento para triturarlo y transportarlo a las cestillas (tercer par de patas). Al ingresar a la colmena, se dirigen inmediatamente al lugar donde éste es requerido y permanecen quietas, permitiendo a las abejas propolizadoras, tomar algunas partículas de la sustancia, comprimirlas y agregarles cera para proceder al propolizado.

Las abejas utilizan el propóleo para múltiples usos:

- Cerrar grietas en el interior de la colmena, controlando las corrientes de aire.
- Cerrar las vías de acceso a la colmena (como la piquera) con el fin de impedir el robo, pillaje, entrada de depredadores, etc..
- Para barnizar el interior de la colmena (incluidos los panales) con fines desinfectantes.
- Consolidar los componentes estructurales del interior de la colmena, aumentando la resistencia de cuadros, tabiques, etc..
- También es utilizado para recubrir los cadáveres de los enemigos que se hayan introducido en la colmena (escarabajos, roedores, lagartijas, etc.), que quedan embalsamados evitando su descomposición.
- Evitar movimientos o vibraciones de los panales.

### 1.4.– Comercio del propóleo

En la actualidad no hay demasiados datos estadísticos sobre el comercio mundial del propóleo.

Japón es el primer importador mundial de propóleos y el país de mayor consumo en el planeta, se estima que importa sobre las 7100 Tn. Tras este país estaría Alemania cuyas importaciones llegan a los 4600 Tn.

Los principales países exportadores del propóleo son Brasil y China.

Según las fuentes consultados los precios del propóleo varían mucho, desde 35 €/kgr hasta 300 €/kg el procedente de explotaciones ecológicas.

En el Anexo II podrás encontrar un directorio de algunas empresas españolas que compran Propóleo.

## 1.5.– Usos de los Propóleos

A medida que se comienza a identificar las sustancias y los principios activos en los cuales residen muchas de las aplicaciones de los propóleos, este producto de la colmena ha dejado de ser un subproducto secundario para el apicultor y lleva el camino de convertirse en uno de los productos «estrellas» del colmenar.

Actualmente tanto la industria farmacéutica como la alimentaria están utilizando principios activos procedentes de los propóleos para diversos usos.

### 1.5.1.– Industria alimentaria (como conservante de alimentos)

En muchos países, se lo utiliza como aditivo por sus propiedades antioxidantes y antisépticas. Unas gotas de solución de propóleos incluidas en productos envasados o en alimentos frescos, pueden prolongar entre dos y tres veces su vida útil. Esto ha sido comprobado en experiencias realizadas con pescados congelados, grasas y aceites, y podrían extenderse a otra clase de alimentos tales como carne vacuna, cordero, cerdo, pollo, fruta, etc. Es muy útil, además, para mejorar la calidad del ron y otras bebidas alcohólicas. En algunos países, se han efectuado estudios con resultados positivos para conservar el mango semielaborado con propóleos, logrando detener el crecimiento de *Aspergillus niger*, organismo responsable del deterioro de pulpas de frutas.

Los elementos más utilizados del propóleos por las industrias japonesas son el ácido benzoico (como conservante de alimentos) y los flavonoides. El ácido benzoico del propóleos está siendo utilizado como conservante para la gaseosa de mayor consumo en Japón y también por toda la industria alimenticia relacionada a los pescados y frutos del mar.

### 1.5.2.– Medicina humana

Pero sin duda el propóleos despierta enorme interés por las propiedades terapéuticas. Ya en el año 1700 años a.C. los egipcios observaron en el propóleos la capacidad de evitar la descomposición de los cadáveres, utilizándolo en la técnica de embalsamar. A principios de siglo la medicina reconoció «oficialmente» en el propóleos propiedades terapéuticas. Los cirujanos ingleses comprobaron la acción cicatrizante del propóleos y atribuyeron a ello la baja mortandad por gangrena registrada a principios de siglo en la guerra de Los Boers. El estudio científico del propóleos se inició en la década del 60 en los países de Europa del Este. En algunos países se ha reconocido como producto medicinal y cuentan con normas de calidad propias.

### 1.5.3.– Algunas propiedades terapéuticas

#### 1.5.3.1. Antibacteriana

Es una de las primeras propiedades constatadas de los Propóleos, múltiples estudios bacteriológicos in vivo e in vitro han confirmado su acción bacteriostática y bactericida (Serra, y cols, 1994, Fernández y cols (2001); Melliou y Chinou (2004); Kosalec y cols, 2005; Popova y cols, 2005 ) demostrándose capacidad de inhibición sobre al menos 25 cepas bacterianas y 20 mohos.

Los principales responsables de esta propiedad son los flavonoides como la galangina y la pinocembrina y los derivados de los ácidos benzoico, ferúlico y caféico. Estudios recientes han encontrado que el ácido cinámico y algunos flavonoides desactivan la energía de la membrana citoplasmática, inhibiendo la motilidad bacteriana y haciéndola más vulnerable al ataque del sistema inmunológico. Así mismo se ha determinado que estos principios activos desorganizan el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular causando bacteriolisis parcial e inhibiendo la síntesis proteica.

Itoh y col. (1994) y Bignall (1993) han estudiado la capacidad antimicrobiana del propóleo y de la miel ante el *Helicobacter pylori* (úlceras gastroduodenales), identificándose a varios flavonoides como responsables de dicha capacidad (pinocembrina, galangina y la crisina). Concluyendo en la enorme trascendencia terapéutica del propóleo para encarar el tratamiento de la patología gástrica, con más ventajas que los tratamientos actuales.

### 1.5.3.2. Antiviral

Amoros y cols., (1994) y Dmitrescu y cols., (1993) han demostrado acción de los propóleos frente al herpes tipo 1 y 2, pero también ante poliovirus, estableciendo que se reduce la síntesis del ADN viral y que los responsables son flavonoides, que actúan en sinergismo con un éster del ácido cafeico y el ácido ferúlico.

Harish y cols., (1997) estudiaron la capacidad del Propóleo de suprimir la replicación del VIH-1 y su efecto inmunoestimulante, considerando que se trata de un área trascendente para la salud pública mundial por la ausencia de tratamiento curativo y su alto costo, que deja fuera de posibilidades terapéuticas a millones de habitantes.

### 1.5.3.3. Cicatrizante y antiinflamatorio

El propóleo ha ganado espacios importantes en el tratamiento de heridas, por su capacidad antibacteriana y por su notable capacidad cicatrizante y antiinflamatoria. Esto último es comparable a la de antiinflamatorios de síntesis como el diclofenac (Fierro, 2000).

Se ha señalado al ácido cafeico como responsable de inhibir la dihidrofolato reductasa, reduciendo la producción de interleuquinas y prostaglandinas. Mirzoeva y Calder (1996) atribuyen esta acción del propóleo a un éster del ácido cafeico (CAPE), el ácido cafeico y a la quercetina. Empleando modelos «in vivo» e «in vitro» constataron que el propóleo suprime la vía de la lipooxigenasa del ácido araquidónico.

El propóleo se emplea en medicina para tratar heridas con superiores resultados a los obtenidos con «cicatrizantes» de origen sintético. Desde 1985 se emplea el propóleo para tratar pacientes con heridas de diferente naturaleza (quemaduras, politraumatizados, pie diabético, etc) (Torres, 1996; Fierro, 2000).

Fierro (2000) ha realizado estudios clínicos en Uruguay, señalando que los pacientes concurren al hospital con heridas infectadas y son tratados con apósitos de Propóleos al 2 % y un antibiótico, evolucionan de forma más favorable comparados con la evolución de pacientes tratados con otros medidas y antibióticos. Ello obedece a la acción antibacteriana directa pero también a la indirecta de los propóleos. Se trata de la capacidad que posee el Propóleo de potenciar la acción de varios antibióticos como la *penicilina*, *estreptomina*, *cloxacilina* y la *cefradina*.

### 1.5.3.4. Inmunomodulador

Diversos trabajos demuestran que el propóleo estimula la inmunidad inespecífica y la específica, tanto inmunidad celular (linfocitos T) como la humoral (linfocitos B). En ratones infectados con el virus influenza tipo A y tratados con propóleos, se constató un aumento de los linfocitos T, un mayor nivel de fagocitosis y una menor mortalidad, en comparación con animales testigo no tratados (Fierro, 2000).

Reyes Rodríguez (1991) mostró resultados positivos con el empleo de Propóleos en pacientes con inmunodeficiencia, evaluando su respuesta en niños con síndrome respiratorio alto o bajo recidivante y con inmunodepresión celular o mixta, lográndose primero una mejoría clínica y luego la normalización paraclínica. Se ha comprobado que el propóleo estimula la actividad de los macrófagos a casi el doble y aumenta el número de linfocitos incrementándose la respuesta inmune.

#### 1.5.3.5. Antioxidante

En los últimos años ha tomado relevancia el consumo de antioxidantes, en especial los de origen natural, para la prevención de enfermedades de gran trascendencia como la aterosclerosis, reuma e incluso el cáncer.

Recientemente se ha publicado en una revista de la AHA (American Heart Association) un trabajo donde se estudia la capacidad antiaterosclerosis de los propóleos, gracias a un ester del ácido caféico (CAPE), un flavonoide natural que se encuentra en el propóleos (Hishikawa y cols., 2005). La AHA es un centro de referencia mundial en patología cardiovascular

La AHA en 1999 formuló las pautas dietéticas dirigidas a reducir el riesgo de enfermedad coronaria: «la recomendación más prudente y científicamente ostensible para la población en general es consumir una dieta equilibrada en frutas y verduras ricas en antioxidantes y los cereales enteros».

El propóleo es la fuente natural de flavonoides más importante entre los productos agrarios y ganaderos. Protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación (Krell, 1996). Sus propiedades antioxidantes se deben a su capacidad antiradicalaria (radicales alcoxi y superóxido) y al efecto inhibidor sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de lipoproteínas de baja intensidad (Pascual y cols, 1994)

También se ha demostrado su efecto sobre trastornos del hígado, donde los flavonoides bloquean la oxidación de lípidos. Ejerce efectos antioxidantes en el colon, disminuyendo la concentración de hidroperoxidasas lipídicas y como algunos de sus componentes se absorben y pasan a la circulación, actúan como antioxidantes hidrofílicos y aumentan la concentración tisular de Vitamina C (Sun y cols, 2000).

En pacientes con episodios isquémicos el propóleos parece reducir el riesgo de accidentes cerebrovasculares (Samoliuk, 1995)

El propóleos posee una potente capacidad antioxidante, que le permite adquirir insospechables perspectivas de desarrollo.

#### 1.5.3.6. ¿Que son los antioxidantes?

Son compuestos existentes en determinados alimentos que tienen la capacidad de protegernos frente a los radicales libres, causantes de los procesos de envejecimiento y de algunas otras enfermedades.

#### 1.5.3.7. ¿Qué son los radicales libres?

Son moléculas «desequilibras», con átomos que tienen un electrón en capacidad de aparearse, por lo que son muy reactivos. Estos radicales recorren nuestro organismo intentando captar un electrón de las moléculas estables, con el fin de lograr su estabilidad electroquímica y con potenciales reacciones en cadenas destructoras de nuestras células.

#### 1.5.3.8. Los antioxidantes y los radicales libres

Los antioxidantes retrasan el proceso de envejecimiento combatiendo la degeneración y muerte de las células que provocan los radicales libres. La incapacidad de nuestro cuerpo para neutralizar los radicales libres a los que nos exponemos diariamente nos obliga a recurrir a alimentos con la propiedades antioxidantes con capacidad de neutralizarlos.

#### 1.5.4.– Listado de alimentos de origen vegetal y consumo habitual según su contenido en antioxidantes.

| Nombre           | Total antioxidantes (mmol/100g) |
|------------------|---------------------------------|
| Nuez             | 20,97                           |
| Granada          | 11,33                           |
| Fresa            | 6,88                            |
| Pipas de girasol | 5,39                            |
| Frambuesa        | 3,06                            |
| Uva              | 1,45                            |
| Naranja          | 1,14                            |
| Ciruela          | 1,06                            |
| Piña             | 1,04                            |
| Limón            | 1,02                            |
| Espinacas        | 0,98                            |
| Kivi             | 0,91                            |
| Clementina       | 0,90                            |
| Espárrago        | 0,85                            |
| Cebolla          | 0,67                            |
| Brócoli          | 0,58                            |
| Avellana         | 0,49                            |
| Aguacate         | 0,41                            |
| Lechuga          | 0,34                            |
| Tomate           | 0,31                            |
| Almendra         | 0,30                            |
| Manzana          | 0,29                            |
| Coliflor         | 0,23                            |
| Ajo              | 0,21                            |
| Pera             | 0,18                            |
| Arroz            | 0,17                            |
| Patata           | 0,09                            |
| Pepino           | 0,05                            |
| Zanahoria        | 0,04                            |
| Sandía           | 0,04                            |

Tabla nº 1. —(Fuente: A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants, American Society for Nutritional Sciences, 2002).

#### 1.5.5.– Capacidad antioxidante del propóleo en Andalucía y de algunas mieles amparadas con la Denominación de Origen Protegida «Miel de Granada»

(Como vemos el propóleo, es sin lugar a dudas la fuente de antioxidantes naturales más importante de la naturaleza.

| Nombre                                 | Total antioxidantes (μmol/g)* | Total antioxidantes (mmol/100g) |
|----------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Miel de Aguacate DOP Miel del Granada  | 2,7                           | 0,27                            |
| Miel de Aguacate DOP Miel del Granada  | 2,5                           | 0,25                            |
| Miel de la Sierra DOP Miel del Granada | 3,6                           | 0,36                            |
| Miel de Castaño DOP Miel del Granada   | 5,9                           | 0,59                            |
| Miel de Castaño DOP Miel del Granada   | 6,5                           | 0,65                            |
| <b>Propóleo Andalucía</b>              | <b>2540</b>                   | <b>254,0</b>                    |

Tabla nº 2.  
—(TEAC\*: Trolox equivalent antioxidant capacity).

## 2. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN

Existen diversos métodos para recolectar el propóleo e incentivar a las abejas a la producción del mismo. La elección es importante ya que del método de recolección dependerá el rendimiento y la calidad del mismo.

### 2.1.– Sistema de malla o rejilla

Es el más utilizado en la actualidad, ya que es práctico, cómodo, higiénico y de bajo coste. El sistema se basa en el instinto de la abeja para cubrir los espacios libres en la colmena. (Fotografía nº 2)

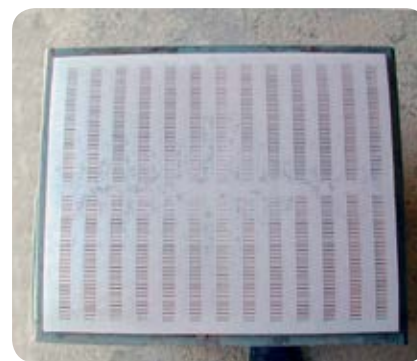
Consiste en colocar una malla o rejilla de plástico sobre los cabezales de los cuadros, especialmente fabricada para estos fines. El espacio de las rejillas debe ser unos 4.0 mm – 4.5 mm, para invitar a su sellado con propóleo, ya que si el espacio es mayor, las abejas pueden tomarlo como una zona más de tránsito.

Conviene que la malla sea un poco más pequeña que la superficie de la colmena a cubrir, de esta manera, cuando se sellen las bandas que coincidirán con los huecos de los cabezales (espacio intercentímetros y así aprovechar la máxima la superficie de la misma.

Las mallas deben ser colocadas sobre la última alza, antes de colocarle el techo (obviamente, si utilizamos entretapa, debemos colocar la malla debajo de la entretapa). En las colmenas Layens, si queremos obtener rendimientos adecuados, deberemos usar cuadros con cabezales abiertos.

Una malla «casera» y económica, que ofrece buenos resultados es la construida con «tela mosquitera».

El sistema es muy ventajoso, ya que de una parte es higiénico y de otra, la malla se convierte en un elemento más de la colmena, sin producir una modificación en las colmenas ni en el resto de las producciones apícolas.



Fotografía nº 2.- Malla colocada sobre una colmena, antes de colocar la tapa.

### 2.1.1.– Medidas higiénicas de manejo

Una vez colocadas las mallas, en las visitas de inspección y/o trabajo en el colmenar, se han de tomar al menos las siguientes precauciones:

- ✿ Cogér siempre por los extremos las mallas
- ✿ Colarlas en recipientes adecuados durante la inspección de las colmenas, evitando:
  - Contacto con el suelo
  - Contacto con superficies exteriores de la colmena (tapa, paredes, etc...)
  - Exposición prolongada a la luz solar.
- ✿ No realizar tratamientos mientras estén colocadas, programando los tratamientos.
- ✿ Evitar el ahumador sobre la malla, al inspeccionar las colmenas, ya que podemos transferir al propóleo olores, sabores y contaminarlo con sustancias procedentes del material utilizado como combustible.

### 2.1.2.– Obtención, almacenado y conservación

Es necesario disponer de un recipiente adecuado para transportar las mallas, preferiblemente plástico alimentario con su correspondiente tapa.

Una vez la malla esté cubierta con el propóleos, ubicaremos la misma en la caja de transporte, evitando manipulaciones excesivas.

En el almacén, observando siempre las prácticas higiénicas adecuadas, sacaremos las mallas y las meteremos en un congelador. Tal cual están o bien enrolladas en forma de diploma, dependiendo del grosor de la misma.

Pasadas unas horas, el frío hará que el propóleo (de consistencia untuosa) se endurezca, y blandiendo la malla conseguiremos que se desprenda de la misma.

El propóleos bruto lo depositaremos, sin apelmazar, en botes de cristal topacio de boca ancha en cantidades de aproximadamente 1 kgr.

Lo conservaremos a unos 10°C - 15°C en un lugar fresco, seco y oscuro. Aunque es un producto estable, no debe demorar demasiado su venta para evitar deterioro de su actividad biológica. Los Almacenamientos prolongados, disminuyen los contenidos en flavonoides, y por tanto también la capacidad inhibidora de los propóleos, hasta un 20% en un año a temperatura ambiente (Serra y Ventura, 2000)

## 2.2.– Otros sistemas

### 2.2.1.– Sistema de Raspado

Sistema sencillo que consiste en raspar el propóleos con un utensilio adecuado de las paredes de la colmena y de los cabezales de los cuadros.

Es una tarea que se debe realizar en invierno, para evitar problemas en la colmena y para hacer la tarea más fácil. En el invierno, por las bajas temperaturas, el propóleos está duro y resulta fácil extraerlo raspándolo.

No obstante no es un sistema aconsejado, ya que presenta muchos inconvenientes:

- ✿ Sistema poco higiénico
- ✿ Los rendimientos pueden ser más bajos, pues se arrastra mucha cera y madera, dependiendo de la zona a raspar.

- ☼ Los propóleos obtenidos de zonas expuestas al sol (como la piquera) tienen poca calidad.
- ☼ Podemos arrastrar pintura de los marcos y de la colmena, contaminándolo.

### 2.2.2.– Sistema del Colector Inteligente de Propóleos o cosecha por listones.

Es un sistema que se está expandiendo en algunos países con condiciones climáticas adecuadas.

Básicamente consiste en disponer sobre la colmena de un alza a la que se ha desprovisto de los laterales, sustituyendo la madera por guías y dejando mucho espacio libre entre estos listones o guías. (Fotografía nº 3)

—Fotografía nº 3. «Colector inteligente de propolis», sistema emergente en algunos países sudamericanos.



De esta manera estamos obligando a las abejas a propolizar estos espacios ya que la colmena no tiene protección en esos flancos. Hay que tener en cuenta que mientras en otros sistemas estamos recolectando el propóleo cosechado por una colmena desde una perspectiva de unas necesidades básicas, con este sistema estamos obligando a la colmena a propolizar, es decir, estamos cambiando la orientación productiva de nuestro colmenar, hecho que tendremos que tener en cuenta ya que va en detrimento de la producción de miel.

Los rendimientos son muy altos, pero hay que estudiar muy bien la ubicación de las colmenas, los recursos para obtener suficiente propóleos, así como las condiciones climáticas de cada zona, ya que puede presentar muchos problemas.

- ☼ Estrés y frío en la colmena
- ☼ Abandono de la colmena. Muerte por frío
- ☼ Desprotección ante depredadores
- ☼ Bajos rendimientos en las cosechas de miel, polen y/o cera.
- ☼ Baja calidad del propóleo obtenido al estar permanentemente expuesto a las condiciones ambientales, especialmente al sol.

### 2.3.– Control de calidad

Previo a ofertar el producto y conocer sus características es recomendable chequear una serie de parámetros que influirán en el precio final del producto.

- ☼ Microbiología
- ☼ Metales pesados (Cadmio, Plomo y Mercurio)
- ☼ Rendimiento
- ☼ Contenido en polifenoles totales y flavonoides
- ☼ Humedad y cenizas



---

## 3. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS PROPÓLEOS COSECHADOS EN ANDALUCÍA

---

### 3.1.– Introducción

Andalucía tiene sobre el papel una gran capacidad para producir Propóleos. Nuestras sierras están pobladas de encinas, alcornoques y pinos; y nuestros valles y bosques de galería de abedules y álamos. Además de plantas de porte arbustivo de donde las abejas obtienen las resinas necesarias para elaborar los Propóleos.

Sin embargo hay un total desconocimiento sobre este producto siendo muy pocos los apicultores que recolectan el propóleos, la mayoría lo desechan de forma sistemática al limpiar las colmenas.

Hay dos datos interesantes:

- a.- En censo colmenero en Andalucía supera ya las 500.000 colmenas.
- b.- El propóleo apícola se cotiza entre 35 - 300 euros/kg dependiendo de su calidad.

Basta hacer unos simples cálculos para comprobar que se está perdiendo varios millones de euros de las rentas agrarias de las explotaciones apícolas andaluzas.

A medida que se comienza a identificar las sustancias y los principios activos en los cuales residen muchas de las aplicaciones de los Propóleos, este producto de la colmena ha dejado de ser un subproducto secundario para el apicultor y lleva el camino de convertirse en uno de los productos «estrellas» del colmenar.

En este marco se planteó este estudio, buscando una aproximación a las producciones actuales que permitan profundizar en otros aspectos en el futuro.

#### 3.1.1.– Conocimiento del producto por parte del sector apícola

Entre los objetivos del proyecto estaba pasar una encuesta al sector para conocer algunos datos sobre como se encontraba el mercado del Propóleos en Andalucía.

En un principio, con el fin de obtener las muestras para el estudio contactamos con varias decenas de apicultores andaluces. Todos manifestaban conocer el producto y casi nadie conocía precios de mercado del mismo en bruto. Sólo una apicultora realizó una venta puntual del propóleo ecológico a 100 €/kg.

El 100% del Propóleo recibido en el laboratorio por los apicultores era «propóleos raspado» y como hemos indicado, a pesar de que todos manifestaban conocer el producto, tuvimos que desechar casi el 62% de las muestras recibidas. Fundamentalmente por dos razones:

- ☼ La muestra remitida no era propóleo, sino ceras raspadas.
- ☼ Las cantidades de cera, astillas y otros elementos procedentes del raspado eran tan altas que los rendimientos de las muestras eran muy bajos y obteníamos cantidades insuficientes de muestra para las necesidades analíticas requeridas, por lo que las muestras eran desechadas.

Ante esta situación el laboratorio seleccionó las muestras recibidas y realizó su propio muestreo. Así mismo abandonamos la idea de la encuesta por considerar que no iba a aportar datos interesantes en el estudio.

### 3.2.– Muestreo

Las muestras fueron recogidas por los responsables del estudio entre Octubre de 2004 y Febrero de 2005 y conservadas a 4°C hasta realizar los análisis oportunos.

En total se han analizado 33 muestras, entre las muestras remitidas por los apicultores y las recogidas por los responsables del estudio, buscando una representación de las sierras más importantes en Andalucía (Sierra Nevada, Cazorla, Alcornocales, Sierra Morena, etc...) (Figura nº 1 y Tabla nº 3).

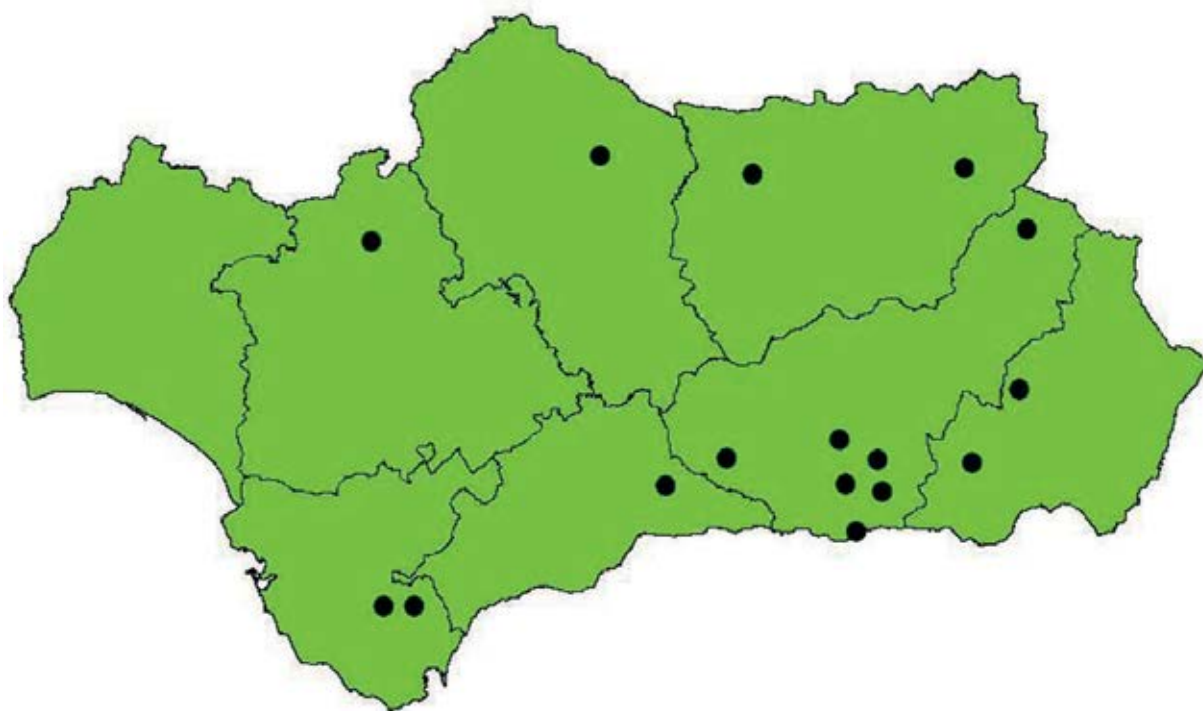


Figura nº 1. —Procedencia de las muestras de propóleos.

|            | PROCEDENCIA                    | LOCALIDAD     | PROVINCIA |
|------------|--------------------------------|---------------|-----------|
| MUESTRA 1  | SIERRA NEVADA - LAS ALPUJARRAS | LANJARÓN      | GRANADA   |
| MUESTRA 2  | SIERRA NEVADA - LAS ALPUJARRAS | ORGIVA        | GRANADA   |
| MUESTRA 3  | SIERRA DE BAZA                 | ALCONTAR      | ALMERIA   |
| MUESTRA 4  | SIERRA NEVADA - LAS ALPUJARRAS | TORVIZCON     | GRANADA   |
| MUESTRA 5  | SIERRA NEVADA - LAS ALPUJARRAS | ORGIVA        | GRANADA   |
| MUESTRA 6  | MONTE DEL PUEBLO               | CACÍN         | GRANADA   |
| MUESTRA 7  | SIERRA NEVADA                  | QUENTAR       | GRANADA   |
| MUESTRA 8  | SIERRA NEVADA                  | QUENTAR       | GRANADA   |
| MUESTRA 9  | LOS ALCORNOCALES               | JEREZ         | CADIZ     |
| MUESTRA 10 | LOS ALCORNOCALES               | JEREZ         | CADIZ     |
| MUESTRA 11 | SIERRA DE LA GARNATILLA        | MOTRIL        | GRANADA   |
| MUESTRA 12 | SIERRA DE LA CONTRAVIESA       | MOTRIL        | GRANADA   |
| MUESTRA 13 | SIERRA NEVADA - LAS ALPUJARRAS | BERJA         | ALMERIA   |
| MUESTRA 14 | SIERRA NEVADA                  | GUEJAR SIERRA | GRANADA   |
| MUESTRA 15 | LAS ALPUJARRAS                 | LANJARÓN      | GRANADA   |
| MUESTRA 16 | LAS ALPUJARRAS                 | ORGIVA        | GRANADA   |
| MUESTRA 17 | LAS ALPUJARRAS                 | LANJARÓN      | GRANADA   |
| MUESTRA 18 | LAS ALPUJARRAS                 | CAPILEIRA     | GRANADA   |
| MUESTRA 19 | LAS ALPUJARRAS                 | LANJARÓN      | GRANADA   |
| MUESTRA 20 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | GRANADA   |
| MUESTRA 21 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | GRANADA   |
| MUESTRA 22 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | GRANADA   |
| MUESTRA 23 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | GRANADA   |
| MUESTRA 24 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | GRANADA   |
| MUESTRA 25 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | GRANADA   |
| MUESTRA 26 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | GRANADA   |
| MUESTRA 27 | SIERRA NEVADA                  | GUEJAR SIERRA | GRANADA   |
| MUESTRA 28 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | GRANADA   |
| MUESTRA 29 | SIERRAS DE TEJEDA Y ALMIJARA   | CÓMPETA       | MÁLAGA    |
| MUESTRA 30 | SIERRA MORENA                  | HORNACHUELOS  | CÓRDOBA   |
| MUESTRA 31 | SIERRA MORENA                  | ANDUJAR       | JAÉN      |
| MUESTRA 32 | SIERRA NORTE DE SEVILLA        | CAZALLA       | SEVILLA   |
| MUESTRA 33 | SIERRA DE CAZORLA              | POZO ALCÓN    | JAÉN      |

Tabla nº 3. —Procedencia de las muestras de propóleos estudiadas.

