

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE PROPÓLEOS ARGENTINOS PARA SU USO COMO BIOFUNGICIDA AGRÍCOLA

Irene L. Cibanal^{1,2}, Gabriela Krepper³, Leticia A. Fernández^{1,4}, Liliana M. Gallez^{1,5}

Introducción

El propóleo es un producto elaborado por las abejas (*Apis mellifera* L.) a partir de resinas, gomas y bálsamos exudados por diversas especies vegetales (Ghisalberti, 1978; Bankova et al., 2000). Las abejas pecoreadoras toman estas sustancias utilizando sus mandíbulas y el primer par de patas, las transforman física y químicamente con secreciones salivares propias, forman gránulos de propóleo y los transportan a la colonia en sus sacos corbiculares (Gojmerac, 1980). Una vez en la colmena, las recolectoras esperan entre una y siete horas hasta ser liberadas de su carga con la ayuda de otras abejas (Von Frisch, 1967).

En la colmena, el propóleo le proporciona protección física y química a las abejas: es utilizado para barnizar el interior de las paredes, cerrar grietas, reducir al mínimo las vías de acceso, recubrir restos de animales que se encuentren en el interior, consolidar componentes estructurales, evitar vibraciones, aislar térmicamente y asegurar la desinfección de la colmena (Morse, 1975). Todas las celdas, especialmente las recién construidas, son recubiertas con propóleo internamente antes que la reina deposite sus huevos (Caillas, 1978). En promedio, una colmena se abastece con 50 gramos de propóleo al año (Pryzyc, 2003).

En Argentina existen tres grandes zonas productoras de propóleos: la zona cuyana y del Alto Valle de Río Negro (Mendoza, Río Negro y Neuquén), la zona del Delta (sur de Entre Ríos, sur de Santa Fe y Norte de Buenos Aires) y la zona del Centro y Sur de la Provincia de Buenos Aires (Tandil y la costa bonaerense). Durante la temporada apícola se observan tres grandes períodos de entrada de propóleos a la colmena: el primero, que abarca la primavera y las primeras semanas del verano y representa entre un treinta y cuarenta por ciento de la recolección anual; el segundo, durante el verano, donde la entrada de propóleos es poco significativa; y el tercero, que comprende el período desde fines del verano hasta el comienzo del otoño, en donde se observa un ingreso de hasta el setenta por ciento del total (Bedascarrasbure et al., 2006).

¹ LabEA, Dpto. Agronomía, Universidad Nacional del Sur - Comisión de Investigaciones Científicas (CIC)

² picibanal@gmail.com

³ INQUISUR, Dpto. de Química, Universidad Nacional del Sur - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET) gkrepper@hotmail.com

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET) lafernan@uns.edu.ar

⁵ lgallez@uns.edu.ar

Para la cosecha con fines comerciales, los métodos más utilizados son el uso de mallas que se colocan por encima de los cuadros, y el raspado en el cual el apicultor cepilla los sitios donde las abejas depositan propóleos (Bedascarrasbure et al., 2006). En el primer caso, las mallas permiten una fácil retirada y recolección, ya que al ser congeladas el propóleos se vuelve quebradizo y se desprende de las mismas con facilidad. El segundo método puede resultar engorroso y debe hacerse con cuidado, ya que se podría contaminar la muestra con restos de las espátulas (Thimann y Manrique, 2002). Posteriormente, el propóleos debe conservarse en recipientes de vidrio, al abrigo de la luz y del aire (Pérez Arquillue y Jimeno Benito, 1987).

El propóleos producido por *A. mellifera* se caracteriza por presentar gran variabilidad en sus características (Peña, 2008). Su composición química es compleja y depende de la flora local, la época de recolección y la raza de las abejas (Meda y Mattos, 1994). Diversos estudios han demostrado que en los propóleos se pueden encontrar más de 300 compuestos químicos diferentes (Castaldo y Capasso, 2002; Pereira et al., 2002). Los constituyentes principales en las muestras son: ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales, polen, además de impurezas orgánicas e inorgánicas denominadas genéricamente impurezas mecánicas (Ribeiro Campos, 1987; Asís, 1989). En muy pocas ocasiones se han hallado contaminantes como plomo o arsénico, los cuales pueden provenir de la atmósfera (contaminación ambiental), o ser incorporados durante la cosecha, extracción o procesamiento (Bedascarrasbure et al., 2006).