La vegetación principal alrededor de los colmenares donde recogimos las muestras por monte bajo (plantas aromáticas), encinas, castaños, álamos etc.. ( Tabla nº 4).

|            | PROCEDENCIA                    | LOCALIDAD     | VEGETACIÓN                                                                            |
|------------|--------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| MUESTRA 1  | SIERRA NEVADA – LAS ALPUJARRAS | LANJARÓN      | Matorral de aromáticas, castaños y vega con álamos, eucaliptos y naranjos.            |
| MUESTRA 2  | SIERRA NEVADA – LAS ALPUJARRAS | ORGIVA        | Matorral de aromáticas, castaños y vega con álamos, eucaliptos y naranjos.            |
| MUESTRA 3  | SIERRA DE BAZA                 | ALCONTAR      | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 4  | SIERRA NEVADA – LAS ALPUJARRAS | TORVIZCON     | Matorral de aromáticas, encinas y almendros                                           |
| MUESTRA 5  | SIERRA NEVADA – LAS ALPUJARRAS | ORGIVA        | Matorral de aromáticas, castaños y vega con álamos, eucaliptos y naranjos.            |
| MUESTRA 6  | MONTE DEL PUEBLO               | CACÍN         | Matorral de aromáticas y encinas                                                      |
| MUESTRA 7  | SIERRA NEVADA                  | QUENTAR       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 8  | SIERRA NEVADA                  | QUENTAR       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 9  | LOS ALCORNOCALES               | JEREZ         | Matorral de aromáticas y especies de Quercus sp.                                      |
| MUESTRA 10 | LOS ALCORNOCALES               | JEREZ         | Matorral de aromáticas y especies de Quercus sp.                                      |
| MUESTRA 11 | SIERRA DE LA GARNATILLA        | MOTRIL        | Matorral de aromáticas, encinas y cultivos subtropicales (Aguacates, Chirimoyas, etc) |
| MUESTRA 12 | SIERRA DE LA CONTRAVIESA       | MOTRIL        | Matorral de aromáticas y encinas                                                      |
| MUESTRA 13 | SIERRA NEVADA – LAS ALPUJARRAS | BERJA         | Matorral de aromáticas y encinas                                                      |
| MUESTRA 14 | SIERRA NEVADA                  | GUEJAR SIERRA | Matorral de aromáticas y castaños                                                     |
| MUESTRA 15 | LAS ALPUJARRAS                 | LANJARÓN      | Matorral de aromáticas y castaños                                                     |
| MUESTRA 16 | LAS ALPUJARRAS                 | ORGIVA        | Matorral de aromáticas, castaños y eucaliptos                                         |
| MUESTRA 17 | LAS ALPUJARRAS                 | LANJARÓN      | Matorral de aromáticas y castaños                                                     |
| MUESTRA 18 | LAS ALPUJARRAS                 | CAPILEIRA     | Matorral de aromáticas y encinas                                                      |
| MUESTRA 19 | LAS ALPUJARRAS                 | LANJARÓN      | Matorral de aromáticas y castaños                                                     |
| MUESTRA 20 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 21 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 22 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 23 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 24 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 25 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 26 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 27 | SIERRA NEVADA                  | GUEJAR SIERRA | Matorral de aromáticas y castaños                                                     |
| MUESTRA 28 | SIERRA DE LA SAGRA             | HUESCAR       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 29 | SIERRAS DE TEJEDA Y ALMIJARA   | CÓMPETA       | Matorral de aromáticas y encinas                                                      |
| MUESTRA 30 | SIERRA MORENA                  | HORNACHUELOS  | Matorral de aromáticas y encinas                                                      |
| MUESTRA 31 | SIERRA MORENA                  | ANDUJAR       | Matorral de aromáticas y encinas                                                      |
| MUESTRA 32 | SIERRA NORTE DE SEVILLA        | CAZALLA       | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |
| MUESTRA 33 | SIERRA DE CAZORLA              | POZO ALCÓN    | Matorral de aromáticas, encinas y pinos                                               |

Tabla nº 4. —Vegetación en la zona de recogida de las muestras de propóleos.

### 3.3.– Experiencias de producción en colmenares situados en Granada

En dos colmenares experimentales del Consejo Regulador Miel de Granada, hemos realizado durante el período noviembre de 2004 a noviembre de 2005 experiencias para conocer cual sería los rendimientos de propóleos por colmena y año.

#### a.- Situación de los colmenares

Colmenar 1.- Situado en Órgiva (Granada) a pie de las Alpujarras. La vegetación de la zona estaba compuesta por matorral bajo (tomillo, romero y retamas) y muy cercano un valle de olivos y naranjos con una ribera de álamos y eucaliptos.

En dicho colmenar se dispone de 100 colmenas de alzas tipo Langstroth

Colmenar 2.- Situado en Pinos del Valle (Granada). La vegetación de la zona estaba compuesta por matorral bajo (romero, retamas y aulagas) y muy cercano un valle de olivos y naranjos.

En dicho colmenar se dispone de 100 colmenas de alzas tipo Dadant

#### b.- Diseño de la experiencia

En ambos colmenares se colocaron 5 mallas de plástico en cinco colmenas previamente seleccionadas buscando su homogeneidad en cuanto a población y reservas.

Las mallas, conforme eran propolizadas, eran sustituidas por otras limpias, hasta completar el período de estudio, contabilizando la producción total por colmena y año.

#### c.- Resultados y discusión.-

Hemos obtenidos una producción en ambos colmenares sobre los 360 gr/año (Tabla nº 5)

|                           | <b>Producción ± DS<br/>(gramos por colmena/año)</b> | <b>Rango<br/>(gramos por colmena/año)</b> |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Colmenar 1 (La Alpujarra) | 361,0 ± 147,5 (n=5)                                 | 105 – 480                                 |
| Colmenar 2 (Valle Lecrín) | 372,0 ± 130,1 (n=5)                                 | 180 – 500                                 |

Tabla nº 5. —Rendimiento (gramos por colmena/año) de propóleos en colmenas de Andalucía.

Como vemos no hay diferencias en la producción entre ambos colmenares y a pesar de la homogeneidad de las colmenas que disponían malla, la producción es muy variable, lo que indica claramente la tendencia a propolizar de unas colmenas más que otras, pudiéndose seleccionar este carácter.

Las producciones obtenidas se encuentran en la media de las producciones de otros países por este sistema de recolección (malla).

Se ha medido el rendimiento disolviendo los propóleos en etanol al 15%, siendo este muy bueno, con valores del 74% - 79%. A diferencia de los Propóleos del estudio, procedentes de raspado, cuyos rendimientos oscilaron entre el 25% - 60%. Lo cual nos lleva a pensar que el apicultor no discrimina bien el producto cuando lo raspa, siendo para el sector un producto nuevo del que necesita información para obtener prácticas adecuadas de producción y conservación.

### 3.4.– Características organolépticas de los Propóleos ensayados

#### 3.4.1.– Color, aspecto, olor, consistencia, sabor e impurezas mecánicas

Los resultados de las diferentes muestras recogidas se reflejan en la tabla nº 6.

|            | Color                          | Aspecto                   | Olor            |
|------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------|
| MUESTRA 1  | Marrón – pardo                 | Trozos irregulares        | Resinoso suave  |
| MUESTRA 2  | Marrón oscuro                  | Trozos irregulares        | Inodoro         |
| MUESTRA 3  | Amarillo con tonos rojos       | Masa irregular con brillo | Resinoso suave  |
| MUESTRA 4  | Marrón oscuro                  | Masa irregular con brillo | Resinoso suave  |
| MUESTRA 5  | Marrón – pardo tonos rojos     | Masa irregular con brillo | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 6  | Marrón                         | Granulado                 | Inodoro         |
| MUESTRA 7  | Marrón tonos rojos             | Masa irregular con brillo | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 8  | Marrón tonos rojos             | Masa irregular con brillo | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 9  | Negro                          | Masa irregular sin brillo | Resinoso suave  |
| MUESTRA 10 | Negro                          | Masa irregular sin brillo | Resinoso suave  |
| MUESTRA 11 | Marrón – pardo                 | Granulado                 | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 12 | Marrón                         | Granulado                 | Inodoro         |
| MUESTRA 13 | Marrón – castaño               | Masa irregular con brillo | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 14 | Marrón - pardo                 | Trozos irregulares        | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 15 | Marrón - pardo vetas oscuras   | Masa irregular con brillo | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 16 | Marrón - pardo vetas oscuras   | Masa irregular con brillo | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 17 | Marrón - pardo vetas oscuras   | Masa irregular con brillo | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 18 | Marrón - pardo vetas oscuras   | Masa irregular con brillo | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 19 | Marrón - pardo vetas oscuras   | Masa irregular con brillo | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 20 | Marrón - pardo vetas amarillas | Trozos irregulares        | Resinoso suave  |
| MUESTRA 21 | Marrón - pardo vetas amarillas | Trozos irregulares        | Resinoso suave  |
| MUESTRA 22 | Amarillo – Negro               | Trozos irregulares        | Resinoso suave  |
| MUESTRA 23 | Marrón - pardo                 | Trozos irregulares        | Resinoso suave  |
| MUESTRA 24 | Amarillo – Negro               | Trozos irregulares        | Resinoso suave  |
| MUESTRA 25 | Marrón - pardo tonos rojos     | Trozos irregulares        | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 26 | Marrón - pardo tonos rojos     | Trozos irregulares        | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 27 | Marrón - pardo                 | Trozos irregulares        | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 28 | Marrón - pardo tonos rojos     | Trozos irregulares        | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 29 | Marrón - pardo tonos rojos     | Trozos irregulares        | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 30 | Marrón - pardo tonos rojos     | Trozos irregulares        | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 31 | Marrón - pardo tonos rojos     | Trozos irregulares        | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 32 | Marrón - pardo tonos rojos     | Trozos irregulares        | Resinoso fuerte |
| MUESTRA 33 | Marrón - pardo tonos rojos     | Trozos irregulares        | Resinoso fuerte |

Tabla nº 6. –Color, aspecto y olor de los propóleos estudiados.

### 3.4.1.1. Color

En general podemos decir que predominan los colores marrones y pardos, muchos con tonalidades rojizas y amarillas. Le siguen los marrones claros y amarillos. Las dos muestras de Cádiz son de color negro. (Tabla nº 7 y Figura nº 2)

| Color                          | Porcentaje |
|--------------------------------|------------|
| Amarillo – Negro               | 6,10%      |
| Amarillo con tonos rojos       | 3,00%      |
| Marrón                         | 6,10%      |
| Marrón – castaño               | 3%         |
| Marrón – pardo                 | 15,20%     |
| Marrón – pardo tonos rojos     | 27,30%     |
| Marrón – pardo vetas amarillas | 6,10%      |
| Marrón – pardo vetas oscuras   | 15,20%     |
| Marrón oscuro                  | 6,10%      |
| Marrón tonos rojos             | 6,10%      |
| Negro                          | 6,10%      |

Tabla nº 6. —Color de los propóleos estudiados.

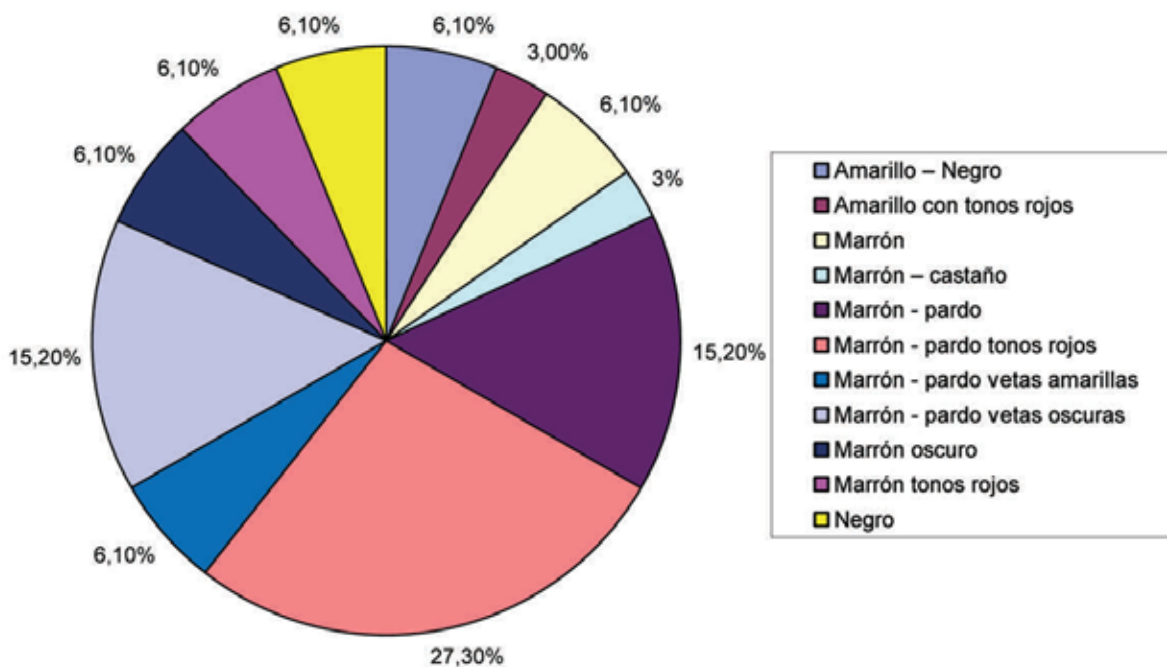


Figura nº 2. —Distribución porcentual de las muestras de propóleos estudiadas.

### 3.4.1.2. Aspecto

Todas las muestras provienen de propóleo raspado. Más de la mitad (51,5%) se presenta en forma de trozos irregulares o briquetas, seguido de masas irregulares con brillo (Figura nº 3).

### 3.4.1.3. Olor

Como vemos en el gráfico, predomina el olor característico del propóleo, resinoso fuerte (picante en la nariz, aromático y balsámico), sólo las dos muestras procedentes de Cádiz presentaban un olor resinoso pero desagradable (Figura nº 4).

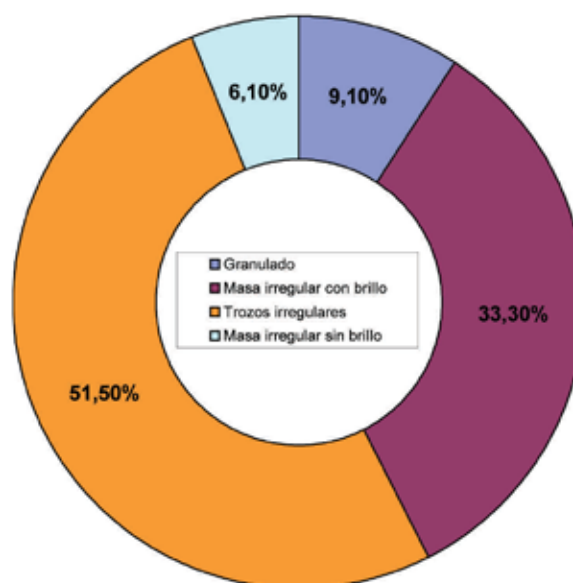


Figura nº 3. —Aspecto de las muestras de propóleos entregadas por los apicultores

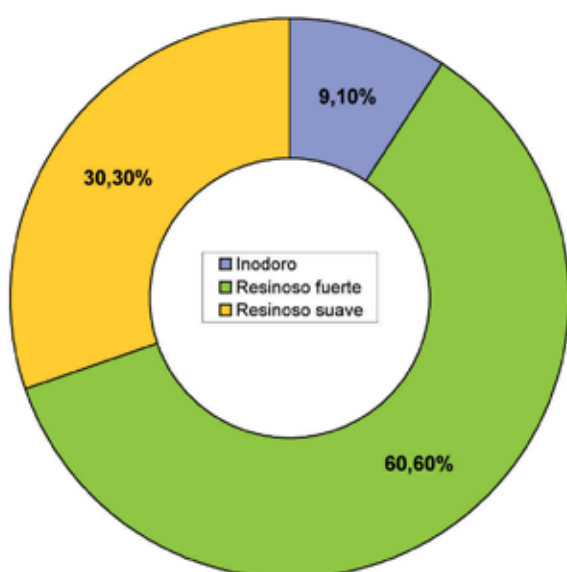


Figura nº 6. —Color de las muestras de propóleos estudiadas.

#### 3.4.1.4. Consistencia, sabor e Impurezas mecánicas

Como hemos indicado anteriormente las mayoría del Propóleos es viene en trozos irregulares y masas irregulares. Éstos a temperatura ambiente se tornan blandos y maleables. Por debajo de los 15°C se endurece.

El sabor, con la excepción de la muestra de Cádiz, es típico de los propóleos, amargo.

Todas las muestras presentan impurezas mecánicas visibles, especialmente astillas procedentes del raspado.

Como hemos indicado en apartados anteriores, se ha medido el rendimiento disolviendo los propóleos en etanol al 15%, obteniendo valores del 74% - 79% en los propóleos obtenidos de malla en los colmenares experimentales y valores del 25% - 60% de los propóleos procedentes de raspado. Lo cual nos lleva a pensar que el apicultor no discrimina bien el producto cuando lo raspa, siendo para el sector un producto nuevo del que necesita información para obtener prácticas adecuadas de producción y conservación.

El porcentaje de ceras e impurezas mecánicas, comprende la fracción del propóleos que no tiene ninguna utilidad, por lo que a mayor porcentaje menor calidad del producto y menor precio de mercado.



Fotografía nº 4.- Fotos de los propóleos recolectados.

#### 3.4.2– Humedad y cenizas

La humedad media de las muestras ha sido del 2,4%, es decir se encuentra por debajo del 5%, cumpliendo la Pharmacopea Europea (Tabla nº 8). Excepto las dos muestras de Cádiz, con valores superiores al 5.0% y donde crecieron mohos pasados unos días.

Asimismo todas las cenizas se encuentran por debajo del 5%, con una media de 2,18% cumpliendo con los parámetros de calidad de la Pharmacopea Europea.

|                    | Media $\pm$ DS (n=33) | Rango (%) (n=33) |
|--------------------|-----------------------|------------------|
| <b>Humedad (%)</b> | 2,41 $\pm$ 1,18       | 1,4 – 6,8        |
| <b>Cenizas (%)</b> | 2,18 $\pm$ 0,96       | 0,7 – 3,2        |

Tabla nº 8.- Resultados de los valores medios en humedad y cenizas de las muestras de propóleos.

### 3.5.– Determinación del contenido en polifenoles y flavonoides

#### 3.5.1.– Determinación de fenoles totales (FT)

Se ha determinado utilizando el método espectrofotométrico de FOLIN-CIOCALTEAU (Singleton y cols., 1999; Kumazawa y cols., 2002). Tomamos 0,5 ml de un Extracto Etanólico de Propóleos (en adelante EEP) y se mezcla con 0.5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu y 0.5 ml de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10%. Se deja incubar 1 hora a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 760 nm. Las EEP se evalúan a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . (Fotografía n° 5)

El contenido total en polifenoles se expresa como miligramos por gramo de ácido gálico (gallic acid) equivalentes.



Fotografía n° 5.- Extracto etanólico de propóleos (EPP) previo a su análisis.

#### 3.5.2.– Determinación del contenido en flavonoides.

Se ha determinado utilizando el método de Woisky y Salatino (1998). Se añaden a 0,5 ml de EEP otros 0,5 ml de una solución al 2% en etanol de  $\text{AlCl}_3$ . La absorbancia se mide a 420 nm después de una hora en incubación a temperatura ambiente. Las EEP se evalúan a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$

El contenido total en flavonoides se calcula como quercitina (mg/gr) de la curva de calibración.

#### 3.5.3.– Resultados y discusión

En la tabla n° 9 mostramos los resultados del contenido en polifenoles y flavonoides obtenidos en este estudio.

El contenido total en polifenoles (mg/g EEP) ha variado entre 31,4 y 364,0, con una media de  $213,3 \pm 67,2$  (mg/g EEP). Si obviamos las dos muestras de Cádiz, que presentan unos valores muy bajos, el rango se sitúa entre 129,50 y 364,0 (mg/g EEP), con una media de  $224,7 \pm 50,8$  (mg/g EEP).

El contenido en polifenoles del 60,6% de las muestras se encuentran en el rango 200-300 mg/gr descrito por otros autores como característico del propóleos procedente de Europa y Asia (Kumazawa y cols (2004). Dos muestras (6,1%) procedentes de Sierra Nevada (La Alpujarra baja) superan los 300 mg/gr.

El contenido total en flavonoides (mg/g EEP) ha variado entre 23,0 y 144,5, con una media de  $91,7 \pm 23,8$  (mg/g EEP). Si obviamos las dos muestras de Cádiz, que presentan unos valores muy bajos el rango se sitúa entre 60,3 y 144,5 (mg/g EEP), con una media de  $95,7 \pm 18,3$  (mg/g EEP).

Como vemos en la tabla los flavonoides representan el 47,1% del total de los fenoles, con un mínimo del 31,1% y un máximo del 93,4%. Lo normal es que lo flavonoides representen más del 80% del total de los flavonoides, por lo que estos resultados en principio hay que tomarlos como orientativos en tanto en cuando no tengamos concluidos los resultados de identificación y cuantificación por los métodos cromatográficos. Ya que dependiendo de los componentes, se han encontrado importantes diferencias de cuantificación entre los métodos espectrofotométricos y cromatográficos (Serra y cols., 1994).

Como podemos observar en la Figura n° 5 existe una correlación significativa entre el contenido en polifenoles y el contenido en flavonoides ( $r^2=0,909$ ;  $p<0,01$ ,  $n=33$ ).

|            | <b>Polifenoles Totales<br/>(mg/g EEP)</b> | <b>Flavonoides totales<br/>(mg/g EEP)</b> | <b>% sobre el total de<br/>fenoles</b> |
|------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|
| MUESTRA 1  | 329.9±4.8                                 | 138.3±0                                   | 41,9                                   |
| MUESTRA 2  | 282.4±1.5                                 | 105.2±2.6                                 | 37,3                                   |
| MUESTRA 3  | 283.3±1.9                                 | 103.7±1.8                                 | 36,6                                   |
| MUESTRA 4  | 278.3±5.1                                 | 107.9±3.6                                 | 38,8                                   |
| MUESTRA 5  | 364.0±1.8                                 | 144.5±6.2                                 | 39,7                                   |
| MUESTRA 6  | 192.9±4.3                                 | 84.8±3.7                                  | 44,0                                   |
| MUESTRA 7  | 208.6±2.1                                 | 91.3±2.3                                  | 43,8                                   |
| MUESTRA 8  | 233.9±0.8                                 | 117.9±4.9                                 | 50,4                                   |
| MUESTRA 9  | 31.4±2.6                                  | 23.0±1.8                                  | 73,2                                   |
| MUESTRA 10 | 41.1±1.3                                  | 38.4±1.8                                  | 93,4                                   |
| MUESTRA 11 | 231.7±4.3                                 | 72.1±1.8                                  | 31,1                                   |
| MUESTRA 12 | 246.0±5.1                                 | 90.7±3.4                                  | 36,9                                   |
| MUESTRA 13 | 229.1±2.0                                 | 98.4±4.1                                  | 43,0                                   |
| MUESTRA 14 | 258.9±1.8                                 | 94.0±4.7                                  | 36,3                                   |
| MUESTRA 15 | 221.7±4.0                                 | 101.1±3.1                                 | 45,6                                   |
| MUESTRA 16 | 192.0±2.0                                 | 79.2±2.7                                  | 41,3                                   |
| MUESTRA 17 | 197.7±2.3                                 | 89.2±4.0                                  | 45,1                                   |
| MUESTRA 18 | 229.8±2.0                                 | 89.2±4.5                                  | 38,8                                   |
| MUESTRA 19 | 207.1±4.0                                 | 83.3±4.6                                  | 40,2                                   |
| MUESTRA 20 | 138.7±2.2                                 | 70.0±8.1                                  | 50,5                                   |
| MUESTRA 21 | 295.9±2.6                                 | 109.6±4.0                                 | 37,0                                   |
| MUESTRA 22 | 230.9±2.1                                 | 106.7±4.2                                 | 46,2                                   |
| MUESTRA 23 | 189.8±5.5                                 | 104.6±3.1                                 | 55,1                                   |
| MUESTRA 24 | 208.1±1.0                                 | 106.1±4.1                                 | 51,0                                   |
| MUESTRA 25 | 154.3±2.6                                 | 70.0±5.4                                  | 45,4                                   |
| MUESTRA 26 | 129.5±2.3                                 | 60.3±3.9                                  | 46,6                                   |
| MUESTRA 27 | 217.4±6.6                                 | 110.5±5.1                                 | 50,8                                   |
| MUESTRA 28 | 193.5±1.7                                 | 79.5±2.8                                  | 41,1                                   |
| MUESTRA 29 | 187.1±1.2                                 | 95.0±1,3                                  | 50,8                                   |
| MUESTRA 30 | 195.0±1.7                                 | 96.0±1.3                                  | 49,2                                   |
| MUESTRA 31 | 220.0±1.5                                 | 87.0±1.8                                  | 39,5                                   |
| MUESTRA 32 | 195.6±2.8                                 | 98.0±0.9                                  | 50,1                                   |
| MUESTRA 33 | 225.1±1.1                                 | 82.0±1.2                                  | 36,4                                   |

Tabla nº 9. — Valores de Polifenoles totales, flavonoides y porcentaje de flavonoides sobre el total de Polifenoles.

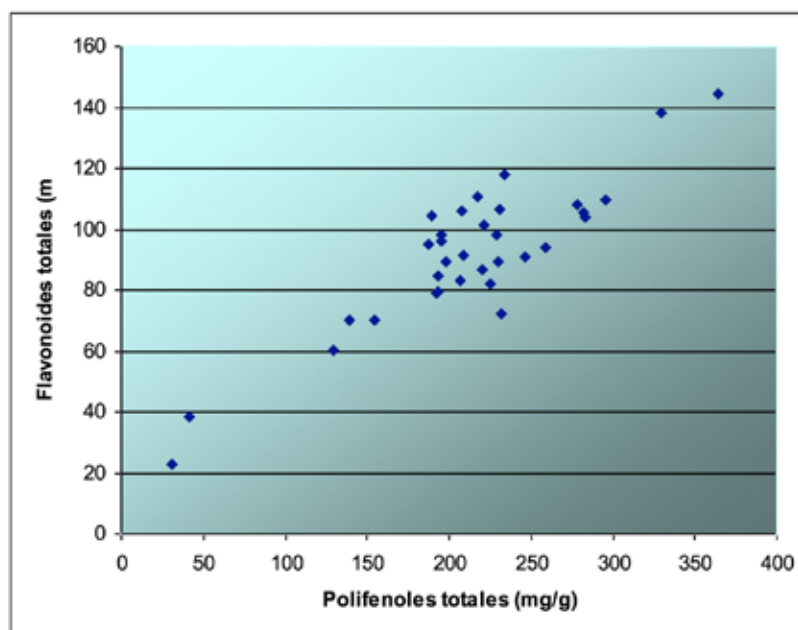


Figura nº 5. —Correlación entre los valores de Polifenoles y flavonoides ( $r^2=0,909$ ;  $p<0,01$ ,  $n=33$ )

Como observamos en la tabla nº 10, éstos parámetros de calidad del propóleo producido en Andalucía se encuentran en la media de los propóleos producidos en otros países (Kumazawa y cols, (2004); Mok-Ryeon y cols., (2004); Chia-Chi y cols., (2002); Isla y cols., (2005); Kosalecy cols., (2003)). El contenido en polifenoles totales en algunas muestras de propóleos procedente de La Alpujarra (Granada) alcanzan valores máximos encontrados en la bibliografía. El contenido en flavonoides se encuentra también en la media de otras producciones en el mundo.

|                           | <b>Polifenoles totales – Rango</b><br><b>(mg/g de EEP)</b> | <b>Flavonoides – Rango</b><br><b>(mg/g de EEP)</b> | <b>Cita</b> |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------|
| <b>Andalucía (España)</b> | 224,7 ± 50,8 (129,50 - 364,0)                              | 95,7 ± 18,3 (60,3 -144,5)                          |             |
| <b>Argentina</b>          | 212 ± 9,2                                                  | 130 ± 5,5                                          | <b>1</b>    |
| <b>Australia</b>          | 269 ± 16,13                                                | 145 ± 6,5                                          | <b>1</b>    |
| <b>Brasil</b>             | 120 ± 5,6                                                  | 51,9 ± 2,4                                         | <b>1</b>    |
| <b>Bulgaria</b>           | 220 ± 2,5                                                  | 157 ± 8,9                                          | <b>1</b>    |
| <b>Chile</b>              | 210 ± 11,1                                                 | 116 ± 9,3                                          | <b>1</b>    |
| China (Hebei)             | 298 ± 8,7                                                  | 147 ± 9,3                                          | <b>1</b>    |
| China (Hubei)             | 299 ± 0,5                                                  | 158 ± 10,8                                         | <b>1</b>    |
| China (Zhejiang)          | 262 ± 12,6                                                 | 136 ± 17,4                                         | <b>1</b>    |
| Hungría                   | 242 ± 0,2                                                  | 176 ± 1,7                                          | <b>1</b>    |
| <b>Nueva Zelanda</b>      | 237 ± 6,0                                                  | 152 ± 12,6                                         | <b>1</b>    |
| <b>Sudáfrica</b>          | 95,5 ± 4,4                                                 | 50,8 ± 0,8                                         | <b>1</b>    |
| <b>Tailandia</b>          | 31,2 ± 0,7                                                 | 2,5 ± 0,8                                          | <b>1</b>    |
| <b>Ucrania</b>            | 255 ± 7,4                                                  | 63,7 ± 3,2                                         | <b>1</b>    |
| <b>Uruguay</b>            | 187 ± 8,5                                                  | 168 ± 6,4                                          | <b>1</b>    |
| <b>Estados Unidos</b>     | 256 ± 15,7                                                 | 122 ± 6,2                                          | <b>1</b>    |
| <b>Uzbekistán</b>         | 174 ± 6,7                                                  | 94,2 ± 6,8                                         | <b>1</b>    |
| <b>Corea</b>              | 85,0 ± 2,0 – 283,0 ± 5,0                                   | 16,0 ± 2,0 - 136,0 ± 9,0                           | <b>2</b>    |
| <b>Taiwán</b>             |                                                            | 206 – 213                                          | <b>3</b>    |
| <b>Brasil</b>             |                                                            | 103,8                                              | <b>3</b>    |
| <b>China</b>              |                                                            | 174,9 – 177,6                                      | <b>3</b>    |
| <b>Argentina</b>          | 32,5 – 330,55                                              |                                                    | <b>4</b>    |
| <b>Croacia</b>            | 26,6 – 160,3                                               | 1,1 -157,2                                         | <b>5</b>    |

Tabla nº 10. — Resultados de Polifenoles y flavonoides procedentes de propóleos de diferentes partes del mundo. {1Kumazawa y cols, (2004); 2 Mok-Ryeon y cols, (2004); 3 Chia-Chi y cols, (2002); 4 Isla y cols, (2005); 5 Kosalec y cols (2003)}

### 3.6.– Determinación de la capacidad antioxidante

#### 3.6.1.– Introducción

La capacidad antioxidante de un compuesto no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre si pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios.

Diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad que los compuestos fenólicos, que contienen diversos alimentos, para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación.

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también eletroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico.

### 3.6.2.– Método DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)

Hemos seguido el método de Okada y Okada (1998), de manera que mezclamos 2,7 ml de la solución EEP (90 µg/ml) y 0,3 ml de una solución 2mM DPPH. Se deja incubar 15 minutos en oscuridad, leyéndose la absorbancia a 517 nm.

Las medidas de absorbancia a 517 nm se realizan antes de añadir la muestra (A0) y pasados los 30 y 60 minutos (Af). La concentración de DPPH en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal.

Vitamina E y BHT (Buthyl-hydroxy toluen) a la misma concentración que la solución EEP se utiliza como referencia.

### 3.6.3.– Método ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

Se ha calculado siguiendo el método de Erel (2004). El radical ABTS•+ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente (±25°C) y en la oscuridad durante 12-16 h. Una vez formado el radical ABTS•+ se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 (±0,1) a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción).

Para determinar la actividad neutralizante o capacidad de atrapar los radicales libres (scavenging activity), 3ml de la solución diluida de ABTS•+ se añade a 20 µL de la solución de EEP, y se mide la absorbancia a 734 nm a los 5 minutos de la mezcla, usando etanol como blanco.

El porcentaje de inhibición se calcula siguiendo la expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = (\text{Ac}/\text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

Donde Ac es la absorbancia del control y As es la absorbancia de las muestras

El antioxidante sintético de referencia, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) y la vitamina E, se usan como referencia.

Las muestras de EEP se ensayan a una concentración de 200 µg/mL y el trolox y la Vitamina E a 50 µg/mL.

### 3.6.4.– Resultados y Discusión

En las figuras nº 6, 7 y 8 mostramos los resultados obtenidos.

Para la DPPH las muestras han mostrado unos valores de «scavenging activity» (capacidad de atrapar radicales libres) comprendidos entre 23 % - 85,7% de inhibición, con una media de 49,12% ± 16,02%, sin contar las dos muestras de Cádiz (Figura nº 6).

Para la ABTS las muestras han mostrado unos valores de «scavenging activity» (capacidad de atrapar radicales libres) comprendidos entre 23% - 71,2% de inhibición, con una media de  $48,96\% \pm 11,09\%$ , sin contar las dos muestras de Cádiz (Figura nº 7).

Como observamos en la figura nº 6, dos muestras de Sierra Nevada, con alto contenido en polifenoles presentan un porcentaje de inhibición bastante alto ( $> 80\%$ ), un 25% de las muestras presentan porcentajes de inhibición superiores al 60%.

En la figura nº 6 observamos que existe una correlación significativa entre el contenido en polifenoles y el DPPH ( $r^2=0,982$ ;  $p<0,01$ ,  $n=28$ ), es decir, cuanto mayor es el contenido en polifenoles totales, mayor la capacidad antioxidante de la muestra.

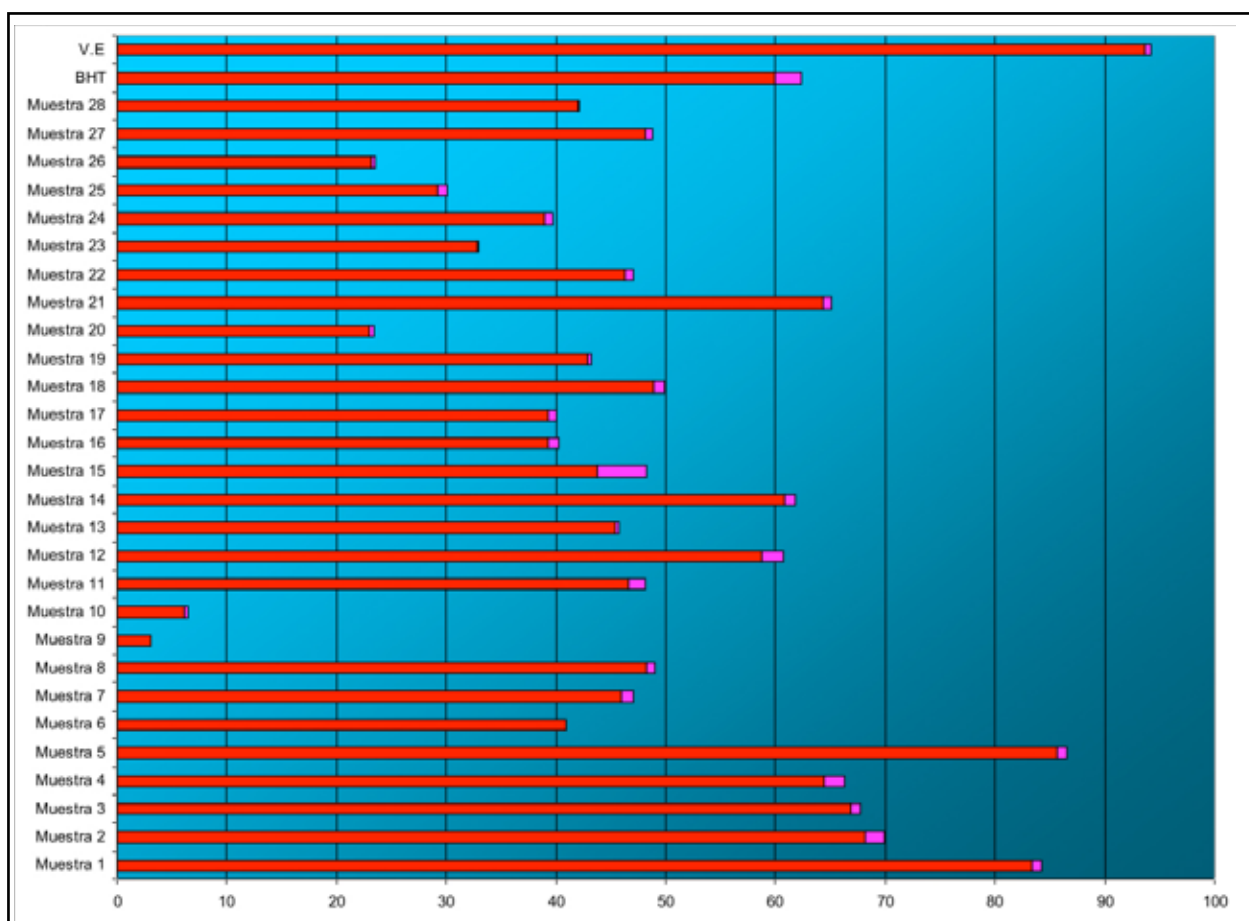


Figura nº 6. —Resultados de DPPH. Porcentajes de inhibición obtenidos.

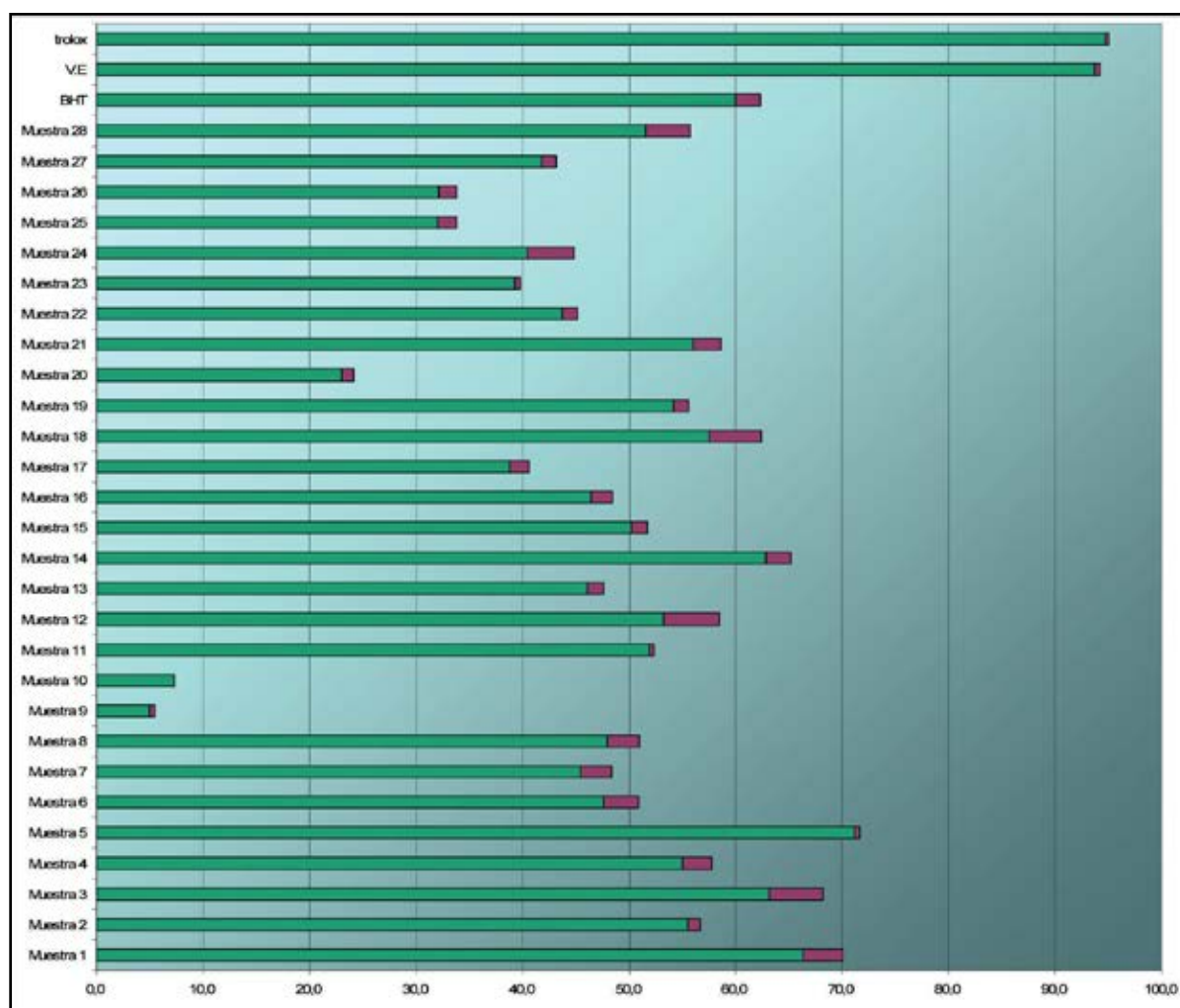


Figura nº 7. —Resultados de ABTS. Porcentajes de inhibición obtenidos.

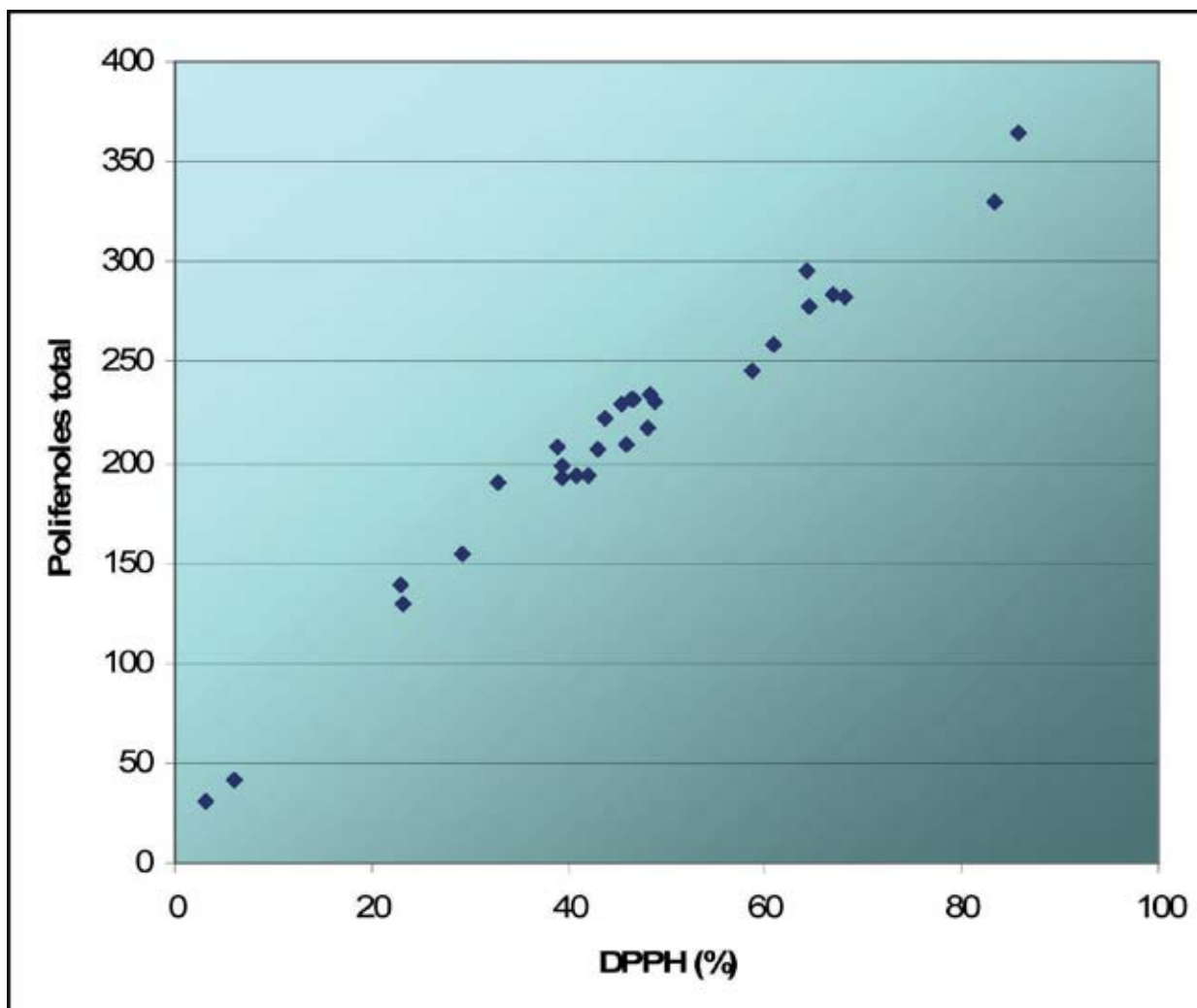


Figura nº 8. —Correlación entre los valores de DPPH y polifenoles totales (mg/g EEP) ( $r^2=0,982$ ;  $p<0,01$ ,  $n=28$ ).

### 3.7.– Identificación de los principales componentes de los Propóleos recogidos

Esta es una fase muy interesante y será uno de los objetivos de futuro para el equipo investigador de la APAG y del Consejo Regulador de la DOP Miel de Granada a raíz de este proyecto.

La identificación y cuantificación de todos los componentes que forman parte del propóleo en Andalucía es un proceso largo que nos llevará todavía algunos meses, fuera del alcance de los objetivos de este proyecto, con una duración inicial de 12 meses prorrogada a 18 meses.

Se ha realizado el perfil cromatográfico de las muestras estudiadas (Figuras nº 9 a nº 14), estando actualmente en fase de identificación de los componentes (Figuras nº 9 y 10)

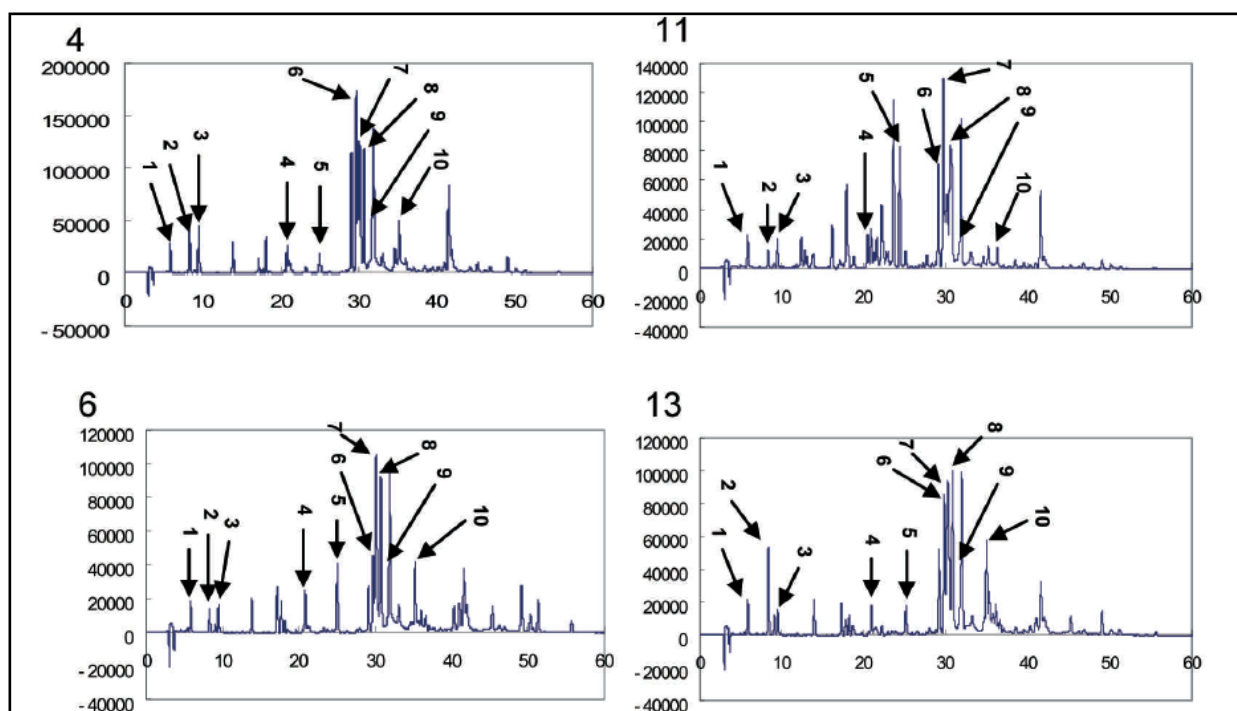


Figura nº 9. —Perfiles cromatográficos de las muestras de propóleos (4, 11, 6 y 13) e identificación de algunos compuestos.

Entre los compuestos que hemos podido identificar se encuentran (Figura xx):

- ✿ Ácido caféico (1)
- ✿ Ácido p-cumarico (2)
- ✿ Ácido ferúlico (3)
- ✿ Pinobanksina (4)
- ✿ Cinnamylidenacetic acid (5)
- ✿ CAPE (caffeic acid phenethyl ester) (6)
- ✿ Crisina (7)
- ✿ Pinocenbrina (8)
- ✿ Galangina (9)
- ✿ Cinnamyl caffeate (10)
- ✿ Quercitina
- ✿ Apigenina

La identificación y cuantificación de estos compuestos resulta indispensable para conocer el las propiedades y utilidades del propóleo en Andalucía. La separación de los distintos compuestos mediante tecnología de «fluidos supercríticos» permite abrir el uso de los componentes individuales en la industria alimentaria y en la salud humana.

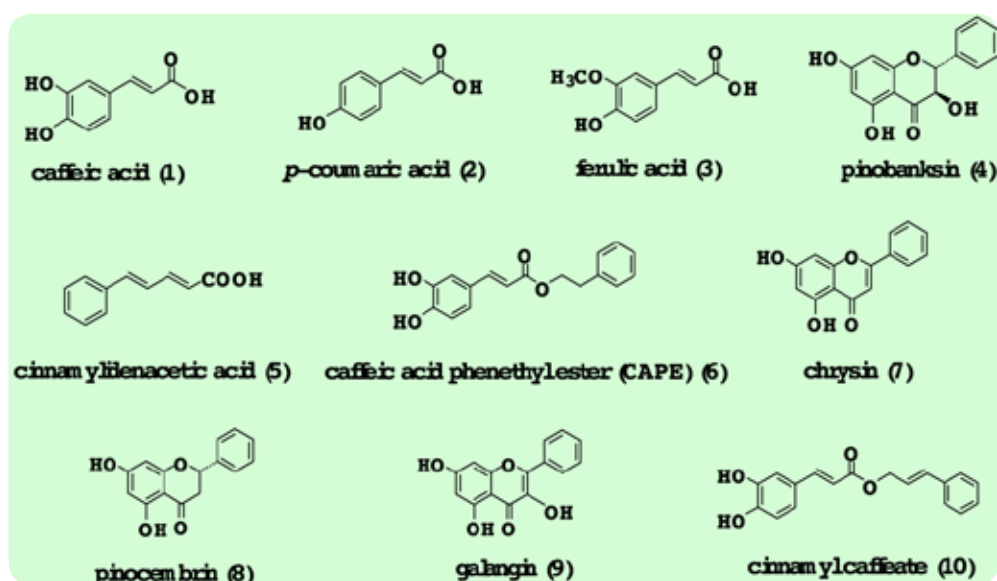


Figura nº 10. —Estructura química de algunos de los compuestos identificados.