Este producto de la colmena ha sido muy estudiado desde el punto de vista médico, ya que presenta propiedades antimicrobianas, anestésicas, antiulcerosas, inmunoestimulantes, hipotensivas, citostáticas antioxidantes (González Guerra y Bernal Méndez, 1997; Stangaciu, 1998; Farré et al., 2004). En el ámbito agrícola, las investigaciones sobre los posibles usos del propóleos son escasas. Sánchez y Acevedo (2009), evaluaron *in vitro* el efecto del propóleos venezolano contra el hongo *Sclerotium cepivorum*, agente causal de la pudrición blanca del ajo. Sosa López y colaboradores (2014) encontraron acción inhibitoria del propóleos sobre *Alternaria alternata* y *Colletotrichum sp.*. Matny (2015) probó el efecto del propóleos iraquí contra *Penicillium digitatum* causante del moho gris en naranjas almacenadas, obteniendo muy buenos resultados en la inhibición del crecimiento de este hongo. Por lo tanto, la acción antifúngica del propóleos podría ser de utilidad para tratar fitopatógenos, constituyendo así una alternativa de origen natural a los pesticidas sintéticos tradicionales.

En este trabajo se realizaron determinaciones sensoriales y fisicoquímicas de dos muestras de propóleos del sudoeste bonaerense, de una muestra de propóleos

mendocino y de propóleos proveniente de la región Patagónica argentina, con el objetivo de caracterizarlas para avanzar en su uso como biofungicida agrícola.

Materiales y Métodos

Origen de las muestras de propóleos

La muestra N°1 (M1), se recolectó por raspado en apiarios cercanos a la localidad de Río Colorado (región Patagónica argentina), durante el año 2014. La cosecha de la muestra N°2 (M2) se realizó en colmenas de Luján de Cuyo (Mendoza, Argentina), en el año 2012, empleando mayas, aunque se agregaron restos obtenidos por raspado. La muestra N°3 (M3) y la N°4 (M4), corresponden a apiarios del sudoeste bonaerense y fueron tomadas durante el año 2015. M3 se recolectó en la localidad de Bahía Blanca mediante el uso de mallas, mientras que M4 provino de Carmen de Patagones y se recolectó a través de mallas y raspado.

Todas las muestras se almacenaron al abrigo de la luz, en un congelador a -15 ± 2 °C. También se limpiaron de impurezas visibles y una parte de las mismas fue pulverizada con mortero de porcelana hasta reducir considerablemente su granulometría, obteniendo partículas homogéneas de menos de 2 mm de diámetro.

1- Caracterización del propóleos crudo: todas las determinaciones se hicieron siguiendo la metodología propuesta por las normas IRAM-INTA 15935-1 de Propóleos en Bruto.

1. a- Caracterización sensorial: se reunió a un grupo de 10 personas semi-entrenadas que realizaron pruebas sensoriales descriptivas de la consistencia, el color, el aspecto, el aroma y el sabor de las muestras brutas en estudio. Además, se informaron las impurezas visibles encontradas. Para esto, los propóleos se colocaron en frascos de vidrio codificados con tapa a rosca, y se conservó a 25°C durante los 3 días previos al análisis. Primeramente se evaluó el olor y el sabor y luego el resto de los caracteres, comparando cada muestra con los controles adecuados.

1.b- Determinación del punto de fusión: se utilizó un microscopio integrado a una platina de calentamiento con termómetro de mercurio. Una fracción mínima de propóleos molido de cada muestra fue dispuesta sobre un cubre-objeto y se observó el rango de temperaturas desde el comienzo hasta la finalización de la fusión. La temperatura media de fusión se calculó como el promedio de ambas temperaturas.

1.c- Determinación de las pérdidas por calentamiento: se pesaron en crisoles secos aproximadamente 4 gramos de cada muestra y se llevaron a estufa regulada a $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta eliminar completamente la humedad, lo cual se verificó cuando dos

pesadas sucesivas no difirieron entre sí en más de 5 mg. Una vez retiradas de la estufa, las capsulas se dejaron en un desecador hasta que llegaron a temperatura ambiente y fueron pesadas en una balanza analítica. La determinación se realizó por triplicado y para los cálculos se aplicó la fórmula:

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

donde H% fueron las pérdidas por calentamiento, C_{TS} la masa de la cápsula con la muestra seca (gr), C_{TH} la masa de la cápsula con la muestra en bruto (gr) y T la masa de la cápsula vacía (gr).

1.d- Determinación de cenizas: Las muestras secas en las cápsulas de porcelana provenientes de la determinación de pérdidas por calentamiento, se flamearon en mechero unos minutos y se colocaron en un horno de mufla para su incineración a $400^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$, hasta que se redujeron a cenizas blancas. Los crisoles se dejaron en un desecador hasta que llegaron a temperatura ambiente y se pudieron pesar. La determinación se realizó por triplicado, aplicando la fórmula:

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

dónde C% fueron las cenizas, C_z la masa del crisol con cenizas (gr), C_{Ph} la masa del crisol con la muestra en bruto (gr) y T la masa de la cápsula vacía (gr).