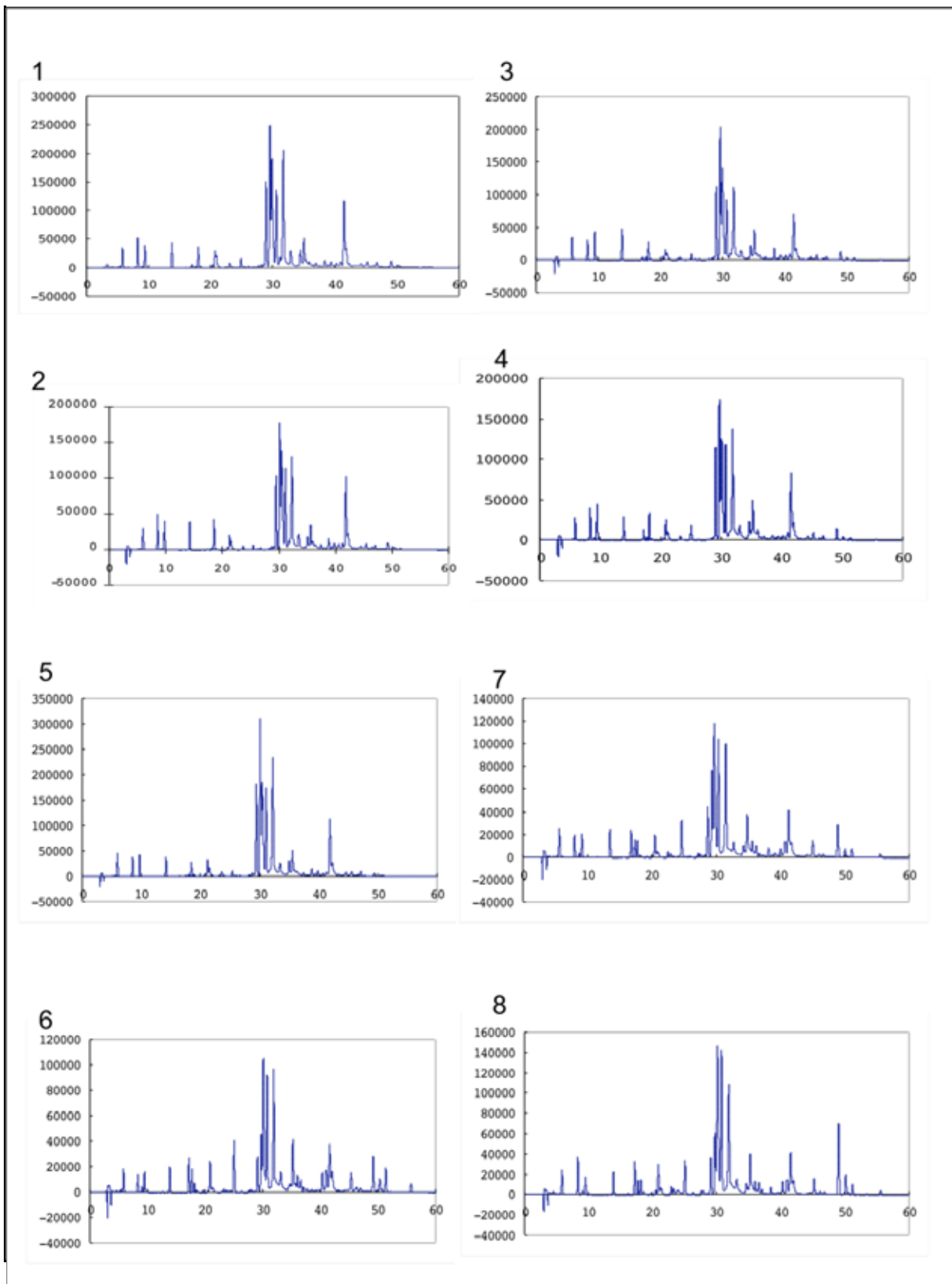


Figura nº 11.- Perfiles cromatográficos de las muestras de propóleos  
(Muestras 1 a 8)

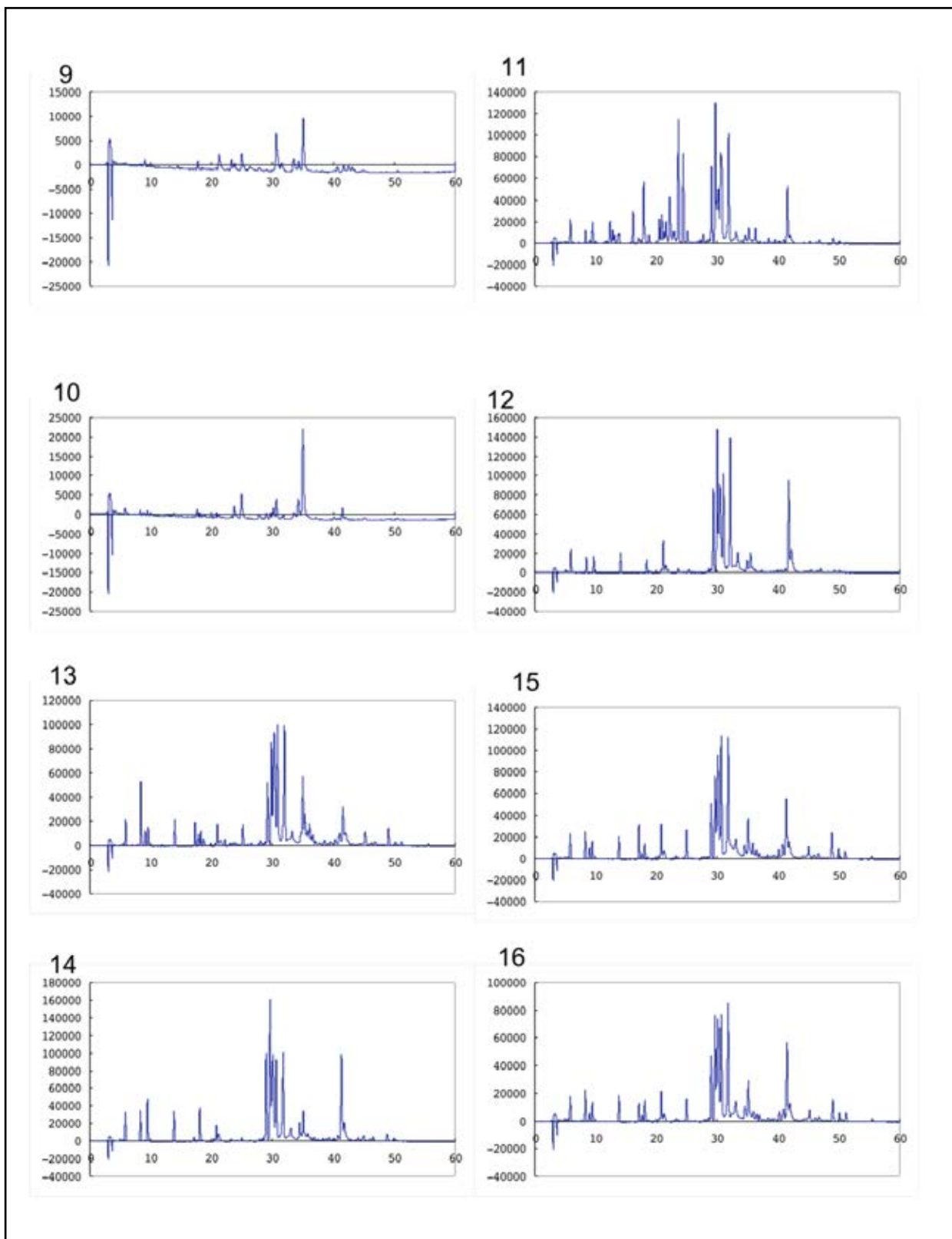


Figura nº 12.- Perfiles cromatográficos de las muestras de propóleos (Muestras 9 a 16)

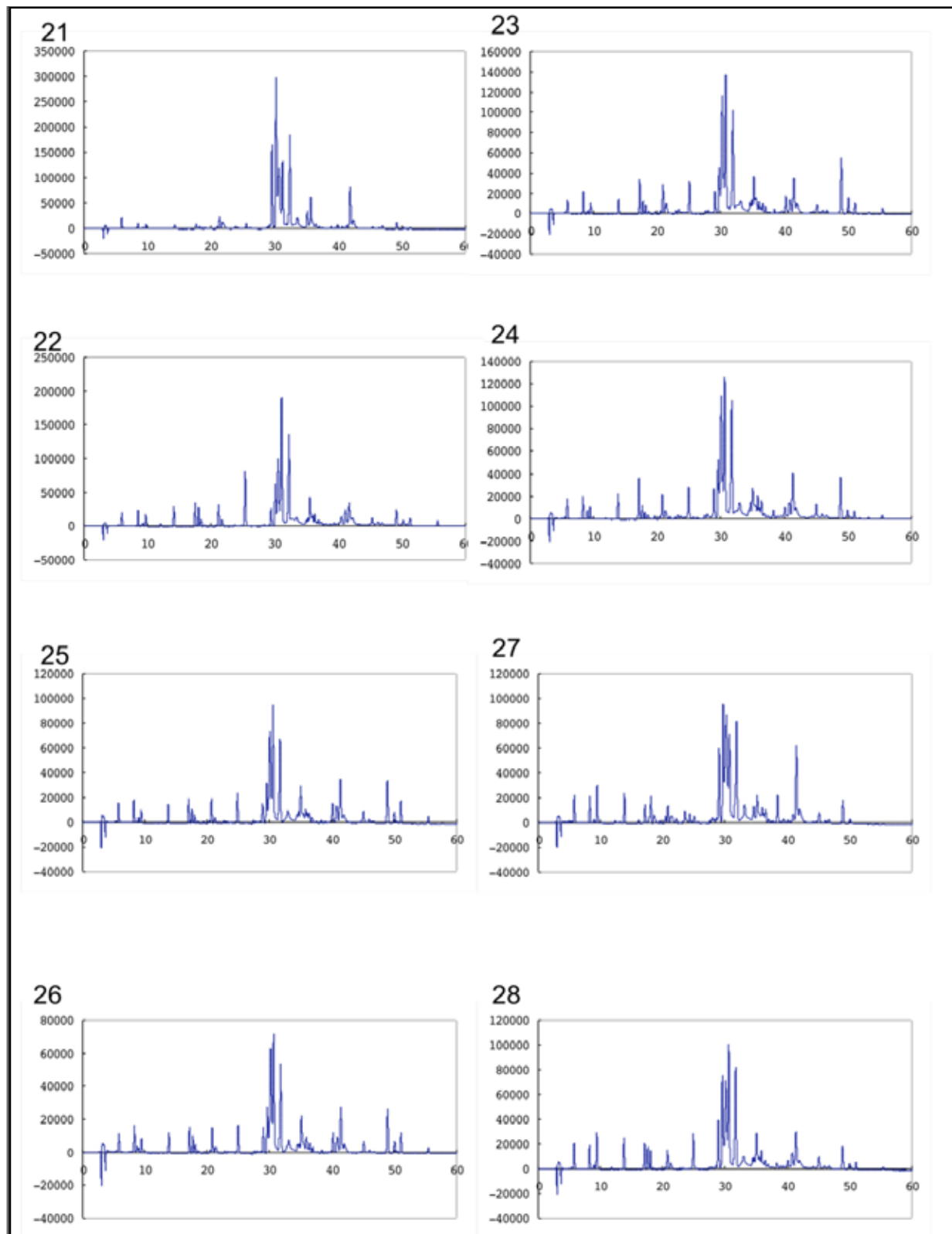


Figura nº 13.- Perfiles cromatográficos de las muestras de propóleos  
(Muestras 21 a 28)

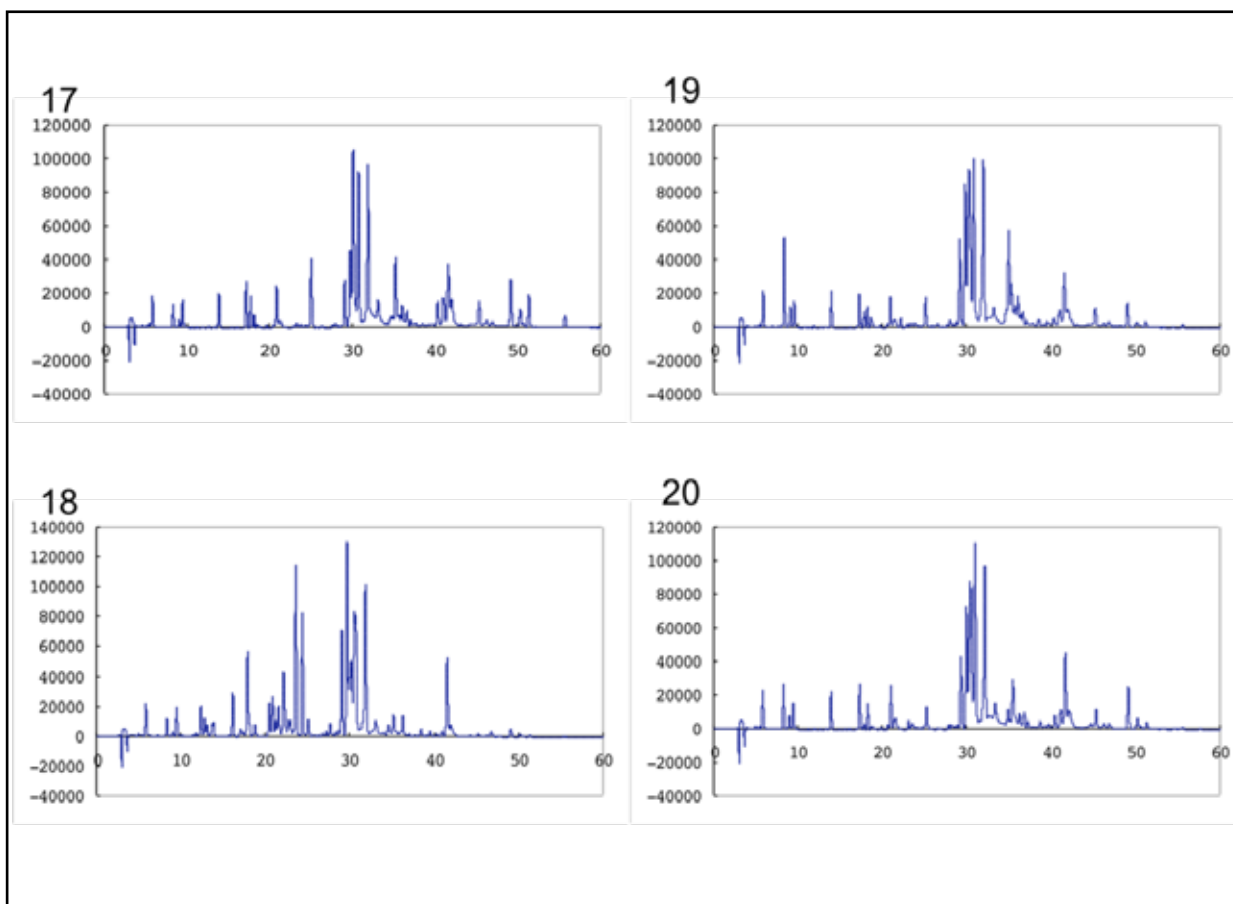


Figura nº 14.- Perfiles cromatográficos de las muestras de propóleos  
(Muestras 17 a 20)

### 3.8.– Contenido en minerales y metales

Hemos realizado un análisis de 24 compuestos por ICP Ms/Ms. Los resultados de estas determinaciones se reflejan en la Tabla nº 11.

Como vemos el propóleo presenta altos contenidos minerales en muchos minerales esenciales (Fe, Mg, Ca, P, K, etc...).

Uno de los más interesantes es el zinc, compuesto de interés biológico por sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias. Este elemento, es de vital importancia en la actividad de algunas enzimas como es el caso de la anhidrasa carbónica, que existe en combinación en sangre periférica el dióxido de carbono con el agua periférica de los glóbulos rojos para la rápida liberación del dióxido de carbono desde la sangre capilar pulmonar a los alvéolos (Guyton, 1988). En las dos muestras analizadas hemos obtenido valores de 162,9 mg/kg y 1363,5 mg/kg.

Los elementos más representativos son el calcio y el potasio, seguidos del magnesio, azufre, zinc, silicio, hierro, aluminio y fósforo.

Como vemos en los resultados, no se detectan metales pesados como el mercurio, el cadmio o el arsénico.

En el lado negativo tenemos la presencia de Plomo en un 58,3% de las muestras de propóleos. Las muestras con presencia de plomo, presentaron valores entre 0,6 - 3,3 mg/kg.

En la bibliografía, la presencia de algunos metales pesados en Propóleos es frecuente, con valores máximos de 60 mg/kg (Sessa, 1990). Dependiendo del mercado al que vayan dirigidos, los propóleos con valores superiores a 1 ppm de plomo (1 mg/kg) son rechazados. La presencia de plomo se debe sobre todo a problemas de contaminación ambiental.

En nuestro caso, no comprendíamos la presencia de plomo en el propóleo. Las colmenas de donde provienen las muestras de este estudio, están situadas en espacios naturales, lejos de fuentes de contaminación, no hay apenas industrias y es escasa la circulación de vehículos.

Así mismo, los materiales con los que se construye las colmenas no contienen plomo y los utensilios del apicultor para rascar el propóleo (rasquetas) son de acero.

Una de las sospechas iniciales se encaminó a los ahumadores, su conservación y el combustible utilizado para el mismo.

#### Hay varios factores a considerar:

- ✿ En los últimos años un porcentaje importante de apicultores ha dejado de utilizar como combustibles los elementos que le ofrece el medio natural (esparto, piñas, etc...) decantándose por el uso de unas briquetas de madera prensada que se comercializan como combustible para los ahumadores. (Fotografía nº 6)
- ✿ La conservación de los ahumadores es en muchos casos deficiente presentando incrustaciones del combustible que pueden crear problemas en los productos de la colmena.
- ✿ El propóleo permanece mucho tiempo en la colmena, por lo que se expone continuamente al humo en las visitas periódicas del apicultor. Si este está contaminado, evidentemente acumulará el contaminante a lo largo del tiempo.



Figura nº 13. —Perfiles cromatográficos de las muestras de propóleos (Muestras 21 a 28).

El análisis de las briquetas de madera prensada que se usa como combustible para los ahumadores, son reveladores para explicar esta contaminación y los resultados han sido los siguientes:

- ☼ Plomo: 0,21 mg/kg
- ☼ Cadmio: 0,07 mg/kg

Sin embargo los análisis de otros productos como piñas o esparto seco han ofrecido valores no detectables de plomo y cadmio. La conclusión es por tanto directa, hay que usar como combustible los materiales tradicionales, que además contribuyen a mantener limpio el monte.

| Mineral   | Media $\pm$ DS<br>(mg/kg) | Máximo<br>(mg/kg) | Mínimo<br>(mg/kg) | n  | L.D.<br>(mg/kg) |
|-----------|---------------------------|-------------------|-------------------|----|-----------------|
| Aluminio  | 457,1 $\pm$ 9,6           | 544,98            | 307,6             | 7  | 0,02            |
| Antimonio | <LD                       |                   |                   | 5  | 0,01            |
| Arsénico  | <LD                       |                   |                   | 5  | 0,005           |
| Azufre    | 740,9 $\pm$ 04,3          | 1373,3            | 451,64            | 5  | 0,5             |
| Boro      | 8,4 $\pm$ 3,4             | 14,1              | 4,8               | 5  | 0,1             |
| Cadmio    | <LD                       |                   |                   | 5  | 0,002           |
| Calcio    | 3545 $\pm$ 1928,8         | 6683              | 1773              | 5  | 0,5             |
| Cobalto   | 0,29 $\pm$ 0,27           | 0,7               | 0                 | 5  | 0,01            |
| Cobre     | 3,1 $\pm$ 0,7             | 4,03              | 2,08              | 5  | 0,01            |
| Cromo     | 1,6 $\pm$ 0,7             | 2,5               | 0,5               | 5  | 0,5             |
| Estaño    | <LD                       |                   |                   | 5  | 0,02            |
| Fósforo   | 370,9 $\pm$ 159,2         | 516,2             | 171,1             | 5  | 0,5             |
| Hierro    | 601,7 $\pm$ 386,9         | 1270              | 317,8             | 5  | 0,02            |
| Magnesio  | 948,7 $\pm$ 411,6         | 1405,2            | 359,3             | 5  | 0,5             |
| Manganeso | 14,2 $\pm$ 7,2            | 25,9              | 6,8               | 5  | 0,01            |
| Niquel    | 2,3 $\pm$ 1,1             | 3,3               | 0,64              | 5  | 0,01            |
| Plata     | <LD                       |                   |                   | 5  | 0,01            |
| Plomo     | 1,2 $\pm$ 1,3             | 3,36              | 0                 | 12 | 0,01            |
| Potasio   | 2499,2 $\pm$ 149,8        | 4790              | 751               | 5  | 0,25            |
| Selenio   | <LD                       |                   |                   | 5  | 0,01            |
| Silicio   | 678,3 $\pm$ 137,5         | 879,8             | 499,5             | 5  | 0,1             |
| Sodio     | 151,9 $\pm$ 36,1          | 188,2             | 92,5              | 5  | 0,5             |
| Mercurio  | <LD                       |                   |                   | 5  | 0,001           |
| Zinc      | 763,2 $\pm$ 848,9         | 1363,5            | 162,9             | 2  | 0,01            |

Tabla nº 11. —Valores medios de los minerales y metales en las muestras de propóleos de Andalucía

### 3.9.– Contaminación biótica y abiótica

#### 3.9.1.– Acaricidas, plaguicidas, fungicidas y pesticidas

Mediante Cromatografía de Gases asociada a masas/masas hemos realizado un barrido para estudiar la presencia de los posibles residuos de los principales pesticidas que se utilizan en el medio agrícola, así como las principales materias activas acaricidas que utilizan los apicultores para el control de Varroa destructor (Tabla nº 12).

Para un nivel de detección (LD) de 0,01 mg/kr, no hemos encontrado ninguna de las sustancias rastreadas. En dos muestras (6,1 %) hemos encontrado tau-fluvalinato, utilizado para el control de la varroosis, a unos niveles de 0,013 mgr/kg (muestra 29) y 0,028 mgr/kg (muestra 33).

|                                       |                       |                         |
|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Acefato                               | Fention               | Piridafention           |
| Acritanin                             | Flucitrinato          | Pirifenox               |
| Amitraz                               | Flunvalinato tau I+II | Primetanil              |
| Benalaxil                             | Fonofos               | Pirimicarb              |
| Bifentrin                             | Fosalona              | Pirimifos metil         |
| Buprofecin                            | Heptenofos            | Procimidona             |
| Bromopropilato                        | Hexaconazol           | Prometrina              |
| Bupirimato                            | Iprodiona             | Propargita              |
| Carbofenotion                         | Cihalitrin-lambda     | Propizamida             |
| Cipermentrina                         | Lindano               | Quinalfos               |
| Ciproconazol                          | Malation              | Quinometionato          |
| Clorfenvinfos                         | Mecarbam              | Tebuconazol             |
| Clorpirifos                           | Metalaxil             | Tebunfenpirad           |
| Clorpirifos metil                     | Metamidofos           | Tetraclorvinfos         |
| Clortalonil                           | Metidation            | Tetradifon              |
| Clozolinato                           | Metiocarb             | Triadimefon+triadimenol |
| Deltametrin                           | Mevinfos              | Triazofos               |
| Diazinon                              | Miclobutanilo         | Vinclozolina            |
| Dicloran                              | Monocrotofos          |                         |
| Diclorvos                             | Nuarimol              |                         |
| Dicofol                               | Ofurace               |                         |
| Dimetoato                             | Ometoato              |                         |
| Dietofencarb                          | Oxadixil              |                         |
| Endosulfan ( $\alpha+\beta$ +sulfato) | Paration              |                         |
| Etridiazol                            | Paration metil        |                         |
| Fenamifos                             | Penconazol            |                         |
| Fenarimol                             | Permetrin I+II        |                         |
| Fenpropatrin                          | Pirazofos             |                         |
| Fenitrothion                          | Piridaben             |                         |

Tabla nº 12. —Principales activos rastreados en las muestras de propóleos.

### 3.10.– Antibióticos

Mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia, hemos estudiado la presencia de sustancias utilizadas en la lucha contra las enfermedades bacterianas de las abejas.

Buscándose antibióticos (2 familias) y sulfamidas:

- ☼ Tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina a un nivel de detección de 10 ppb (0,01 mgr/kg).
- ☼ Estreptomicina y dihidroestreptomicina a a un nivel de detección de 10 ppb (0,01 mgr/kg)
- ☼ Sulfamidas (13 compuestos), a un nivel de detección de 10 ppb.
  - Sulfadiacina
  - Sulfadimetoxina
  - Sulfameracina
  - Sulfametoazol
  - Sulfameter
  - Sulfametizol
  - Sulfatiazol
  - Sulfisozasol
  - Sulfadoxina
  - Sulfapiridina
  - Sulfametacina
  - Sulfaquinoxalina

No se ha hallado contaminación en las muestras objeto de estudio.

---

## 4. Conclusiones

---

- ✿ Andalucía, con unas 500000 colmenas puede producir en torno a los 180.000 kg de propóleos con un valor en el mercado entre 4,5 – 18 millones de euros dependiendo de sus características.
- ✿ La cantidad de Propóleos producida por la colmena depende de muchos factores (abejas, vegetación, clima, etc..). De acuerdo a las experiencias realizadas, la producción por colmena y año se sitúa en 360 gr en Andalucía.
- ✿ El propóleos es por tanto una interesante producción para diversificar las rentas de la explotación apícolas, requiriendo además pocas inversiones.
- ✿ El apicultor debe aprender a recolectar y distinguir el propóleos de la colmena.
- ✿ La calidad y composición química del Propóleos varían según la fuente vegetal y las condiciones ambientales.
- ✿ La manipulación debe realizarse con las máximas exigencias de higiene y en lugares perfectamente limpios.
- ✿ La calidad está directamente relacionada con los métodos de recolección, almacenamiento y conservación.
- ✿ Mantener limpios los ahumadores y utilizar combustibles tradicionales. Se desaconseja el uso de briquetas de madera prensada.
- ✿ Las muestras de propóleos presentan capacidades antioxidantes de 2530  $\mu\text{mol/gr}$  (TEAC), siendo el propóleos la fuente natural de antioxidantes más importante de los productos agroganaderos.
- ✿ El propóleos producido en Andalucía presenta muy buenas características para su producción e inserción en el mercado nacional e internacional.
- ✿ Es necesario conocer los componentes individuales y favorecer industrias de transformación.
- ✿ Es necesario implicar a grupos médicos para avanzar en determinados campos clínicos tal y como se está haciendo en otros países.

---

## 5. Agradecimientos

---

Los resultados de este proyecto han sido cofinanciados por la APAG y por el Grupo de Desarrollo Columela.

Al Dr. Josep Serra Bonvehí del Laboratori Agrari de la Generalitat de Catalunya por su asistencia y comentarios.

Al Dr. Shigenori Kumazawa y su equipo de la Universidad de Shizuoka (Japón) donde se han realizado algunos ensayos de capacidad antioxidante y han permitido poner a punto la metodología necesaria en Apinevada.

## 6. Bibliografía

- Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F. y Corner, M. (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enyl caffeate. *J. of Natural Products*, 64:235-240.
- Bankova V.S., Castro S.L., Marcucci M.C. (2000), Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie* 31: 3-15.
- Bignall J. (1993). Honey and *Heliobacter*. *Lancet* 342: 858
- Cheng, P.C., Wong, G., (1996). Honey bee propolis: prospects in medicine. *Bee World* 77: 8-15.
- Chia-Chi, C., Ming-Hua, Y., Hwei-Mei, W., y Jiing-Chuan, C (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 3:178-182
- Dumitrescu M. Crisan I. Esanu V (1993). The mechanism of the antiherpetic action of an aqueous propolis extract. II. The action of the lectins of an aqueous propolis extract. *Roumaine de Virologie*. 44:49-54.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem* 37:277-285.
- Fernández, Jr. A., Leomil L., Fernández, AAH., Sforcin JM. (2001) The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J. Venom. Anim. Toxins*, 7:73-82.
- Fierro, W (2000). Evidencia científica del propóleo desde el punto de vista médico. *Congreso Internacional de Propóleos*. Argentina
- Ghisalberti, E L (1979) Propolis: a review. *Bee World* 60: 59-84.
- Greenaway, W.; Scaysbrook, T.; Whatley, F.R. (1990). The Composition and plant origins of propolis : A report of work at Oxford. *Bee world* 71, 107-118.
- Guyton, A.C. (1998) *Tratado de fisiología médica*. Ed. McGraw-Hill
- Harish Z, Rubinstein A, Golodner M, Elmaliah M, Mizrahi Y. (1997). Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Exp. Clin. Res.* 23:89-96.
- Hertog, M G; Feskens, E J; Hollman, P C; Katan, M B; Kromhout, D (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 342:1007-1011.
- Hishikawa, K., Nakaki, T. y Fujita, T. (2005). Oral Flavonoid Supplementation Attenuates Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 442-446
- Isla, M.I., Paredes, JF., Nieva M.I., Ko, H., park, YK. (2005). Some Chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. *J. Agric. Food. Chem.* 53:1166-1172.
- Kosalec, I., Pepelnjak, S., Banmaz, M y Vladimir KS (2005). Flavonoid análisis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm*, 55: 423-430.
- Krell, R. (1996). Value-added product from beekeeping. *FAO Boletín* 124.
- Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M.S. y Nakayama, T. (2002). Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Food. Chemistry* 50: 373 - 377.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., y Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84: 329 -339

- Markham, K.R., Mitchell, K.A., Wilkins, A.L., Daldy, J.A., Lu, Y., (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42, 205–211.
- Matei, N., Birghila, S., Sobrinhas, S. y Capota, P., (2004).- Determination of C vitamin and some essential trace Elements (Ni, Mn, Fe, Cr) in bee products. *Acta Chim. Slov.* 51, 169-175.
- Melliou, E y Chinou, I (2004). Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta med.* 70:515-519.
- Mirzoeva O, Calder P. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 55:441-449.
- Mok-Ryeon, Ahn, Kumazawa, S., Hamasaka, T., Keuk-Seung B., y Nakayama, T. (2004). Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea J. *Agric. Food Chem.* 52, 728 -7292
- Okada, Y. y Okada, M. (1998). Scavenging effect of water soluble proteins in brood beans on free radicals and active oxygen species. *J. Agric. Food Chem* 46:401-406.
- Pascual, C., González, R., y Toricella, R.G. (1994). Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J. Ethnopharmacol* 41: 9-13.
- Popota, M., Silici, S., Kaftanoglu, O. y Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12:221-228.
- Samoliuk, VA (2000) . The incidence of the antioxidant system and the status of the cerebral blood supply in patients with an ischemic episode on apytherapy. *Lik Sprava* 1-2: 68-70.
- Serra, J. y Ventura, F. (2000). Study of propolis quality from china and Uruguay. *Z Naturforsch* 55: 778-784.
- Serra, J., Ventura Coll, F., y Escolá, R. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *JAOCS* 71: 529-532.
- Sessa, C (1990). Método analítico per propolis polvere. Lab. Controllo qualità. Viale Gramsci 212/224 Sesto, Milano.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Reventos, R.; (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology* 299: 152-178
- Sun, F., Hayami, S., Harina, S., Ogiri, Y., Tanaka, K., y Yamada, Y., In vivo antioxidant activity of propolis evaluated by interaction with vitamins C and E and the levels of lipid hydroperoxidases in rats. *J. Agric. Food Chem.* 48:1462-1465.
- Tomas-Barberan, F.A., Garcia-Viguera, C., Vit-Oliver, P., Ferreres, F., Tomas-Lorente, F., (1993). Phytochemical evidence for botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 34, 191–196.
- Torres Suárez R (1996). Propóleos en quemados. In: IV Simposio de propóleos. La Habana Cuba. 1996.
- Vanhaelen, M; Vanhaelen-Fastré, R (1979) Propolis. I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. *Journal de Pharmacie Belgique* 34: 253-259
- Woisky, R.G., y Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* 37: 99-105



# Element content of propolis collected from different areas of South Spain

J. Serra Bonvehí & F. J. Orantes Bermejo

# Element content of propolis collected from different areas of South Spain

J. Serra Bonvehí · F.J. Orantes Bermejo

Received: 23 April 2012 / Accepted: 15 November 2012 / Published online: 28 November 2012  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

**Abstract** The aim of this work is to determine the content of essential and toxic elements in 25 raw propolis samples, when considering pollution agents and geographical and botanical factors. The microwave-assisted digestion was the most reliable and accurate method for determination of inorganic elements in propolis samples. The results were obtained using certified reference materials in a good agreement with certified values. Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy was used for the determination of 23 macro- and microelements (Ag, Al, As, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Si, Sn, and Zn). A Mercury analyzer was also utilized for the detection of the total Hg. Among the analyzed metals, Ca, K, Mg, Zn, Si, S, Fe, Al, P, and Na were found to be the most predominant. Heavy metals (As, Cd, Hg, and Pb) were determined in minimal concentration, and Pb was the highest mean contained toxic ( $<3.80$  mg/kg), without influence on provisional tolerable weekly intake values. The method can be applied for routine analysis and quality and environmental pollution controls of toxic elements in propolis samples. The results obtained

indicate no pollution of the collection areas and naturally high concentration of Al ( $460 \pm 62.2$  mg/kg).

**Keywords** Propolis · Heavy metals · Trace elements · ICP-AES · Mercury analyzer

## Introduction

Propolis is a natural product collected by honeybees with an extremely complex composition and used as phytochemical ingredient in functional foods at levels that may confer health benefits (International Food Information Service 2005). Most of the propolis is based on ethanol/propylene glycol extracts, indicating that it has antiseptic, antifungal, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant properties (Bonvehí and Gutiérrez 2011; Kujumgiev et al. 1999). The major fractions are resins and balsams composed of flavonoids and phenolic acids or their esters, which often form up to 50 % of all the ingredients (Bonvehí and Coll 2000). Several authors have indicated that bees and their products may be used as biological indicators of the environmental pollution which are present in the area where they fly (Burdock 1998; Perugini et al. 2011). Since they harvest from different plants which are growing in different agro-climatic conditions, significant differences can be expected in the mineral composition. Air and ground contain heavy metals which contaminate the bee colony and its products. Lead, cadmium, mercury, and arsenic are the principal toxic heavy metals. Lead,

J. S. Bonvehí (✉)  
Research and Development of Nederland Co,  
P.O. Box 34,  
08890 Viladecans (Barcelona), Spain  
e-mail: serrjosep@gmail.com

F. O. Bermejo  
Apinevada Analytical Laboratory of Bee Products,  
Lanjarón, Granada, Spain

originated mainly from vehicle exhaust, can contaminate air and later, nectar, pollen, and propolis. It causes neurological, physiological, and behavioral effects in children in function of current levels of exposure. On the other hand, cadmium, which is originated from metal industry and incinerators, is emitted from the soil to plants (Bogdanov 2006). Particles of Hg in suspension can be transported long distances in the atmosphere and is considered as an indicator of urban and industrial pollution, interfering with water absorption, photosynthesis, and respiration of the plants (Morgano et al. 2010). Arsenic is a ubiquitous and is a toxic element that can be found in rocks, water, soils, and plants and even in air. Arsenic appears in the environment in variable oxidation states ( $-3$ ,  $0$ ,  $+3$ ,  $+5$ ).

A provisional tolerable weekly intake (PTWI) of the toxic heavy elements has been established at 25, 7, 15, 14, and 4 or 1.6  $\mu\text{g/kg}$  of body weight for Pb, Cd, As, Sn, and Hg (as inorganic or methylmercury), respectively (FAO/WHO 2007). They are persistent, remaining in the environment for long periods without changing their toxic properties.

The honeybee is quite susceptible to serve as an indicator of pollution; in fact, numerous scientific publications show traces of Pb and Cd pollution in bee products (Kalbande et al. 2008; Madras-Majeswska and Jasinski 2003). Furthermore, the trace element profiles provided information enough to develop the classification of the geographical origin of propolis (Cantarelli et al. 2011) and identify the possible presence of toxic elements according to the origin of the source, the season of the year, and the frequency of rainfall, among other factors (Bogdanov et al. 2007).

Traces of certain metals can also cause a variety of undesirable changes in propolis preparations during their formulation and storage. Among trace elements, chromium, iron, and zinc were the most common. When propolis is in contact with stainless steel surfaces during harvesting, processing and/or its preparation to be commercialized can generate higher Cr content, due to the corrosive effect of propolis acidity. This acidity is produced for the possible presence of some low-molecular-mass acids (fundamentally phosphoric acid), which are originated from plant exudation (Bankova et al. 1998; New Zealand Food Safety Authority 2006). Phosphoric acid is corrosive in contact with most construction materials so it is recommended to use material manufactured from food-grade stainless steel. The hives are made basically of natural materials

(wood), presenting no risk of contamination in the environment or the apiculture products. Therefore, galvanized containers can be a source of Zn contamination. It can also be assumed that phenolic compounds present in propolis tend to be chelate metals such as iron and copper, catalyzing components of chemical reactions which originate free radicals or chelates with heavy metals. Even at levels of a few milligrams per kilogram, complexes can be formed causing the development of colors (e.g., black pigment when iron combines with phenolic compounds). According to these factors, propolis can contain heavy metals, which can significantly affect the biological properties of derived products (e.g., tincture of propolis). English propolis reported elevated values of lead, from 2.3 to 461  $\text{mg/kg}$ , in proximity to industrial areas (UK Food Standards Agency 1995). The maximum limit fixed for this metal by the Japan Propolis Conference was 20  $\text{mg/kg}$  (Yamamoto 1996), and the limit fixed by the Codex Alimentarius in foods in general is 2  $\text{mg/kg}$  (FAO/WHO 2011). Through this action, the content of toxic elements in propolis is a useful bioindicator for monitoring pollution and an important quality control parameter showing its health safety (Cvek et al. 2008).

One of the most significant advances made in trace metal analysis in recent decades has been the use of a plasma source for atomization–excitation samples, but furnace atomic absorption spectrometry and graphite furnace atomic absorption spectrometry are still among the most commonly used methods for the determination of Cu, Ni, Pb, Cd, Mo, and Zn in biological and food samples (Kulevanova et al. 1995; Tuzen et al. 2004). More recently, a radiofrequency discharge is used to transfer energy to a gas with an electrical power source (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)), with a considerably improved detection limits, accuracy, and precision, as well as for its multielement capabilities. Prior to inductively coupled plasma (ICP) analyses, the samples should be first liquefied in a solution. For this reason, a digestion process is needed for solid samples. Dry, wet, and microwave digestion are the main methods to trace heavy metals in solid samples. Sample digestion or decomposition is a critical phase in the analysis of products with high organic matter contents such as propolis. Thus, a simple and rapid analytical procedure for propolis is needed to carry out routine product screening and quality analyses.

The purpose of the present work was to determine simultaneous measurements of macro- and heavy metals

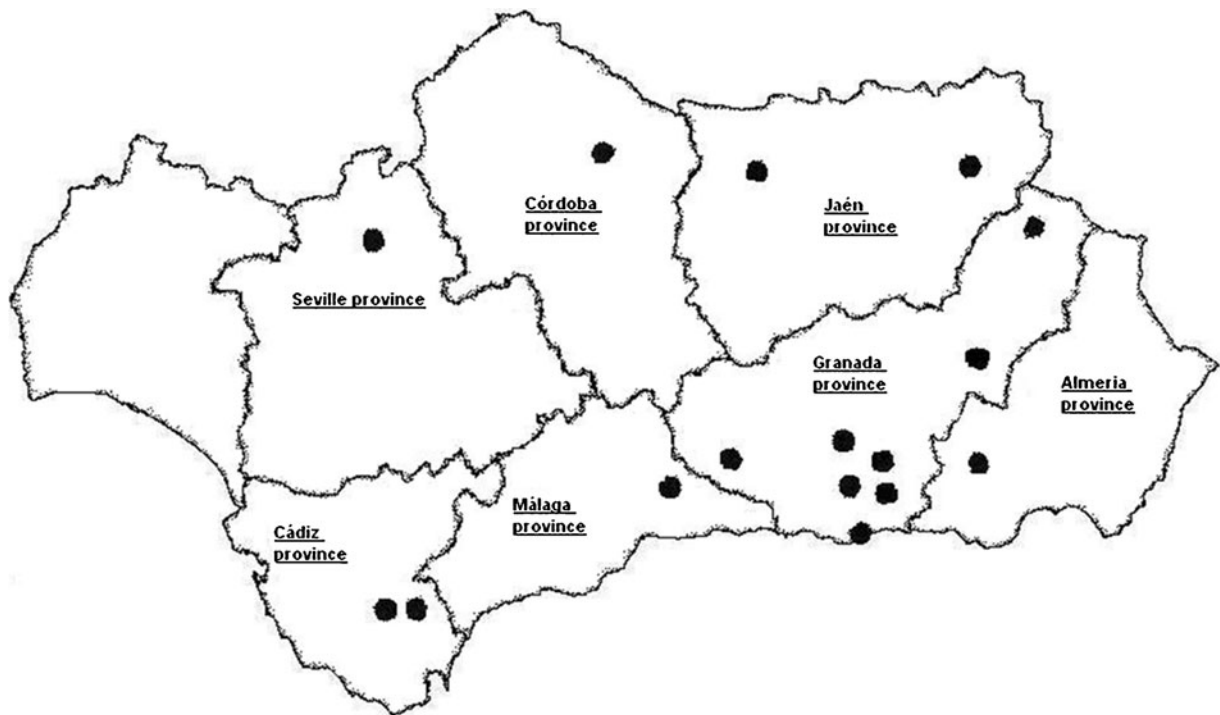
of propolis samples, using ICP-spectrometry with an appropriate microwave digestion technique. In the trace element analysis, the standard certified reference materials (CRM or SRM) play an important role in terms of accuracy and reliability. For this reason, analysis of CRM is carried out at first, and then the obtained results are compared with the certified values to assure that accurate and reliable results are obtained (Srogi 2006). Another goal was to examine the health safety of tested samples regarding the content of toxic elements.

## Experimental

### Propolis samples

The work was realized using 25 representative samples of propolis obtained from apiaries located in various regions of Andalusia (South Spain). Figure 1 shows the collection sites of each sample. The samples were collected mainly in three areas: (a) The “Sierra Nevada National Park” (172,000 ha) is the second highest massif in Western Europe, after the Alps; there are more than 20 peaks over 3,000 m in altitude, and the highest of which, at 3,481 m, is Mulhacen. The

“Sierra Nevada” has the highest variety of vegetation in Spain (2,100 species and subspecies of recorded area and 66 endemic plants). Trees in the park include Iberian Mountain pine, holm oak, chestnut, Pyrenean oak, poplar, willow, ash, elm, etc. The habitat ranges through rocky summits, deep gorges, fast rivers, and about 50 glacial lakes. The fragile balance is seriously threatened by the excessive grazing of livestock and by climate change, with continental Mediterranean climate with cold winters and mountain climate; (b) the “Alcornocales Natural Park” (168,000 ha) is made up from low mountain ranges containing more sandstone than limestone and contains the world largest cork oak forest; the flora include gall, Pyrenean, and holm oaks, wild olives, carob, alder and ash, tree heathers, lavenders, laurels, hazels, etc.; and (c) the “Sierra Norte Nature Park” (177,500 ha), in the province of Seville, spans part of the “Sierra Morena Mountain Range” where the countryside predominantly consists of large pastures with oak trees. The plant life of the Sierra Norte is adapted to a Mediterranean climate with dry, hot summers and mild winters, the cork oak being one of the most characteristic species. Species which require more moisture, for example, the gall-oak, can be found in the areas at higher altitude.



**Fig. 1** Map of Andalusia region, with the distribution of sampling areas

On the banks of the rivers, especially “El Huesna River,” you can find spectacular woods. They contain species of great ecological worth such as the alder tree, ash, elm, the black poplar, and various species of willow, blackberry, and hazelnut trees (Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment 2010). The raw propolis samples were collected in the same apiary from spring to winter (2006 to 2007), employing the scraping technique with a production per hive between 105 and 480 g/year in Langstroth hives and of 180 to 500 g/year in Dadant hives. Pollen grains may be introduced into propolis by worker bees during manufacture and may contain ‘bees’ loads from anemophilous plant species. The palynological processing of samples was also determined according to Barth (1998). The main plants species visited that contributed to the formation of propolis were: chestnuts (*Castanea sativa*), oaks (*Quercus sp.*), poplars (*Populus sp.* (Aigeros section)), eucalyptus (*Eucalyptus sp.*), and pines (*Pinus sp.*). Representative samples were harvested (300 g) and sent to the laboratory with the corresponding collection and location data (Table 1). After harvesting, prior to analysis, macroscopic impurities were removed. Later, two subsamples from different parts of each lot were taken to compose the 50-g sample. The samples, previously cooled at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 24 h, were milled in an IKA A 10 analytical mill (LabSource, UK) and sifted with a 0.420-mm (40-mesh) sieve. The resulting product was packaged in foils; 25 g was used as a control sample, and 25 g was left to carry out assays in darkness at  $4^{\circ}\text{C}$ . The samples were homogenized and analyzed in triplicate.

### Reagents and standards

All reagents were of analytical grade unless otherwise stated. Ultrapure water (Milli-Q, Millipore Corp, Bedford, MA, USA; resistivity of  $18.2\text{ M}\Omega\text{cm}$ ) was used for spectrometric use. Nitric acid, hydrochloric acid, mercury chloride, and hydrogen peroxide were of suprapure quality (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany). All laboratory glassware was kept overnight in 10 % (v/v)  $\text{HNO}_3$  acid solution, rinsed with deionized water, and then dried in a dust-free environment prior to use. Standard certified reference material BCR-679® (White Cabbage, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium) was used to verify the digestion method. Standard ICP multi-element Merck® solution VI for MS in 1 mol/l  $\text{HNO}_3$  and As (V) standard were purchased from Merck (Darmstadt,

**Table 1** Propolis sample collection from different locations throughout East Andalusia

| Sample no. | Locations                      | Province | Apiary |
|------------|--------------------------------|----------|--------|
| 1          | Sierra Nevada-Las Alpujarras   | Granada  | 1      |
| 2          | Sierra Nevada-Las Alpujarras   | Granada  | 1      |
| 3          | Sierra of Baza                 | Almería  | 2      |
| 4          | Sierra Nevada-Las Alpujarras   | Granada  | 3      |
| 5          | Sierra Nevada-Las Alpujarras   | Granada  | 3      |
| 6          | Monte of Pueblo                | Granada  | 4      |
| 7          | Sierra Nevada                  | Granada  | 5      |
| 8          | Sierra Nevada                  | Granada  | 5      |
| 9          | Los Alcornocales Natural Park  | Cádiz    | 6      |
| 10         | Los Alcornocales Natural Park  | Cádiz    | 7      |
| 11         | Sierra of the Garnatilla       | Granada  | 8      |
| 12         | Sierra of the Contraviesa      | Granada  | 9      |
| 13         | Las Alpujarras                 | Granada  | 10     |
| 14         | Las Alpujarras                 | Granada  | 10     |
| 15         | Las Alpujarras                 | Granada  | 10     |
| 16         | Las Alpujarras                 | Granada  | 10     |
| 17         | Sierra of the Sagra            | Granada  | 11     |
| 18         | Sierra of the Sagra            | Granada  | 11     |
| 19         | Sierra of the Sagra            | Granada  | 11     |
| 20         | Sierra of the Sagra            | Granada  | 11     |
| 21         | Sierras of Tejeda and Almijara | Málaga   | 12     |
| 22         | Sierra Morena                  | Córdoba  | 13     |
| 23         | Sierra Morena                  | Jaén     | 14     |
| 24         | Sierra Norte of Sevilla        | Seville  | 15     |
| 25         | Sierra of Cazorla              | Jaén     | 16     |

Harvested in 2006 and 2007

Germany). ICP/direct-coupled plasma (DCP) standard individual solutions of P, S, Sb, Si, and Sn in 6–10 wt% HCl (Sigma-Aldrich) were used for their calibration.

### Analytical procedures

#### Water content

Water content was determined by gravimetry using 2 g of finely ground propolis in a conventional kiln at  $103\text{--}105^{\circ}\text{C}$  for 2–3 h, until a constant weight was reached (Bonvehí et al. 1994).

#### Mineral salt content

The mineral salt of approximately 2 g of finely ground propolis was placed in a previously weighed porcelain

crucible and heated (first in a stove at 120 °C, and later determined by incineration at 500–550 °C) for 8 h until white ash was obtained. The ash content was calculated as a percentage of the weight of the dry residue (Bonvehí et al. 1994).

#### Mineralization of propolis samples

The 350 mg of milled and homogenized raw propolis was weighted directly in digestion vessels. Later, with 5 ml of 65 % HNO<sub>3</sub> (v/v) for trace analysis and 2 ml of 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) as oxidizing agents, vessels were covered and placed into the rotator body of microwave oven Milestone MLS 1200 Mega Oven (Milestone, Bergamo, Italy), and a digestion program was realized according to the procedure recommended by the manufacturer. The digestion conditions were—1 min at 250 W (smooth oxidation of organic matter); 1 min at 0 W (proceeding of reaction without addition energy to avoid run-away temperatures and overpressures); 5 min at 250 W (termination of the soft oxidation of the organic compounds); 5 min at 400 W, and 5 min at 600 W (final oxidation process), and ventilation for 4 min (Cvek et al. 2008). After cooling digested samples, they were transferred to volumetric flasks and diluted to 50 ml using Millipore water with 5 % solution of HCl (v/v). Digestion procedures were conducted in triplicate. A reagent blank (including preparations prior to ICP-AES analysis) was also prepared.

#### Determination of mineral elements by ICP

All elements were determined by ICP-atomic emission spectrometer Varian 730-ES with sample separation system using standard techniques (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). The system was controlled by ICP Expert software, utilizing argon with a purity of 99.996 % as both plasma liquid and auxiliary gas. The operating conditions were as follows—power, 1,000 W; nebulizing rate, 0.9 ml/min; flow rates of argon and the auxiliary gas, 1.5 and 15 l/min; integrating and reading times, 10 and 3 s; number of replicates, 3. The wavelengths (nanometers) used are described in Table 2. Interference of uncorrected elements shall be less than 20 % of the measure value.

The calibration standard was prepared by diluting a commercially available multi-element standard (ICP VI, Merck) and ICP/DCP element solutions with Millipore water containing 0.6 % nitric acid.

**Table 2** Recommended wavelengths, spectral interferences, quantification limits, and recoveries of the different elements determined by ICP-AES

| Element         | Line (nm) | Interfering elements | LOQ (μg/kg) | Recovery (%) |
|-----------------|-----------|----------------------|-------------|--------------|
| Ag              | 328.068   |                      | 50          | 97.2         |
| Al              | 308.215   | Mn, Fe               | 70          | 96.8         |
| As              | 188.980   | Al                   | 75          | 89.7         |
| B               | 249.773   | Fe                   | 68          | 96.2         |
| Ca              | 393.366   |                      | 150         | 95.8         |
| Cd              | 214.438   | Fe                   | 25          | 93.6         |
| Co              | 228.616   | Ti                   | 50          | 90.7         |
| Cr              | 267.716   | Mn, V                | 65          | 102.7        |
| Cu              | 324.754   | Ti, Fe               | 57          | 95.8         |
| Fe              | 259.940   |                      | 70          | 98.6         |
| K               | 766.490   | Mg                   | 138         | 89.8         |
| Mg              | 279.800   |                      | 25          | 97.3         |
| Mn              | 257.610   | Fe, Mo, Cr           | 22          | 96.5         |
| Na              | 568.821   |                      | 126         | 93.8         |
| Ni              | 231.604   | Co                   | 50          | 96.4         |
| P               | 213.618   | Cu, Fe, Mo, Zn       | 250         | 89.5         |
| Pb              | 220.353   | Al, Co, Ti           | 70          | 91.5         |
| S               | 180.669   | Ca                   | 75          | 91.8         |
| Sb              | 206.833   | Cr, Mg, Co, Mn       | 204         | 89.5         |
| Se              | 196.026   |                      | 64          | 88.2         |
| Si              | 251.611   |                      | 71          | 83.7         |
| Sn              | 189.980   |                      | 58          | 94.1         |
| Zn              | 213.856   | Cu, Ni, Fe           | 100         | 97.1         |
| Hg <sup>a</sup> | 253.7     |                      | 2           | 97.8         |

LOQ limit of quantification

<sup>a</sup>Mercury analyzer

The samples and reagents were prepared daily in order to avoid losses and contamination. The concentration employed to construct the standard curve were 0.005 to 1.0 mg/kg for As, Cd, Co, and Pb; 0.050 to 2.5 mg/kg for Al; 0.020 to 5 mg/kg for Cu and Fe; 0.050 to 5 mg/kg for Mn, Sn, and Zn; 0.100 to 5 mg/kg for Cr and Ni; 5 to 100 mg/kg for Ca, Mg, and Na; 1 to 100 mg/kg for K and P; and 0.050 to 1.0 mg/kg for Ag, B, S, Sb, Se, and Si. A quality control sample (SRM) was prepared from the standard reference material BCR-679 in 0.6 % nitric acid.

#### Determination of mercury

The concentration of Hg was determined by Mercury Analyzer (AMA254 Leco with AS254 Autoloader;

Leco Corporation, St. Joseph, MI) by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry between 0.10 and 0.15 g of sample. Controlled heating in an oxygenated decomposition furnace was used to liberate Hg. The sample was dried and then thermally and chemically decomposed within the decomposition furnace. The decomposition products were carried by flowing oxygen to the catalytic section of the furnace. Here, oxidation was completed, and halogens and nitrogen/sulphur oxides are trapped. The remaining decomposition products were then carried to an amalgamator that selectively traps Hg. After the system was flushed with oxygen to remove any remaining gases or decomposition products, the amalgamator was rapidly heated, releasing Hg vapor. Absorbance was measured at 253.7 nm as a function of Hg concentration. The typical working range for this method was 0.05 to 600 ng Hg. The instrument detection limit was 0.01 ng total Hg. For mercury stock solution, 0.1354 g of mercury chloride was dissolved in 75 ml of reagent water; 10 ml of concentrated nitric acid was added and the volume adjusted to 100 ml (1 ml=1.0 mg Hg). For mercury working standards, successive dilutions of the stock Hg solution were made to obtain standards containing 100 and 10 mg/kg. For calibration of the low range, standards of 0.00, 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.30, and 0.50 mg/kg were used. These were prepared for dilution of the 10 mg/kg standard. A blank calibration solution was also utilized for zero calibration. Acidity of the working standards should be maintained at least 0.15 % nitric acid.

#### *Evaluation of method performance*

Because a reference material was not available for propolis, certified reference material was analyzed (BCR-679) to assure the quality results (Larner et al. 2006). Quantification limits were calculated using the method of Mermet and Poussel (1995). Instrumental standardization, analytical spectral lines of the elements, inter-elemental correction, and background correction procedures were also evaluated (Table 2). A triple repeated measurement of the certified standard BCR-679 was realized (Table 3). Accuracy was assessed using a mixture of Andalusian propolis spiked with known amounts of the elements certified in reference material and ICP/DCP standard solutions by 10-, 20-, and 100-fold dilution. In parallel, the same samples ( $n=3$ ) were analyzed

**Table 3** Triple-repeated measurement of the certified standard BCR-679 by ICP-AES

| Element         | Certified (mg/kg) | Confidence interval (95 %) | Concentration (mg/kg) |
|-----------------|-------------------|----------------------------|-----------------------|
| B               | 27.7              | ±1.9                       | 26.8                  |
| Ca              | 7,768             | ± 655                      | 7,473                 |
| Cd              | 1.66              | ± 0.07                     | 1.61                  |
| Cr              | 0.60              | ± 0.1                      | 0.61                  |
| Cu              | 2.89              | ± 0.12                     | 2.79                  |
| Fe              | 55                | ± 2.5                      | 55.4                  |
| Hg <sup>a</sup> | 6.3 (µg/kg)       | ±1.4                       | 6.1 (µg/kg)           |
| Mg              | 1,362             | ± 127                      | 1,332                 |
| Mn              | 13.3              | ± 0.5                      | 12.9                  |
| Ni              | 27                | ± 0.8                      | 26.2                  |
| P               | 3,307             | ± 241                      | 2,970                 |
| Zn              | 79.7              | ± 2.7                      | 77.5                  |

<sup>a</sup>Mercury analyzer

without added standards. The mean recovery percentage was obtained by comparing the expected and found element values. Together with accuracy, the repeatability (intra-assay precision) was examined and expressed as a relative standard deviation (RSD) of nine determinations (three concentrations in three replicates). The repeatability of the measurement of the different elements was evaluated by repeating ( $n=3$ ) the analysis on the same mineralized propolis sample, with RSD values between 1.15 and 5.10 % in accordance with general guidelines of ICH (1996).

#### *Statistical analysis*

Chemical analyses were performed in triplicate. To verify if the means of inorganic elements obtained for the propolis samples from various locations were statistically different at  $P \leq 0.05$ , Tukey's multiple-comparison test was applied. Data obtained from the cluster analysis (Vogt and Nagel, 1992) and measurement were subjected to the analysis of variance, and the least significant difference was calculated using the software Statistica for Windows 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

#### **Results and discussion**

A procedure of mineralization of raw propolis has been described and evaluated for the risk of

environmental contamination of Andalusian propolis. Although the microwave-assisted digestion is largely utilized for matrices of different kind, conventional procedures such as wet digestion and dry ashing are used in many laboratories. The microwave technique used in this work provides better mineralization and no formation of oxides or elemental occlusion to siliceous particles. At the same time, the instrumental parameters of the ICP-AES system were adjusted, determining wavelengths, spectral interferences, and quantification limits (LOQ) in the analytical procedures of the analyses (Table 2). The accuracy of the method was verified using the recovery test, which ranged from 88.2 to 102.7 % of individual elements. Validation of digestion method was necessary to assure that accurate and reliable results were obtained with adequate sensitivity for the contaminants analyzed. BCR-679 White Cabbage was used as standard certified reference material for the validation process, obtaining a variability between the certified values and the results obtained lower than 10 % (RSD<10 %) (Table 3).

The means, standard deviations, and ranges of the metals concentrations found in 25 samples of propolis analyzed are presented in Table 4. There was very wide within-state variation in the levels of all analytes, and statistical data analyzed by Tukey's multiple test (95 % confidence level) showed significant difference between elements (Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Si, and Zn) and locations. Figure 2 illustrates the results obtained in carrying out cluster analysis of the 25 samples using the standardized mean values of the elements and locations/apiaries. The structure of the dendrograms and the relative  $D^2$  distance for which the propolis are separated showed the degree to which the single variables are taxonomic. It was possible to separate different groups between elements pattern, apiaries, and locations. The element patterns of propolis we have studied were sufficiently distinctive to permit the discrimination of propolis from different locations in Andalusia.

This variation is influenced by different mineral composition of plants and by numerous environmental factors (e.g., soil pH, humidity, mobility of trace elements, etc.). Other studies demonstrate the importance of the method of propolis collection on the amount of toxic metals (Sales et al. 2006). The results obtained showed that mineral salts ranged from 0.70 to 3.20 g/100 g (mean,  $2.18 \pm 0.96$  g/100 g), and water content does not surpass 7 g/100 g (mean,  $2.41 \pm 1.18$  g/100 g).

The percentage of moisture in a sample of propolis is affected by the storage and manipulation conditions. The crude propolis cleaning process includes a washing step in which the product is immersed in water. If the subsequent drying step is not done properly, the percentage of water in the final product will be affected (Bonvehí and Gutiérrez 2011).

But, if we consider the fact that the concentration of heavy metals in propolis can reflect the contamination of the environment originating from emissions, then we can assume that the samples analyzed probably came from areas which are not contaminated by industry (Table 4).

Since the absence of heavy metals and pesticides is required as well, propolis may be used as an indicator of environmental contamination, as has been suggested (Orsi et al. 2006). With greater difference, Ca has the largest percentage of all the macro-elements we studied (1,773 to 6,683 mg/kg). It was followed by K (735–4,790 mg/kg), Mg (301–1,405 mg/kg), Zn (163–1,364 mg/kg), Si (479–897 mg/kg), S (394–1,373 mg/kg), Fe (312–1,270 mg/kg), Al (308–582 mg/kg), P (171–611 mg/kg), and Na (93–225 mg/kg). Lower values of Ca, K, Mg, and Na have been reported in Croatian propolis (Cvek et al. 2008). Microelements are well-known to act in synergy with enzymes and vitamins. For example, iron is the functional component of the respiratory enzymes, while zinc-dependent enzymes take part in the metabolism of carbohydrates and proteins. In Turkish propolis, previously reported concentrations of Na of 412–1,416 mg/kg were higher, while those of Ca (133–793 mg/kg) and of K (121–364 mg/kg) were lower, compared with our results (Dogan et al. 2006). On the other hand, in diet products containing propolis, Na levels ranged from 195 to 1,360 mg/kg (Rodriguez et al. 1999). In samples of propolis harvested in different regions of the Republic of Moldova, K ranged from 750 to 1,030 mg/kg, Fe from 407.5 to 876.9 mg/kg, and Mg between 179 and 255.8 mg/kg (Nicolae and Tatiana 2007). Generally, the variability of results for all elements is large, reflecting the wide range in the composition of propolis samples. Although the levels of Al in propolis are usually unremarkable, propolis samples collected from locations with mineral-rich acidic soils, such as, e.g., in the Alcornocales Natural Park at Location 5, Apiaries 6 and 7 (Ojeda et al. 1995), were found to contain high levels of this element (mean,  $460 \pm 62.2$  mg/kg). The toxicity of Al has

**Table 4** Concentrations of metals in the collected propolis

| Element            | Locations/number of samples               |        |        |                            |                            |       |        |
|--------------------|-------------------------------------------|--------|--------|----------------------------|----------------------------|-------|--------|
|                    | 1                                         | 2      | 3      | 4                          | 5                          | 6     | 7      |
| Aluminium (mg/kg)  | 497/528<br>408/559<br>(498±65)            | 514    | 308    | 507/582<br>(545±53)        | 448/504<br>(476±40)        | 480   | 465    |
| Antimony (µg/kg)   | <204                                      | <204   | <204   | <204                       | <204                       | <204  | <204   |
| Arsenic (µg/kg)    | 90/<75<br><75/130<br>(92.5±26)            | 86     | 101    | 118/<75<br>(96.5±30.4)     | 87/91<br>(89±2.83)         | <75   | 114    |
| Boron (mg/kg)      | 7.47/8.71<br>9.32/10.1<br>(8.90±1.11)     | 5.85   | 8.69   | 14.9/13.2<br>(14.1±1.20)   | 6.91/8.53<br>(7.74±1.17)   | 8.34  | 6.28   |
| Cadmium (µg/kg)    | 50/65<br>85/94<br>(73.5±19.8)             | 70     | 45     | 94/110<br>(102±11.3)       | 75/69<br>(72±4.24)         | 58    | 38     |
| Calcium (mg/kg)    | 2,846/3,124<br>3,289/2,688<br>(2,987±270) | 1,773  | 6,683  | 2,017/1,834<br>(1,926±129) | 4,047/4,301<br>(4,174±180) | 1,826 | 5,725  |
| Chromium (mg/kg)   | 1.37/1.48<br>1.27/1.68<br>(1.45±0.18)     | 0.51   | 2.11   | 0.44/0.57<br>(0.51±0.09)   | 2.41/2.73<br>(2.57±0.23)   | 1.98  | 2.16   |
| Cobalt (mg/kg)     | 0.14/0.18<br>0.13/0.21<br>(0.17±0.04)     | <0.050 | 0.27   | 0.57/0.82<br>(0.70±0.18)   | 0.35/0.27<br>(0.31±0.06)   | 0.23  | <0.050 |
| Copper (mg/kg)     | 2.94/3.71<br>3.61/3.98<br>(3.55±0.44)     | 3.17   | 2.08   | 3.31/3.51<br>(3.45±0.20)   | 4.42/3.87<br>(4.15±0.39)   | 2.98  | 2.17   |
| Iron (mg/kg)       | 337/350<br>363/345<br>(349±11)            | 367    | 318    | 397/431<br>(414±24)        | 873/901<br>(887±20)        | 338   | 648    |
| Lead (mg/kg)       | 0.77/0.94<br>0.84/1.02<br>(0.88±0.13)     | 0.51   | <0.070 | 0.73/0.89<br>(0.81±0.11)   | 2.59/2.89<br>(2.74±0.21)   | 1.76  | 1.03   |
| Magnesium (mg/kg)  | 776/817<br>751/831<br>(794±37)            | 359    | 1,272  | 843/870<br>(857±19)        | 944/998<br>(971±38)        | 717   | 1,405  |
| Manganese (mg/kg)  | 7.10/6.52<br>7.71/6.42<br>(6.94±0.60)     | 12.1   | 18.4   | 19.7/21.1<br>(20.4±0.99)   | 9.17/11.2<br>(10.3±1.52)   | 14.7  | 9.85   |
| Mercury (µg/kg)    | 9/7/8/8<br>(8±1)                          | 8      | 7      | 10/8<br>(9±1)              | 10/8<br>(9±1)              | 10    | 7      |
| Nickel (mg/kg)     | 2.97/3.38<br>2.74/3.41<br>(3.13±0.33)     | 0.64   | 2.08   | 1.78/1.95<br>(1.87±0.12)   | 2.27/1.97<br>(2.12±0.21)   | 3.18  | 1.15   |
| Phosphorus (mg/kg) | 578/611<br>560/627<br>(594±31)            | 171    | 217    | 489/535<br>(512±33)        | 205/221<br>(213±11)        | 222   | 490    |
| Potassium (mg/kg)  | 1,916/1,892<br>2,091/1,929<br>(1,965±87)  | 2,874  | 2,710  | 3,126/3,217<br>(3,172±63)  | 767/735<br>(751±23)        | 1,874 | 2,787  |
| Selenium (µg/kg)   | <64/78<br>89/<64<br>(73.8±12.1)           | 69     | 81     | <64/81<br>(72.5±12)        | 79/91<br>(85±8.50)         | 69    | 81     |
| Silicon (mg/kg)    | 812/775<br>747/841<br>(794±41)            | 694    | 589    | 897/864<br>(881±23)        | 735/693<br>(714±30)        | 637   | 479    |

**Table 4** (continued)

|                   |                                           |                                           |       |                            |                           |       |                              |
|-------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------|----------------------------|---------------------------|-------|------------------------------|
| Silver (µg/kg)    | <50/64<br>71/57<br>(60.5±9)               | 54                                        | <50   | 56/61<br>(59±4)            | 67/56<br>(62±8)           | <50   | 61                           |
| Sodium (mg/kg)    | 147/159<br>174/139<br>(155±15)            | 93                                        | 137   | 172/191<br>(182±13)        | 184/159<br>(172±18)       | 167   | 153                          |
| Sulphur (mg/kg)   | 496/589<br>628/544<br>(559±60.2)          | 752                                       | 428   | 651/744<br>(698±66)        | 947/1,083<br>(1,015±96)   | 725   | 1,373                        |
| Tin (µg/kg)       | 94/76<br>84/109<br>(90.8±14.2)            | 69                                        | 81    | 85/69<br>(77±11.3)         | 69/78<br>(73.5±6.40)      | 82    | 98                           |
| Zinc (mg/kg)      | 931/897<br>984/1,017<br>(957±54)          | 163                                       | 279   | 1,236/1,307<br>(1,272±50)  | 1,021/1,063<br>(1,042±30) | 1,364 | 245                          |
| Element           | Locations/number of samples               |                                           |       |                            |                           |       |                              |
|                   | 8                                         | 9                                         | 10    | 11                         | 12                        | 13    | mean±SD                      |
| Aluminium (mg/kg) | 450/463<br>496/406<br>(454±37)            | 465/484<br>502/427<br>(470±32)            | 443   | 371/419<br>(395±34)        | 395                       | 378   | 460±62.2<br>(308–582)        |
| Antimony (µg/kg)  | <204                                      | <204                                      | <204  | <204                       | <204                      | <204  | –                            |
| Arsenic (µg/kg)   | <75/125<br>84/<75<br>(89.8±23.9)          | 109/79<br><75/84<br>(86.8±15.3)           | 83    | 79/91<br>(85±8.50)         | <75                       | 115   | 90.6±17.6<br>(<75–130)       |
| Boron (mg/kg)     | 4.52/5.17<br>5.27/4.21<br>(4.79±0.51)     | 6.74/8.52<br>7.47/9.10<br>(7.96±1.06)     | 9.10  | 7.94/8.91<br>(8.43±0.69)   | 7.30                      | 5.87  | 7.94±2.45<br>(4.21–14.9)     |
| Cadmium (µg/kg)   | 72/91<br>102/68<br>(83.3±16)              | 110/64<br>84/71<br>(82.3±20.3)            | 46    | 67/84<br>(75.5±12)         | 40                        | 59    | 72.4±20.6<br>(38–110)        |
| Calcium (mg/kg)   | 2,011/2,131<br>2,204/1,884<br>(2,058±140) | 5,844/6,127<br>5,747/6,170<br>(5,972±208) | 1,894 | 3,677/3,841<br>(3,759±116) | 2,042                     | 2,341 | 3,443±1,672<br>(1,773–6,683) |
| Chromium (mg/kg)  | 1.49/1.77<br>1.64/1.85<br>(1.69±0.16)     | 0.33/0.41<br>0.57/0.65<br>(0.49±0.15)     | 1.06  | 1.72/1.60<br>(1.66±0.09)   | 2.67                      | 1.04  | 1.42±0.72<br>(0.33–2.73)     |
| Cobalt (mg/kg)    | 0.68/0.79<br>0.84/0.60<br>(0.73±0.11)     | 0.12/0.14<br>0.17/0.11<br>(0.14±0.03)     | 0.19  | 0.08/0.12<br>(0.10±0.03)   | 0.11                      | 0.13  | 0.29±0.26<br>(<0.05–0.84)    |
| Copper (mg/kg)    | 2.78/3.21<br>2.64/3.72<br>(3.09±0.49)     | 3.76/4.27<br>3.25/4.72<br>(4.0±0.64)      | 3.27  | 3.87/4.25<br>(4.06±0.27)   | 2.75                      | 4.11  | 3.45±0.68<br>(2.08–4.72)     |
| Iron (mg/kg)      | 734/759<br>697/761<br>(738±30)            | 317/334<br>312/347<br>(328±16)            | 1,270 | 1,084/1,220<br>(1,152±96)  | 332                       | 462   | 572±303<br>(312–1,270)       |
| Lead (mg/kg)      | 2.89/3.75<br>3.29/3.67<br>(3.40±0.40)     | 0.37/0.54<br>0.43/0.49<br>(0.46±0.07)     | 0.51  | 1.84/2.26<br>(2.05±0.30)   | 1.76                      | 0.84  | 1.47±1.12<br>(<0.07–3.75)    |
| Magnesium (mg/kg) | 721/764<br>689/776<br>(738±40)            | 312/334<br>364/301<br>(328±28)            | 1,272 | 1,120/1,184<br>(1,152±45)  | 1,216                     | 705   | 814±318<br>(301–1,405)       |
| Manganese (mg/kg) | 24.2/25.4<br>26.4/27.1                    | 22.1/22.4<br>22.8/20.9                    | 8.92  | 9.47/9.96<br>(9.72±0.35)   | 11.1                      | 8.72  | 15.3±7.16<br>(6.42–27.1)     |

**Table 4** (continued)

|                    |                                          |                                          |       |                           |       |       |                          |
|--------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------|---------------------------|-------|-------|--------------------------|
|                    | (25.8±1.26)                              | (22.1±0.82)                              |       |                           |       |       |                          |
| Mercury (µg/kg)    | 9/14/12/11<br>(12±1)                     | 4/8/6/5<br>(6±1)                         | 2     | 7/9<br>(8±1)              | 6     | 7     | 8±2.5<br>(2–14)          |
| Nickel (mg/kg)     | 0.72/0.67<br>0.81/0.93<br>(0.77±0.16)    | 3.50/3.26<br>3.65/2.78<br>(3.30±0.38)    | 0.99  | 0.67/0.78<br>(0.73±0.08)  | 1.27  | 2.14  | 1.99±1.07<br>(0.64–3.65) |
| Phosphorus (mg/kg) | 494/537<br>472/561<br>(516±40)           | 261/294<br>276/259<br>(273±16)           | 584   | 467/448<br>(458±13)       | 188   | 341   | 404±157<br>(171–627)     |
| Potassium (mg/kg)  | 2,025/1,939<br>2,095/1,962<br>(2,005±70) | 2,057/2,121<br>1,984/2,011<br>(2,043±60) | 4,790 | 2,317/2,252<br>(2,285±46) | 1,975 | 2,215 | 2,227±779<br>(735–4,790) |
| Selenium (µg/kg)   | 74/87<br>106/90<br>(89.3±13.2)           | 69/81<br>94/100<br>(86±13.8)             | 71    | 74/89<br>(81.5±10.6)      | <64   | 81    | 79.6±11.6<br>(<64–106)   |
| Silicon (mg/kg)    | 733/764<br>719/775<br>(748±26)           | 597/626<br>691/552<br>(617±58)           | 575   | 584/633<br>(609±35)       | 710   | 619   | 694±104<br>(479–897)     |
| Silver (µg/kg)     | <50/55<br>61/<50<br>(54±5.23)            | <50/67<br>59/76<br>(63±11.1)             | <50   | 61/69<br>(65±5.7)         | 54    | 58    | 58.3±7.49<br>(<50–76)    |
| Sodium (mg/kg)     | 131/154<br>122/146<br>(138±14)           | 179/214<br>189/165<br>(187±21)           | 128   | 197/225<br>(211±20)       | 93    | 146   | 159±32.6<br>(93–225)     |
| Sulphur (mg/kg)    | 787/819<br>748/881<br>(809±56)           | 413/451<br>394/524<br>(446±58)           | 691   | 429/474<br>(452±32)       | 779   | 431   | 671±236<br>(394–1,373)   |
| Tin (µg/kg)        | 91/104<br>79/66<br>(85±16.3)             | 78/112<br>61/94<br>(86.3±21.8)           | 112   | 82                        | 69    | 78    | 84.1±15.3<br>(61–112)    |
| Zinc (mg/kg)       | 955/879<br>994/1,061<br>(972±76)         | 314/331<br>277/257<br>(295±34)           | 1,018 | 844/801<br>(823±30)       | 878   | 349   | 779±376<br>(163–1,364)   |

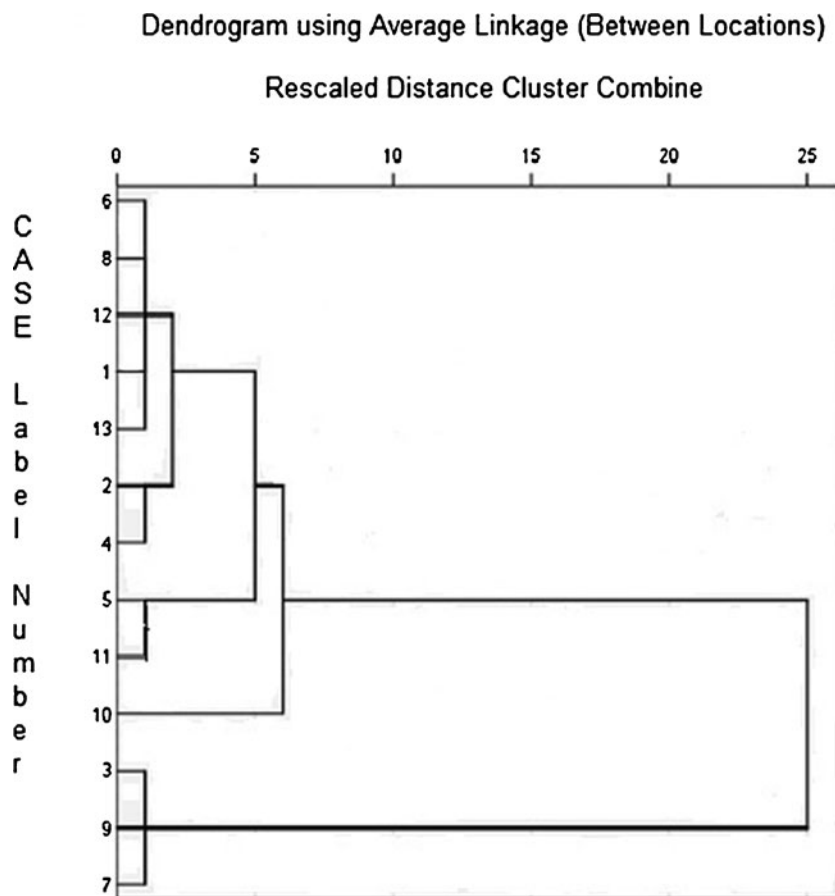
*n*=25 samples

Locations: 1 (Sierra Nevada–Las Alpujarras; Apiaries 1 and 3), 2 (Sierra of Baza; Apiary 2), 3 (Monte of Pueblo; Apiary 4), 4 (Sierra Nevada; Apiary 5), 5 (Los Alcornocales Natural Park; Apiaries 6 and 7), 6 (Sierra of the Garnatilla; Apiary 8), 7 (Sierra of the Contraviesa; Apiary 9), 8 (Las Alpujarras; Apiary 10), 9 (Sierra of the Sagra; Apiary 11), 10 (Sierras of Tejeda and Almijara; Apiary 12), 11 (Sierra Morena; Apiaries 13 and 14), 12 (Sierra Norte of Sevilla; Apiary 15), 13 (Sierra of Cazorla; Apiary 16), locations 1 to 11 (Langstroht hives); locations 12 to 16 (Dadant hives)

been associated recently with clinical complications and neurological dysfunctions and the, most intriguing, Alzheimer's disease (Campbell 2002). However, the true association of these disorders with an excessive intake of Al by the human body is still unknown (provisional PTWI of 1 mg/kg bw), especially in the case of Alzheimer's disease (FAO/WHO 2007). The elevated Al concentrations appear to be inherent in this product and reflect the diverse sources from which the bees forage plant to produce propolis. Al was also found in

high levels in Croatian propolis (153.9 to 604.2 mg/kg) and more recently in propolis collected from different regions of China (average content of 971.2 mg/kg), but its presence in commercial propolis tincture is generally very lower (2.15 to 29 mg/kg) (Cvek et al. 2008; Gong et al. 2012). As to Mn values were found between 6.42 and 27.1 mg/kg, and those of Cu, from 2.08 to 4.72 mg/kg. As to Ni, it was also present, but only at minimal concentration (0.64–3.65 mg/kg). Hence, the regular consumption of propolis would contribute only little to the

**Fig. 2** Dendrogram of average propolis. Locations: 1 (Sierra Nevada–Las Alpujarras; Apiaries 1 and 3); 2 (Sierra of Baza; Apiary 2); 3 (Monte of Pueblo; Apiary 4); 4 (Sierra Nevada; Apiary 5); 5 (Los Alcornocales Natural Park; Apiaries 6 and 7); 6 (Sierra of the Gárnatilla; Apiary 8); 7 (Sierra of the Contraviesa; Apiary 9); 8 (Las Alpujarras; Apiary 10); 9 (Sierra of the Sagra; Apiary 11); 10 (Sierras of Tejeda and Almijara; Apiary 12); 11 (Sierra Morena; Apiaries 13 and 14); 12 (Sierra Norte of Sevilla; Apiary 15); 13 (Sierra of Cazorla; Apiary 16)



daily Ni intake of 200–900  $\mu\text{g}$  from other dietary sources (European Communities Commission Regulation 2006).

Similarly, as to arsenic (As) and cadmium (Cd), the consumption of propolis would not exceed the limiting values of 130 and 110  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. According to Bogdanov (2006), lead (Pb) poses the main contamination risk. The measured levels of Pb in the Andalusian raw propolis ranged from  $<0.070$  to 3.75  $\text{mg}/\text{kg}$  and thus were much lower than upper permissible limit of 20  $\text{mg}/\text{kg}$  set at the Japan Propolis Conference (Yamamoto 1996). In 63 % and 32 % of propolis samples from Uruguay and China analyzed, chromium (Cr) and Pb levels higher than 10  $\text{mg}/\text{kg}$  were measured, and the observed concentration of Cd was  $<3$   $\text{mg}/\text{kg}$  (Bonvehí et al. 1994). In Brazilian propolis, Pb concentrations ranged from 2.70 to 3.10  $\text{mg}/\text{kg}$  whereas, in Brazilian propolis applying the scraped method, values ranged from 19 to 48  $\text{mg}/\text{kg}$  (Alcici and Freire 2002). As to other elements, all samples contained boron (B) at levels between 4.21 and 14.90  $\text{mg}/\text{kg}$ , while Cr concentrations ranged from 0.33 to 2.73  $\text{mg}/\text{kg}$ , and cobalt (Co) was

present in levels ranging from  $<0.050$  to 0.84  $\text{mg}/\text{kg}$ . The elements Sn, Ag, and Se were detected in very limited concentrations in all propolis samples analyzed ( $<112$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The low levels of Hg encountered in the present study (mean,  $8 \pm 2.5$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) indicates that urban and industrial pollution is low in the East Andalusia areas. The levels of arsenic (As) ranged from  $<75$  and 130  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and thus were also quite low, while antimony, Sb, was below the detection limit. Arsenic exists in a variety of chemical groups that differ in toxicity. The inorganic compounds are toxic, especially in the trivalent ( $\text{As}^{+3}$ ) form whereas, in organic form, it has lower toxicity (Jain and Ali 2002).

As to the levels of As, Pb, Cd, and Hg in samples of Croatian propolis, see Cvek et al. (2008). A recent study determined multi-elements in Argentinean propolis, presenting higher values of Fe (400–1,930  $\text{mg}/\text{kg}$ ), Zn (34–105  $\text{mg}/\text{kg}$ ), and Rb (32.2–54.5  $\text{mg}/\text{kg}$ ). Among trace elements, the most abundant were Cr (2.80–3.75  $\text{mg}/\text{kg}$ ), Br (0.10–1.50  $\text{mg}/\text{kg}$ ), Ce (1.00–2.60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), La (0.45–1.18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), and presence of Sb

(0.04 to 0.09 mg/kg) (Cantarelli et al. 2011). Only Fe and Cr were reported in similar concentration with the ranges of the present study.

These last results show the usefulness of including metals in the characterization of propolis samples according to their origin and could be regarded as an indication of environmental pollution in the collection area to evaluate the potential of propolis for the development of new drugs (ICH 1996; Sforzin and Bankova 2011).

As a conclusion, the results of the present study indicate that the mean intake of heavy metals due to its consumption of Andalusian propolis (e.g., tinctures) is below the tolerable levels, without influence on PTWI values. Furthermore, analysis of propolis tinctures revealed much lower mineral levels compared with their respective raw propolis (e.g., lead ranged from 16 to 53 µg/kg) (Cvek et al. 2008).

So, apicultural activity must continue with the area that is far from pollution.

## Conclusions

The results obtained in this work allow us to conclude that the residues of heavy metals were found in a very limited concentration in Andalusian propolis samples. The applied microwave-assisted digestion and quantification by ICP-AES procedures allowed good resolution of multi-element analysis in propolis samples. The precision and accuracy of the system and sample preparation validation were acceptable with a high degree of reproducibility. Furthermore, the results obtained which indicate no pollution of the collection areas and the propolis located there can be used for the elaboration of high-quality bee products, free of toxic contaminants.

## References

Alcici, N. & Freire, M. (2002). Heavy metals in propolis: Practical and simple procedures to reduce the lead in the Brazilian propolis, First German Bee Products and Apitherapy Congress with International Participation

Bankova, V., Chistov, R., & Delgado Tejera, A. (1998). Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry*, 49, 1411–1415.

Barth, O. M. (1998). Pollen analysis of Brazilian propolis. *Grana*, 37, 97–103.

Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37, 1–18.

Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbühl, W., & Gallmann, P. (2007). Mineral in honey: Environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 46, 269–275.

Bonvehí, J. S., Coll, F. V., & Jordà, R. E. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 529–532.

Bonvehí, J. S., & Gutiérrez, A. L. (2011). Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83, 1387–1395.

Bonvehí, J.S. & Coll, F.V. (2000). Study of propolis quality from China and Uruguay. *Zeitschrift für Naturforschung* 55c, 778–784

Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347–363.

Campbell, A. (2002). The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 7, 17–20.

Cantarelli, M. A., Camiña, J. M., Pettenati, E. M., Marchevsky, E. J., & Pellerano, R. G. (2011). Trace mineral content of Argentinean raw propolis by neutron activation analysis (NAA): Assessment of geographical provenance by chemometrics. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 256–260.

Cvek, J., Medic-Saric, M., Vitalli, D., Vedralina-Dragojevic, I., & Smit, Z. (2008). The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47, 35–45.

Dogan, M., Silici, S., Saraymen, R., & Ilhan, I. Q. (2006). Element content of propolis from different regions of Turkey. *Acta Alimentaria*, 5, 127–130.

European Communities Commission Regulation (EC) (2006). No 1881/2006 on setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L364/5, pp. 1–20

FAO/WHO. (2007). Evaluation of certain food additives and contaminants: Sixty-seventh Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Technical report series, no. 940. Geneva: World Health Organization. ISBN 9241209402, 103 pp

FAO/WHO. (2011). The 53rd Meeting of the Joint Expert Committee on Food Additives. <http://incchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec12.htm> (last access November 2012)

Gong, S., Luo, L., Gong, W., Gao, Y., & Xie, M. (2012). Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. *Food Chemistry*, 134, 583–588.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use). (1996). *Guideline validation of analytical procedures: Text and methodology, ICH-Q2B*. Geneva: Switzerland.

International Food Information Service (2005) IFIS dictionary of food science and technology. Shinfield FL: International Food Information Service (IFIS Publishing), Blackwell Publishing 157

- Jain, C. K., & Ali, I. (2002). Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research*, 34, 4304–4312.
- Kalbande, D. M., Dhase, S. N., Chaudhari, P. R., & Wate, S. R. (2008). Biomonitoring of heavy metals by pollen urban environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 138, 233–238.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Chrostov, R., & Popov, S. (1999). Antimicrobial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 235–240.
- Kulevanova, S., Stafilov, T., & Doreski, K. (1995). Determination of some macroelements in propolis by atomic absorption spectroscopy. *Acta Pharmaceutica*, 45, 45–52.
- Larner, B. L., Seen, A. J., & Townsend, A. T. (2006). Comparative study of optimised BCR sequential extraction scheme and acid leaching of elements in the certified material NIST 2711. *Analytical Chimica Acta*, 556, 444–449.
- Madras-Majewska, B., & Jasinski, Z. (2003). Lead contents of bee, broad and bee products from different regions of Poland. *Journal of Apicultural Science*, 47, 47–54.
- Mermet, J. M., & Poussel, E. (1995). ICP emission spectrometers: Analytical figures of merit. *Journal of Applied Spectroscopy*, 49, 12–18.
- Morgano, M. A., Teixeira Martins, M. C., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Yotsuyanagi, K., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). Inorganic contaminants in bee pollen from southeastern Brazil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 6876–6883.
- New Zealand Food Safety Authority. (2006). *Code of practice: Processing of bee products: Part 2: Good manufacturing practice*. Wellington: New Zealand Standards Group.
- Nicolae, E., & Tatiana, D. (2007). The content of micro- and macroelements in propolis. *Bulletin USAMV-CN*, 63, 63–64.
- Ojeda, F., Arroyo, J., & Marañón, T. (1995). Biodiversity components and conservation of Mediterranean heathlands in southern Spain. *Biological Conservation*, 72, 61–72.
- Orsi, R. O., Funari, S. R. C., Barbattini, R., Giovani, C., Frilli, F., Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2006). Radionuclides in honeybee propolis (*Apis mellifera* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76, 637–640.
- Perugini, M., Manera, M., Grotta, L., Abete, M. C., Tarasco, R., & Amorena, M. (2011). Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: Honeybees as indicators. *Biological Trace Element Research*, 140, 170–176.
- Rodríguez, E. G., Abellan, B., & Villanueva, M. T. O. (1999). Macroelements in dietetic products containing propolis. *Food Chemistry*, 66, 15–19.
- Sales, A., Alvarez, A., Rodríguez, A. M., Maldonado, L., Marchisio, P., Rodríguez, M., & Bedascarrasbure, E. (2006). The effect of different propolis harvest methods on its lead content determined by ET AAS and UV-Vis. *Journal of Hazardous Materials A*, 137, 1352–1356.
- Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253–260.
- Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment. (2010). *New encyclopedia of Andalusia*. Junta de Andalucía–Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente, Seville, Spain
- Srogi, K. (2006). Application of microwaves techniques for elemental analysis: A review. *Analytical Letters*, 39, 1261–1288.
- Tuzen, M., Sari, H., & Soylak, M. (2004). Microwave and wet digestion procedures for atomic absorption spectrometric determination of trace elements contents of sediment samples. *Analytical Letters*, 37, 1925–1936.
- UK Food Standards Agency, MAFF U.K. (1995). *Analysis of bee products for heavy metals*. Food surveillance, information sheet, number 53. UK Food Standards Agency. February
- Vogt, W., & Nagel, D. (1992). Cluster analysis in diagnosis. *Clinical Chemistry*, 28, 182–198.
- Yamamoto, T. (1996). *Present state of basic studies on propolis in Japan Speech of the International Conference on Bee Product Properties and Application and Apitherapy*. Israel: Tel-Aviv.





## Chemical and Functional Characterisation of Propolis Collected from East Andalusia (Southern Spain)

Shigenori Kumazawa, Josep Serra, Bonvehí, Cristina Torres,  
Ahn Mok-Ryeon and Francisco José Orantes Bermejo

# Chemical and Functional Characterisation of Propolis Collected from East Andalusia (Southern Spain)

Shigenori Kumazawa,<sup>a,\*†</sup> Josep Serra Bonvehí,<sup>b</sup> Cristina Torres,<sup>c</sup>  
Ahn Mok-Ryeon<sup>d</sup> and Francisco José Orantes Bermejo<sup>c,\*†</sup>

## ABSTRACT:

**Introduction** – Propolis is a complex mixture of natural sticky, gummy and resinous components produced by honeybees (*Apis mellifera* L.) from plant materials. However, phytochemical data of the Andalusian (southern Spain) propolis are scant. **Objective** – The primary objectives of this study were to chemically characterise the compounds and evaluate the anti-oxidant activity found in 28 Andalusian propolis samples.

**Methods** – Ethanol extracts of propolis (EEP) were prepared and examined for their anti-oxidant activity by 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assays. To characterise the phenolic composition, the presence of 11 compounds was identified by HPLC analysis with photodiode array and mass spectrometric detection.

**Results** – All propolis samples had strong anti-oxidant activity, accompanied by high total phenolic content. The most abundant compounds were flavonoids. Concerning the phenolic compounds content, our results showed that the 75% of the samples analysed contained at least 80 mg/g of flavonoids, primarily pinobanksin 3-acetate, pinocembrin, chrysin, galangin and pinobanksin. Caffeic acid phenethyl ester was detected in almost all EEP samples but in smaller proportions (mean  $12.9 \pm 2.8$  mg/g).

**Conclusion** – The present investigation constitutes the first comprehensive report on the phenolics identified in southern Spanish propolis. The results revealed that the samples tested showed a high scavenging activity and therefore indicate the possible use of Andalusian propolis as an important source of natural anti-oxidants. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** anti-oxidant activity; Andalusia; propolis; phenolic; Spain

## Introduction

Propolis is a complex mixture of natural sticky, gummy and resinous components collected by honeybees (*Apis mellifera* L.) from the buds of various trees and used for the asepsis of the hive (Bankova *et al.*, 2002; Papotti *et al.*, 2012). This material usually contains a variety of compounds, such as flavonoids, terpenes,  $\beta$ -steroids, aromatic aldehydes and alcohols (Bonvehí and Coll, 1994). Propolis has been proven to possess a wide range of biological activities (antibacterial, anti-fungal, anti-inflammatory, immunostimulatory, anti-tumour and anti-oxidant properties) (Burdock, 1998). For this reason, propolis is used extensively in food and beverages to improve health and prevent diseases, and most of these preparations contain ethanol or propylene glycol (Pietta *et al.*, 2002; Bonvehí and Gutiérrez, 2011; Bonvehí and Gutiérrez, 2012, 2012). Its chemical composition and biological activities depend on the specific local vegetation at the site of collection (Kumazawa *et al.*, 2003; Kumazawa *et al.*, 2004; Hamasaka *et al.*, 2004; Papotti *et al.*, 2012). Nowadays, it is well documented that European propolis contains the typical 'poplar bud' phenolics: flavonoid aglycones (flavones and flavanones), phenolic acids and their esters (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006). Poplar trees are common only in the temperate zones. For this reason, propolis from tropical areas has a different chemical composition to that of the poplar type propolis. Among the principal compound classes found in Brazilian propolis are prenylated phenylpropanoids, and non-typical propolis

flavonoids or polyisoprenylated benzophenones are present in Cuban propolis (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007). The flavonoid patterns are sufficiently distinctive to permit discrimination between propolis from China, Uruguay and Brazil (Bonvehí and Coll, 1994). Furthermore, propolis possesses strong anti-oxidant activity; however, there are few data on the relationship between the anti-oxidant activity and individual chemical components in propolis (Ahn *et al.*, 2007; Kalogeropoulos *et al.*, 2009).

\* Correspondence to: S. Kumazawa, Department of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan. Email: kumazawa@u-shizuoka-ken.ac.jp

F. J. Orantes Bermejo, Apinevada Analytical Laboratory of Bee Products, 18420 Lanjarón, Granada, Spain. Email: apinevada@terra.es

† These authors contributed equally to this work.

<sup>a</sup> Department of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8526, Japan

<sup>b</sup> Research and Development of Nederland Co, P.O. Box 34, 08890, Viladecans, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Apinevada Analytical Laboratory of Bee Products, 18420, Lanjarón, Granada, Spain

<sup>d</sup> Department of Food Science and Nutrition, Dong-A University, 840 Hadan 2-dong, Saka-gu, Busan, 604-714, Republic of Korea

In consequence, in this study, we investigate the anti-oxidant activity of the ethanol extracts of propolis (EEP) of various areas of East Andalusia (southern Spain), and determined the phenolic components. We used two assay systems for determining the anti-oxidant activity on 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, and the phenolic components were identified by HPLC with photodiode array (PDA) and mass spectrometric (MS) detection. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) has become the most powerful analytical tool for screening and identification of compounds in biological matrices, and are also best suited for high throughput analysis (Volpi and Bergonzini, 2006; Medana *et al.*, 2008). However, most of these methods have not been validated in agreement with International Conference on Harmonisation (ICH) Expert Working Groups (ICH, 2005). Taking into consideration all the knowledge gathered on phenolic compounds of propolis, this study is focused on this fraction, identifying the main flavonoids and anti-oxidant activity.

## Experimental

### Chemicals and reagents

Folin-Ciocalteu reagent, ethanol, methanol, acetone, hexamethyltetramine, hydrochloric acid, ethyl acetate, acetic acid, formic acid, acetonitrile, potassium persulphate and aluminium chloride were analytical grade and supplied by

Panreac (Barcelona, Spain) and Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water (Milli-Q, Millipore Corp, Bedford, MA, USA) was purchased for chromatographic use. Caffeic acid was from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland). Butylhydroxyl toluene (BHT) and quercetin were purchased from Kanto Chemicals (Tokyo, Japan). ABTS, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and DPPH were purchased from Wako Pure Chemicals Industries (Osaka, Japan). Polyvinylpyrrolidone (PVP), gallic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid and  $\alpha$ -tocopherol (VE) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Chrysin, galangin and pinocembrin were purchased from Funakoshi (Tokyo, Japan). Cinnamyl caffeate, cinnamylidenacetic acid, pinobanksin and pinobanksin 3-acetate were obtained from Carl Roth GmbH Co. (Karlsruhe, Germany).

### Propolis material

In this work, 28 samples of raw propolis produced by *Apis mellifera* honeybees were collected from apiaries located in natural preserved areas of East Andalusia (southern Spain). The raw propolis samples were collected in the same apiary from spring to winter (2006–2007) employing the scraping technique with a production per hive between 105 and 480 g/yr in Langstroth hives, and of 180 to 500 g/yr in Dadant hives. Pollen grains may be introduced into propolis by worker bees during manufacture, and may stem from bee loads from anemophilous plant species. The palynological processing of samples was analysed according to Barth (1998). The main plant species visited that contributed to the propolis were: chestnut (*Castanea sativa*), oak (*Quercus* sp.), poplar (*Populus* sp.), eucalyptus (*Eucalyptus* sp.), willow (*Salix* sp.) and pine (*Pinus* sp.). Representative samples were collected (300 g) and sent to the laboratory with the corresponding collection and location data (Table 1). After harvesting, prior to

**Table 1.** Propolis samples collected from East Andalusia

| Sample number | Locations                    | Province | Apiary        | Phenolic <sup>a</sup> | Flavonoid <sup>b</sup> |
|---------------|------------------------------|----------|---------------|-----------------------|------------------------|
| 1             | Sierra Nevada-Las Alpujarras | Granada  | Lanjarón      | 329.9                 | 138.3                  |
| 2             | Sierra Nevada-Las Alpujarras | Granada  | Orgiva        | 282.4                 | 105.2                  |
| 3             | Sierra de Baza               | Almería  | Alcontar      | 283.3                 | 103.7                  |
| 4             | Sierra Nevada-Las Alpujarras | Granada  | Torvizcon     | 278.3                 | 107.9                  |
| 5             | Sierra Nevada-Las Alpujarras | Granada  | Orgiva        | 364.0                 | 144.5                  |
| 6             | Monte del Pueblo             | Granada  | Cacín         | 192.9                 | 84.8                   |
| 7             | Sierra Nevada                | Granada  | Quentar       | 208.6                 | 91.3                   |
| 8             | Sierra Nevada                | Granada  | Quentar       | 233.9                 | 117.9                  |
| 9             | Los Alcornocales             | Cádiz    | Jerez         | 31.4                  | 23.0                   |
| 10            | Los Alcornocales             | Cádiz    | Jerez         | 41.1                  | 38.4                   |
| 11            | Sierra de la Garnatilla      | Granada  | Motril        | 231.7                 | 72.1                   |
| 12            | Sierra de la Contraviesa     | Granada  | Motril        | 246.0                 | 90.7                   |
| 13            | Sierra Nevada-Las Alpujarras | Granada  | Berja         | 229.1                 | 98.4                   |
| 14            | Sierra Nevada                | Granada  | Guejar Sierra | 258.9                 | 94.0                   |
| 15            | Las Alpujarras               | Granada  | Lanjarón      | 221.7                 | 101.1                  |
| 16            | Las Alpujarras               | Granada  | Orgiva        | 192.0                 | 79.2                   |
| 17            | Las Alpujarras               | Granada  | Lanjarón      | 197.7                 | 89.2                   |
| 18            | Las Alpujarras               | Granada  | Capileira     | 229.8                 | 89.2                   |
| 19            | Las Alpujarras               | Granada  | Lanjarón      | 207.1                 | 83.3                   |
| 20            | Sierra de la Sagra           | Granada  | Huescar       | 138.7                 | 70.0                   |
| 21            | Sierra de la Sagra           | Granada  | Huescar       | 295.9                 | 109.6                  |
| 22            | Sierra de la Sagra           | Granada  | Huescar       | 230.9                 | 106.7                  |
| 23            | Sierra de la Sagra           | Granada  | Huescar       | 189.8                 | 104.6                  |
| 24            | Sierra de la Sagra           | Granada  | Huescar       | 208.1                 | 106.1                  |
| 25            | Sierra de la Sagra           | Granada  | Huescar       | 154.3                 | 70.0                   |
| 26            | Sierra de la Sagra           | Granada  | Huescar       | 129.5                 | 60.3                   |
| 27            | Sierra Nevada                | Granada  | Guejar Sierra | 217.4                 | 110.5                  |
| 28            | Sierra de la Sagra           | Granada  | Huescar       | 193.5                 | 79.5                   |

<sup>a</sup>Amount of total phenolic content (mg GAE/g of ethanol extracts of propolis (EEP)).

<sup>b</sup>Amount of total flavonoid content (mg quercetin equivalents/g of EEP).

analysis, macroscopic impurities were removed. Later, two subsamples from different parts of each lot were taken for composing the 50 g sample. The samples, previously cooled at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 24 h, were ground in an analytical mill. The resulting product was packaged in foil, and 25 g were used as a control sample, with 25 g being stored in darkness at  $4^{\circ}\text{C}$  in order to carry out subsequent different assays. Samples were either homogenised or pulverised if necessary and analysed in triplicate.

### Ethanol extraction of the propolis material

The crude propolis samples (100 mg each) were extracted with ethanol (3 mL) at room temperature for 24 h. The ethanol suspension was separated by centrifugation at 1000 rpm for 5 min at  $25^{\circ}\text{C}$ , and supernatant was concentrated under reduced pressure to give EEP samples. The EEP samples were stored under dry conditions at  $4^{\circ}\text{C}$  until analysed. These extracts were then used for identification of phenolics by HPLC/PDA-MS and evaluation of anti-oxidant activity.

### Standard solutions for HPLC/PDA-MS quantification

The stock standard solution of each compound (caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, pinobanksin, cinnamylidenacetic acid, chrysin, pinocembrin, galangin, pinobanksin 3-acetate, cinnamyl caffeate and caffeic acid phenethyl ester) was prepared as follows: an accurately weighed amount of pure compound (2–6 mg) was placed into a 10 mL volumetric flask; ethanol was added and the solution was diluted to volume with the same solvent. The external calibration curve was generated using five data points, covering the concentration ranges between 2.60 and 315  $\mu\text{g/mL}$  (Table 2). Five-microlitre aliquots of each standard solution were used for HPLC analysis. Injections were performed in triplicate for each concentration level. The calibration curve was obtained by plotting the peak area of the compound at each level versus the concentration of the sample.

### Analytical and spectral analyses

**Water content.** Water content was determined by gravimetry using 2 g of finely ground propolis in a conventional kiln at  $103\text{--}105^{\circ}\text{C}$  for 2–3 h, until a constant weight was reached (Bonvehí *et al.*, 1994).

**Mineral salt content.** The mineral salt of approximately 2 g of finely ground propolis was determined by incineration at  $500\text{--}550^{\circ}\text{C}$  for 8 h. The ash content was calculated as a percentage of the weight of the dry residue (Bonvehí *et al.*, 1994).

**Table 2.** Linearity and sensitivity parameters for phenolic acids and flavonoids used as propolis standards ( $\mu\text{g/mL}$ )

| Compound                    | Linearity range | LOD  | LOQ   |
|-----------------------------|-----------------|------|-------|
| Caffeic acid (1)            | 2.60–215        | 1.30 | 3.66  |
| <i>p</i> -Coumaric acid (2) | 2.70–220        | 1.44 | 4.02  |
| Ferulic acid (3)            | 2.60–215        | 1.64 | 4.36  |
| Pinobanksin (4)             | 7.70–315        | 4.23 | 11.67 |
| Cinnamylidenacetic acid (5) | 2.60–212        | 1.52 | 4.05  |
| Chrysin (6)                 | 7.70–308        | 4.11 | 11.73 |
| Pinocembrin (7)             | 7.60–310        | 4.31 | 12.38 |
| Galangin (8)                | 7.60–304        | 4.09 | 11.58 |
| Pinobanksin 3-acetate (9)   | 7.70–315        | 4.29 | 12.24 |
| Cinnamyl caffeate (10)      | 2.60–215        | 1.42 | 3.78  |
| CAPE (11)                   | 2.60–215        | 1.56 | 4.16  |

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; CAPE, caffeic acid phenethyl ester.

**Total phenolic content.** The sample (0.50 g) of finely ground propolis was extracted by agitating with ethanol during 30 min. The extract was filtered and filtrates were up to 100 mL with the solvent. A blank was prepared by agitating an aliquot of the extract at pH 3.5 with insoluble PVP. Phenolic substances in the extract were determined with Folin–Ciocalteu reagent. The absorbance was measured at 760 nm after 20 min of incubation at  $40^{\circ}\text{C}$  in a spectrophotometer (Agilent 8453 UV-vis) with a 1-cm quartz absorption cell operated with Agilent ChemStation software for UV-vis spectroscopy (Waldbronn, Germany). Total contents are expressed as mg GAE/g (gallic acid equivalents) using a calibration curve of 5, 25, 50, 100, 150 and 200  $\mu\text{g/mL}$  of gallic acid (Bonvehí and Coll, 2000).

**Total flavonoid content.** A 0.5 g amount of finely ground propolis was weighed and 1 mL of 0.5% hexamethyltetramine (w/v), 20 mL of acetone and 2 mL of 0.10 M hydrochloric acid were added to the sample and set to boil with reflux for 30 min. The resulting solution was filtered and the residue was washed with 20 mL of acetone, and adjusted to 100 mL with acetone. Then, 10 mL of the extract were introduced in a separation funnel, along with 20 mL of distilled water and 25 mL of ethyl acetate. Extraction with ethyl acetate was carried out three times. The extract was washed twice, using 50 mL distilled water each time, and diluted to 100 mL with ethyl acetate. The total flavonoid content was determined in 10 mL of the extract using 1 mL of 2% aluminium chloride in methanol solution (5% acetic acid in methanol) and adjusted to 25 mL with methanol solution. The absorbance was measured at 415 nm with a UV-vis spectrophotometer. Quercetin (10 mg) was prepared in methanol solution and then diluted to concentrations of 10, 25, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ . Total flavonoid content was calculated as milligrams of quercetin equivalents per gram of EEP from a calibration curve (Bonvehí and Coll, 1994).

### ABTS scavenging activity test

The anti-oxidant activity of propolis was determined by the ABTS radical cation decolourisation assay developed by Re *et al.* (1999). Stock solutions of ABTS (7 mM) and potassium persulphate (140 mM) in water were prepared, and the ABTS radical cation was produced by adding potassium persulphate to a final concentration of 2.45 mM. The mixture was left to react overnight (12–16 h) in the dark, at room temperature. On the day of analysis, the ABTS radical solution was diluted with ethanol to an absorbance of 0.70 ( $\pm 0.02$ ) at 734 nm. All measurements were performed as follows: 10  $\mu\text{L}$  of EEP were mixed with 990  $\mu\text{L}$  of ABTS radical solution, and the absorbance measured exactly 5 min after the initial mixing using ethanol as the blank. The anti-oxidant activity was expressed as percentage inhibition of the sample relative to the control by the equation  $\text{scavenging capacity (\%)} = (A_c - A_s) \times 100/A_c$  where  $A_c$  is the absorbance of the control and  $A_s$  is the absorbance of the sample.  $\alpha$ -Tocopherol and BHT, at 50  $\mu\text{g/mL}$ , were used as the reference samples.

### DPPH scavenging activity test

Antioxidant activity of the propolis extracts was also determined using the DPPH radical scavenging assay described by Brand-Williams *et al.* (1995). The free radical scavenging capacity using the free DPPH radical was determined by measuring the decrease of absorbance at 517 nm. Briefly, the solution of  $6.5 \times 10^{-5}$  M DPPH in ethanol was prepared daily before measurement using a UV-vis spectrophotometer. Then, 6 mL of DPPH solution were mixed with 3 mL of EEP solution. The reaction mixture was vortex-mixed and allowed to stand at room temperature in the dark for 60 min. Absorbance at 517 nm was measured at time 0 and 60 min against the ethanol blank. Results were expressed as percentage decrease with respect to control values. The inhibition was determined using VE and BHT as reference samples at the same concentration of the sample.

### HPLC/PDA – MS analyses

We used HPLC/PDA – MS detection in series to identify and determine the constituents in propolis. The combination of HPLC/PDA and MS has been reported to be a powerful approach for the rapid identification of phytochemical components in botanical extracts (He, 2000). The EEP solid samples were dissolved in ethanol (5 mg/mL) and filtered with a 0.45 µm filter prior to the injection of 5 µL into the HPLC system.

Chromatography was performed using a SI-1 (Shiseido, Tokyo, Japan) system, consisting of a vacuum degasser, a quaternary pump, an autosampler, a thermostated column compartment and a PDA detector. The analyses were carried out on SI-1 with a Capcell Pak ACR 120 C<sub>18</sub>-column (4.6 i.d. × 250 mm, 5 µm) (Shiseido, Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The gradient was 20 to 80% B (0–60 min) at a flow rate of 1.0 mL/min; column temperature 30°C. For analysis by PDA detection, UV spectra were recorded from 195 to 650 nm at a rate of 0.8 spectrum/s and a resolution of 4.0 nm.

The MS was performed on an LCQ ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) equipped with an electrospray ionisation (ESI) source. The operating parameters were as follows: source voltages, 5 kV; ES capillary voltage, –10 V; capillary temperature, 260°C. The full scan mass covered the range *m/z* 100–800. The MS data were acquired in the negative ionisation mode (Kumazawa *et al.*, 2002, 2004).

### Validation of the HPLC method

HPLC/PDA was finally preferred for quantitative analysis of phenolic components in propolis samples in view of the greater availability and use of this equipment in the phytochemical analysis of propolis extracts (Pellati *et al.*, 2011). The method validation was performed to show compliance with international requirements for analytical procedures for the quality control of pharmaceuticals (ICH, 2005). The following requirements related to limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), linearity range, accuracy, precision, and ruggedness were determined.

The LOD was determined as the lowest spiking level at which the phenolic compound was consistently identified with a signal-to-noise ratio (*S/N*) ≥ 3. The LOQ was determined as the lowest spiking level at which each phenolic compound was consistently quantified with a signal-to-noise ratio (*S/N*) ≥ 10 and a relative standard deviation ≤ 20% (*n* = 4).

The external standard calibration curve was generated using five data points, covering the concentration ranges reported in Table 2. Injections were performed in triplicate for each concentration level.

The linearity was calculated based on the relationship between peak area and concentration by dissolving weighed amounts of different standards. This relationship was approximated by straight line, and the correlation coefficients were used as the measure of linearity. Two measurements were performed for each solution.

The accuracy was described as the percentage recovery for compounds. For this purpose, the standard compounds were added to propolis concentrate solutions at amounts equal to 75, 100 and 125% of determined concentrations of standards. Four samples were prepared for each level.

The repeatability of determination was checked on solutions of concentrates under examination. Five determinations were made for each solution. The precision was expressed by relative standard deviation (RSD). The reproducibility was evaluated based on results for propolis made at different times by different analysts in the same laboratory. There were three examinations, each time with five repetitions.

### Statistical analysis

Data obtained were analysed using the Statgraphics plus software Version 5.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA), and significant differences between means were confirmed using Duncan's multiple range tests at the 95% confidence level.

## Results and Discussion

### Total phenolic and flavonoid contents

Most of the samples had a pleasant odour and were yellow to dark brown in colour. Mineral salts ranged from 0.7 to 3.2 g/100 g (mean  $2.18 \pm 0.96$  g/100 g), in line with the range commonly accepted by the literature (Bonvehí and Gutiérrez, 2011). The percentage of moisture varied between 1.4 and 6.8 g/100 g (mean  $2.41 \pm 1.18$  g/100 g), depending on the storage and manipulation conditions (Bonvehí and Gutiérrez, 2011).

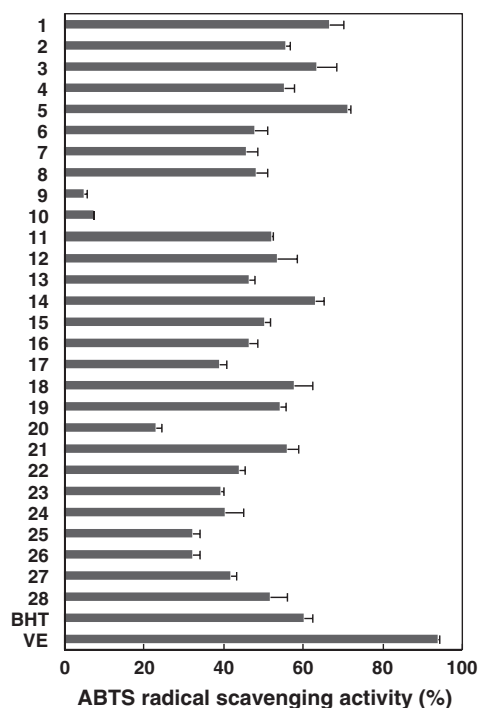
The amounts of total phenolic and flavonoid contents in Andalusian propolis varied widely and ranged from 31.4 to 364 mg/g of EEP and from 23 to 144.5 mg/g of EEP, respectively (Table 1). Only the propolis samples collected from the Cadiz area showed total phenolic and flavonoid contents in a lower percentage. Investigations of different types of propolis from the Basque Country (northeastern Spain), Europe and northern Argentine propolis had similar total phenolic content (200 to 340 mg/g of EEP) (Bankova *et al.*, 2002; Isla *et al.*, 2005; Bonvehí and Gutiérrez, 2011). New legislation on propolis extracts was published recently in Brazil, and it delineates that EEP preparations must contain at least 2.5 mg/g flavonoids and 5 mg/g phenolic components in relation to the dry weight (Brazilian Ministry of Agriculture, 2000). According to the amounts obtained of total phenolic and flavonoids compounds in raw Andalusian propolis, the Brazilian exigency on the preparation of commercial propolis extract could be accomplished sufficiently with a solution at 3% of EEP.

### Effects of propolis samples on ABTS radical cation

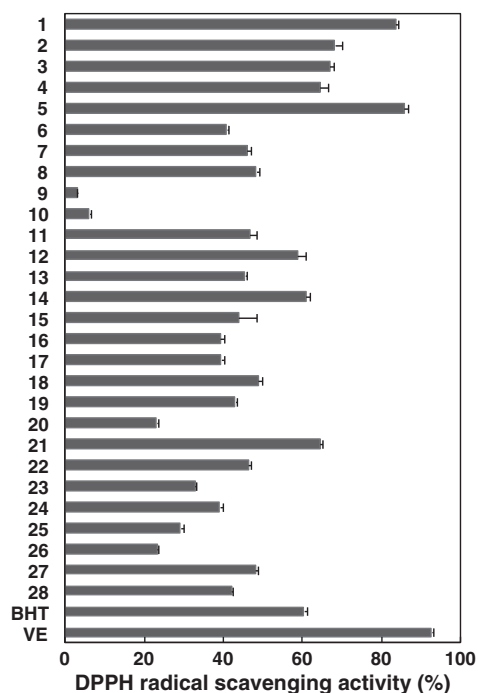
This assay is based on the neutralisation of a radical cation formed by the single-electron oxidation of a synthetic ABTS chromophore to strong absorbing ABTS<sup>+</sup> radical (700–750 nm). This radical is generated by the oxidation of ABTS with potassium persulphate and reduced in the presence of a hydrogen-donating anti-oxidant. Most of the samples completed the reaction within 4 min. The results demonstrate that the Andalusian EEP samples tested were very active (Fig. 1). The relation between ABTS radical cation and total phenolic content was also examined and a positive correlation between them was observed ( $r^2 = 0.889$ ). The radical scavenging activity of the EEP varied from 23 to 71.2% inhibition of ABTS with a mean of  $48.9 \pm 11.1\%$ . Basque propolis had values between 23.7 to 43.6% inhibition of ABTS (Bonvehí and Gutiérrez, 2011), and similar values were obtained in Korean propolis (Ahn *et al.*, 2004).

### Effects of propolis samples on DPPH radical

The DPPH radical scavenging assay is commonly employed in evaluating the ability of anti-oxidants to scavenge free radicals. The change in absorbance at 517 nm is used as a measure of the scavenging effect of a particular extract for DPPH radicals. The absorbance at 517 nm decreases as the reaction between anti-oxidant molecules and DPPH radical progresses. Hence, the more rapidly the absorbance decreases, the more potent the anti-oxidant activity of the extract in terms of its hydrogen-atom-donating capacity. The EEP samples had strong DPPH free radical scavenging activity (23–85.7% inhibition) (mean  $49.1 \pm 16\%$ ), and 25% of the samples presented an inhibition >60% (Fig. 2). Similar results were obtained in Argentinean



**Figure 1.** 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical scavenging activity of ethanol extracts of propolis of East Andalusia.



**Figure 2.** 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of ethanol extracts of propolis of East Andalusia.

propolis ranging between 46.6 and 89.6% (Lima *et al.*, 2009). Basque propolis presented lower inhibition (19.1–40.5%) (Bonvehí and Gutiérrez, 2011). The VE showed an inhibition >90% and BHT of 60%. The relationship between DPPH radical

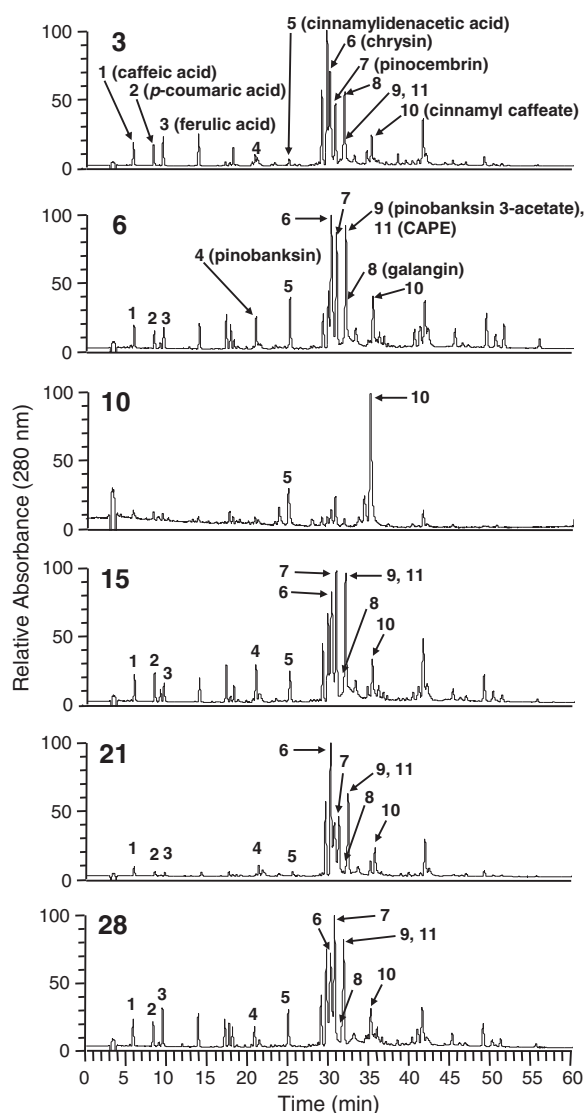
scavenging activity and total phenolic content was studied, and a positive correlation between them was observed ( $r^2=0.982$ ), excluding the samples collected in Cadiz area (samples 9 and 10).

#### Profiling of the ethanol extract by HPLC/PDA-MS

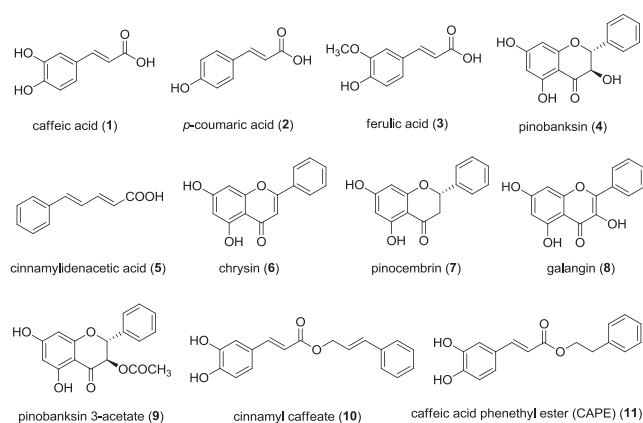
HPLC/PDA-MS was used to detect propolis compounds. Further the combination of HPLC/PDA and MS has been reported to be a powerful approach for the rapid identification of phytochemical components in plant extracts. Peaks were assigned by comparing the retention times and UV spectra of authentic standards by PDA detection. Further MS/MS analysis was carried out to confirm the assignments of each peak to obtain a qualitative and quantitative profile of compounds present in EEP samples. Negative ESI/MS of each HPLC peak corresponded to the molecular ions.

Considering the complexity of the sample, the overall chromatographic separation can be considered satisfactory. Propolis contains a wide variety of phenolic compounds, mainly flavonoids. Figure 3. shows the HPLC chromatograms of several samples. In order to identify each peak, the selected ion monitoring (SIM) of MS spectra of all peaks was compared with those of authentic standards, and each component was quantitatively analysed. The MS spectra of phenolic acids indicated that the negative ion mode provided a higher level of sensitivity when compared with the positive one, allowing the identification of several components, such as caffeic acid ( $m/z$  179), *p*-coumaric acid ( $m/z$  163), ferulic acid ( $m/z$  193) and CAPE ( $m/z$  283). All flavonoids present in the propolis samples analysed showed protonated  $[M+H]^+$  and deprotonated  $[M-H]^-$  molecules of good intensity. For all analytes complete sets of low-resolution  $MS^n$  spectra were recorded in the negative mode. Generally, in the  $MS^1$  of the detected peaks the deprotonated mother ions  $[M-H]^-$  revealed the molecular weight of the flavonoid glycosides not identified in our study. Further fragmentation of the  $[M-H]^-$  ions in the MS/MS showed a similar regular pattern for all constituents analysed. It was possible to recognise flavones, flavonols and flavanones in free form or as ether or ester derivatives on the basis of their molecular weight (MW): chrysin (MW 254) among the flavones; quercetin (MW 302) and galangin (MW 270) among flavonols; pinobanksin (MW 272) and pinocembrin (MW 256) among dihydroflavonols and flavanones, respectively. The chemical structures of the main compounds identified are shown in Fig. 4.

The detailed results of validation of the HPLC/PDA method indicate high sensitivity under established conditions. Good linearity was observed for the components between peak areas and concentrations over the test range ( $r^2 > 0.998$ ). The LOD and LOQ values were in the range 1.30–4.31  $\mu\text{g/g}$  and 3.66–12.38  $\mu\text{g/g}$  (Table 2), respectively. The results indicate that the HPLC/PDA method was sufficiently sensitive for the determination of phenolic acids and flavonoids in propolis samples. The procedure demonstrated a wide linearity range from 2.6 to 220  $\mu\text{g/mL}$  for caffeic, *p*-coumaric and ferulic acids; from 7.6 to 315  $\mu\text{g/mL}$  for chrysin, pinocembrin, galangin and pinobanksin 3-acetate. The respective regression and correlation coefficients were similar for all of the flavonoids. The precision of the chromatographic system was tested by performing intra- and interday multiple injections of a standard solution containing pure standards of phenolic acids and flavonoids identified in this study. The intra- and interday RSD values were <0.3% (for retention times) and <3.5% (for peak



**Figure 3.** Typical HPLC profiles of ethanol extracts of propolis of East Andalusia: 1, caffeic acid; 2, *p*-coumaric acid; 3, ferulic acid; 4, pinobanksin; 5, cinnamylidenacetic acid; 6, chrysin; 7, pinocembrin; 8, galangin; 9, pinobanksin 3-acetate; 10, cinnamyl caffeate; 11, caffeic acid phenethyl ester (CAPE).



**Figure 4.** Structures of the main constituents identified from East Andalusian propolis.

areas), which indicate good precision. The percentage recovery values that were obtained by comparing the results from samples and fortified samples were found to be in the range 94–105%, using the recovery test, this method is suitable for obtaining accurate precision. The qualitative composition of the 28 samples analysed was surprisingly similar; however, they did show large quantitative differences. Variance analysis showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) in total phenolic content, flavonoids content and concentration of the constituents, expressing the values as means of triplicate analyses for each sample.

This study reported that major components identified in Andalusian propolis samples were caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, pinobanksin, cinnamylidenacetic acid, chrysin, pinocembrin, galangin, pinobanksin 3-acetate, cinnamyl caffeate and CAPE, and the main source plant was poplar (*Populus* sp.) and chestnut (*Castanea sativa*). Chestnut and poplar species are important sources of propolis in the Southeast Andalusia. One of the primary goals of the palynology is to determine the floral sources utilised by honeybees in the production of bee products. Pollen presence can occur in propolis by different mechanisms: (i) through sticking to plant resins in the case of wind pollinated flowers; (ii) introduced from stored pollen loads inside the hives; and (iii) transported by bees that have been in contact with pollen in the field. In our study chestnut, poplar, oak and pine-pollen types appear with regular frequency in collected areas of propolis. The samples were collected mainly in 'The Sierra Nevada Natural Park' (172000 ha), where the flora include predominantly Iberian mountain pine, holm, oak, chestnut, Pyrenean oak, poplar, willow, ash and elm as possible propolis sources. These pollen types were identified in higher frequency in all the samples analysed and the combination poplar/chestnut was considered in former years as part of the collection of resins of the bees collected in southeast Andalusia (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006). In according with Kumazawa *et al.* (2003), the taxa of pollen identified in this study confirm the origin plants of propolis linked to direct observation of honeybee behaviour.

The results of quantitative analysis revealed that EEP samples contained a large amount of pinocembrin, pinobanksin 3-acetate, chrysin and galangin (Table 3). Pinobanksin 3-acetate and pinocembrin were detected in all samples in large amounts (mean  $61.6 \pm 23.5$  mg/g of EEP and  $60.3 \pm 20.4$  mg/g of EEP, respectively). Chrysin was one of the more representative flavonoids of Andalusian propolis, present in almost all the EEP samples ( $35.4 \pm 11.2$  mg/g of EEP) and its amount was high. Normally, propolis from China, Oceania and Bulgaria contained a large amount of chrysin (Kumazawa *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2007). The content of galangin was over 25 mg/g of EEP (mean  $27.3 \pm 10.8$  mg/g of EEP), however, this was not identified in EEP samples from Brazil and Thailand (Kumazawa *et al.*, 2004). Caffeic acid, ferulic acid, cinnamylidenacetic acid and cinnamyl caffeate were determined as minor components in Andalusian propolis. The analysis reported that propolis from Brazil, South Africa, Thailand and Ukraine did not contain cinnamylidenacetic acid. In contrast, in Argentinean and Chilean propolis it was present in higher concentrations (Kumazawa *et al.*, 2004). On the other hand, CAPE was detected in almost all EEP samples but in smaller proportions (mean  $12.1 \pm 4.4$  mg/g of EEP). Bankova *et al.* (2000) reported that the characteristic compounds of the propolis of Europe, Asia and North America are pinocembrin, pinobanksin, pinobanksin 3-acetate, chrysin, galangin and caffeate (benzyl, phenylethyl and prenyl), and that

**Table 3.** Phenol contents in East Andalusian propolis (mg/g of EEP)

| Sample number       | Caffeic acid (1) | <i>p</i> -Coumaric acid (2) | Ferulic acid (3) | Pinobanksin (4) | Cinnamylidenacetic acid (5) | Chrysin (6) | Pinocembrin (7) | Galangin (8) | Pinobanksin 3-acetate (9) | Cinnamyl caffeate (10) | CAPE (11) |
|---------------------|------------------|-----------------------------|------------------|-----------------|-----------------------------|-------------|-----------------|--------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| 1                   | 6.1              | 8.5                         | 9.0              | 10.2            | 5.7                         | 41.7        | 62.3            | 31.4         | 74.8                      | 4.3                    | 11.3      |
| 2                   | 6.2              | 12.7                        | 10.9             | 7.6             | n.d.                        | 45.1        | 65.5            | 34.2         | 76.4                      | 5.2                    | 10.2      |
| 3                   | 7.7              | 6.9                         | 12.5             | 8.2             | 4.8                         | 40.2        | 60.8            | 34.8         | 68.5                      | 5.6                    | 8.7       |
| 4                   | 5.2              | 6.2                         | 8.4              | 8.5             | 5.7                         | 39.8        | 61.5            | 30.8         | 68.7                      | 4.0                    | 9.6       |
| 5                   | 7.9              | 4.7                         | 9.0              | 10.7            | 2.7                         | 44.6        | 76.8            | 39.6         | 100.1                     | 4.1                    | 8.4       |
| 6                   | 5.2              | 3.5                         | 4.2              | 14.5            | 18.8                        | 37.1        | 64.3            | 30.3         | 63.9                      | 5.1                    | 16.6      |
| 7                   | 7.6              | 4.5                         | 5.7              | 13.1            | 17.4                        | 49.3        | 83.5            | 33.5         | 81.5                      | 6.0                    | 11.3      |
| 8                   | 5.2              | 6.2                         | 5.5              | 10.7            | 10.8                        | 39.4        | 67.0            | 28.1         | 56.0                      | 4.0                    | 13.3      |
| 9                   | n.d.             | n.d.                        | n.d.             | 1.5             | 0.8                         | n.d.        | n.d.            | n.d.         | n.d.                      | 1.2                    | n.d.      |
| 10                  | n.d.             | n.d.                        | n.d.             | n.d.            | 3.0                         | n.d.        | n.d.            | n.d.         | n.d.                      | 3.1                    | n.d.      |
| 11                  | 7.7              | 2.3                         | 1.8              | 8.7             | n.d.                        | 28.7        | 54.6            | 10.0         | 108.1                     | 8.3                    | 13.5      |
| 12                  | 7.6              | 3.2                         | 4.5              | 14.6            | n.d.                        | 41.7        | 72.2            | 33.6         | 96.7                      | 2.8                    | 14.3      |
| 13                  | 6.0              | 12.2                        | 4.3              | 10.6            | 6.8                         | 36.5        | 77.5            | 27.3         | 72.9                      | 6.3                    | 13.3      |
| 14                  | 6.9              | 5.8                         | 12.0             | 5.9             | n.d.                        | 29.7        | 43.2            | 24.0         | 50.8                      | 3.8                    | 10.6      |
| 15                  | 4.8              | 5.5                         | 4.6              | 9.1             | 4.9                         | 33.6        | 55.1            | 23.3         | 57.8                      | 3.1                    | 15.3      |
| 16                  | 5.6              | 5.0                         | 5.1              | 14.0            | 10.7                        | 39.3        | 68.9            | 45.9         | 73.4                      | 4.2                    | 15.9      |
| 17                  | 5.2              | 5.1                         | 6.3              | 10.1            | 4.0                         | 34.1        | 59.4            | 25.6         | 60.5                      | 3.9                    | 12.7      |
| 18                  | 5.5              | 5.9                         | 5.2              | 9.8             | 5.2                         | 34.4        | 53.9            | 24.9         | 56.0                      | 3.2                    | 12.4      |
| 19                  | 5.3              | 6.3                         | 5.4              | 10.9            | 7.5                         | 42.0        | 46.0            | 12.6         | 53.7                      | 3.9                    | 14.6      |
| 20                  | 3.4              | 5.1                         | 4.5              | 13.7            | 11.0                        | 41.0        | 74.4            | 33.4         | 51.3                      | 2.4                    | 17.2      |
| 21                  | 3.7              | 4.0                         | 3.5              | 8.3             | 10.1                        | 34.6        | 57.5            | 23.7         | 50.4                      | 3.5                    | 14.2      |
| 22                  | 3.9              | 3.6                         | 3.6              | 11.1            | 18.8                        | 34.6        | 76.5            | 30.9         | 61.5                      | 3.7                    | 12.1      |
| 23                  | 2.4              | 4.2                         | n.d.             | 13.3            | 11.2                        | 45.9        | 75.6            | 36.9         | 56.6                      | 2.9                    | 15.7      |
| 24                  | 3.8              | 4.6                         | 4.2              | 12.9            | 13.6                        | 43.4        | 85.3            | 41.9         | 69.7                      | 4.4                    | 19.2      |
| 25                  | 2.8              | 4.4                         | 3.0              | 11.6            | 11.1                        | 30.8        | 61.7            | 25.0         | 44.1                      | 2.7                    | 16.2      |
| 26                  | 3.5              | 3.9                         | 3.6              | 10.4            | 9.7                         | 33.8        | 56.5            | 22.8         | 42.6                      | 3.1                    | 8.5       |
| 27                  | 7.1              | 5.4                         | 11.5             | 5.9             | n.d.                        | 36.6        | 47.2            | 27.9         | 61.2                      | 3.1                    | 10.2      |
| 28                  | 4.1              | 2.8                         | 4.0              | 10.6            | 22.9                        | 33.6        | 79.9            | 31.8         | 67.8                      | 4.4                    | 12.2      |
| x                   | 5.0              | 5.1                         | 5.4              | 9.9             | 7.8                         | 35.4        | 60.3            | 27.3         | 61.6                      | 4.0                    | 12.1      |
| SD                  | 2.1              | 2.8                         | 3.5              | 3.5             | 6.4                         | 11.2        | 20.4            | 10.8         | 23.5                      | 1.4                    | 4.4       |
| $V_{\min}$          | n.d.             | n.d.                        | n.d.             | n.d.            | n.d.                        | n.d.        | n.d.            | n.d.         | n.d.                      | n.d.                   | n.d.      |
| $V_{\max}$          | 7.9              | 12.7                        | 12.5             | 14.6            | 22.9                        | 49.3        | 85.3            | 45.9         | 108.1                     | 8.3                    | 19.2      |
| n.d., not detected. |                  |                             |                  |                 |                             |             |                 |              |                           |                        |           |

the main source plant was *Populus* spp. (poplar). In addition, we detected these same compounds in Andalusian propolis.

Finally, based on the results we postulate that the flavonoids are the best candidates to assess the quality attributes of Andalusian propolis, because the extracts tested showed a high free scavenging activity.

### Acknowledgement

We thank K. Miyazaki (University of Shizuoka) for technical assistance.

### REFERENCES

- Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 7286–7292.
- Ahn MR, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry* **101**: 1383–1392.
- Bankova V, Castro SLD, Marcucci M. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**: 3–15.
- Bankova V, Popov M, Bogdanov S, Sabatini AG. 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch* **57c**: 530–533.
- Barth OM. 1998. Pollen analysis of Brazilian propolis. *Grana* **37**: 97–101.
- Bonvehí JS, Coll FV. 1994. Phenolic composition of propolis from China and South America. *Z Naturforsch* **49c**: 712–718.
- Bonvehí JS, Coll FV. 2000. Study of propolis quality from China and Uruguay. *Z Naturforsch* **55c**: 778–784.
- Bonvehí JS, Gutiérrez AL. 2011. Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society* **88**: 1387–1395.
- Bonvehí JS, Gutiérrez AL. 2012. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**: 1351–1358.
- Bonvehí JS, Coll FV, Jordà RE. 1994. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **71**: 529–532.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technol* **28**: 25–30.
- Brazilian Ministry of Agriculture (2000). *Normative Instruction #11 Official Dietary of the Union, October, 23rd 2000, Section I*; 16–17.
- Burdock GA. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* **36**: 347–363.
- Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Campo Fernández M, Márquez Hernández I, Rosado A, Rasterli L. 2007. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PAD, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 7502–7509.
- Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1220–1234.
- Hamasaka T, Kumazawa S, Fujimoto T, Nakayama T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. *Food Sci Technol Res* **10**: 86–92.
- He G. 2000. Identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid-chromatographic-diode-array detection-mass- spectrometric methods. *Journal of Chromatography. A* **880**: 203–232.
- ICH. 2005. *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Guideline Q2 (R1)-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. ICH Secretariat, c/o IFPMA: Geneva; pp. 1–13.
- Isla MI, Paredes-Guzman JF, Nieva-Moreno MI, Koo H, Park YK. 2005. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 1166–1172.
- Kalogeropoulou N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtziunos I, Karathanos VT. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* **116**: 452–461.
- Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T, Nakayama T. 2002. Studies on the constituents of Uruguayan propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 4777–4782.
- Kumazawa S, Yoneda M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama T. 2003. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **51**: 740–742.
- Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* **84**: 329–339.
- Lima B, Tapia A, Luna I, Fabiani MP, Schmeda-Hirschmann G, Podia NS, Wunderlin DA, Feresin GE. 2009. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 2691–2698.
- Medana C, Carbone F, Aigotti R, Appendino G, Baiocchi C. 2008. Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLC-MS/MS. *Phytochemical Analysis* **19**: 32–39.
- Papotti G, Bertelli D, Bortolotti L, Plessi M. 2012. Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 2852–2862.
- Pellati F, Orlandini G, Pinetti D, Benvenuti S. 2011. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **55**: 934–948.
- Pietta PG, Gardana AM, Pietta AM. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, **74**: S7–S20.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **26**: 1231–1237.
- Volpi N, Bergonzini G. 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **42**: 354–361.





# PROPOLIS



**APAG**

Asociación provincial  
de Apicultores de Granada