2- Elaboración y caracterización de extractos hidroalcohólicos de propóleos

A partir de cada muestra de propóleos se elaboró un extracto hidroalcohólico. Para ello, se colocaron 15 gr de propóleos molido en 150 ml de hidroalcohol de proporciones 70% etanol 96° y 30% agua destilada. La mezcla se colocó en un agitador magnético durante 24 hs dentro de una estufa a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La solución resultante se filtró con papel Whatman N° 40 para retener las impurezas y se conservó en frascos color ámbar en un lugar oscuro y fresco. Los extractos hidroalcohólicos (EH) obtenidos conservaron la nomenclatura utilizada para las muestras brutas de propóleos: EH M1, EH M2, EH M3 y EH M4.

Todas las determinaciones que se les realizaron siguieron la norma IRAM- INTA 15935-2 de Extractos de Propóleos.

2.a- Determinación de extracto seco: se colocó 1 mL de cada extracto en erlenmeyers previamente pesados y se llevaron a estufa a $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 hs. Posteriormente se dejaron en un desecador y por diferencia de peso se obtuvo la concentración de compuestos solubles. Se hicieron 3 repeticiones por muestra.

2.b- Determinación de compuestos fenólicos totales: inicialmente los extractos se diluyeron con etanol y con agua destilada. Luego, se les agregó reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio y se llevaron a baño maría a 50°C durante 5 minutos. Paralelamente se trazó un curva de calibrado con una solución de referencia de ácido gálico de 0,5 mg/ml. La determinación se hizo por triplicado y se utilizó un espectrofotómetro *Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer*, con el cual se leyó la absorbancia a 755 nm contra un blanco de etanol 96°. Con los valores de absorbancia obtenidos se interpoló en la curva de calibración.

2.c- Determinación de flavonoides totales: a una alícuota de cada extracto de propóleos se le agregó 0.5 mL de una solución de tricloruro de aluminio al 5 % (p/v) y metanol. La curva de calibración se construyó con una solución de Quercetina. Al igual que en la determinación anterior (2.b), se leyó en el espectrofotómetro la absorbancia a 454 nm utilizando etanol 96° como blanco y se calcularon los resultados.

2.d- Curvas UV-VIS: se diluyeron los extractos con hidroalcohol para obtener un espectrograma de absorción en el UV, lo que permitió detectar la presencia cualitativa de compuestos fenólicos bioactivos. Se trabajó con un espectrofotómetro *JASCO V-630 BIO* y el programa de análisis *Spectra Analysis*. Se realizó un barrido desde 240 nm hasta 420 nm, midiendo a intervalos de 10 nm y se leyó la absorbancia a 290 nm.

Resultados y discusión

Los resultados de los distintos atributos sensoriales de los propóleos estudiados en este trabajo se muestran en la Tabla 1. Las impurezas visibles encontradas fueron virutas de madera, restos de cera y partes de abeja, no llegando a constituir en ninguna de las muestras el 25% del total (bajo porcentaje). El hecho de que distintos apicultores, empleando dos métodos diferentes de cosecha (mallas y raspado), hayan obtenido muestras limpias, indica que estos métodos no condicionan la calidad final del propóleos obtenido, siendo la forma de trabajar lo que eventualmente puede influir (Orantes Bermejo, 2006).

En lo que respecta a la consistencia, color, aspecto, aroma y sabor, se presentaron leves variaciones respecto a las caracterizaciones hechas por otros autores para propóleos de las mismas regiones (Bedascarrasbure et al., 2006). Se destaca que para la muestra proveniente de Mendoza (M2), todos los jurados informaron percibir un fuerte aroma a plástico o a químico sintético.

Tabla 1. Características sensoriales de las muestras de propóleos.

Muestra	Origen	Consistencia	Color	Aspecto	Aroma	Sabor
M1	Rio Colorado	Blanda	Marrón con tintes amarillos	Trozos irregulares	Resinoso	Picante, amaderado
M2	Mendoza	Dura	Marrón verdoso	Trozos irregulares	Aromático, químico	Picante
M3	Bahía Blanca	Dura	Marrón claro, con tintes rojizos	Trozos irregulares	Suave, resinoso	Amargo
M4	Carmen de Patagónes	Dura	Marrón con tintes amarillos	Trozos irregulares	Resinoso	Picante

Los resultados de la determinación del punto de fusión se presentan en la Tabla 2. Las temperaturas medias de fusión registradas para los propóleos en estudio coinciden con las reportadas por otros autores: según Salamanca et al. (2004), el punto de fusión del propóleos varía entre 60 y 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C. El rango de fusión se refiere al intervalo de temperaturas en las cuales una sustancia sólida comienza a fluidificarse y queda completamente fundida. Las sustancias puras, tienen un punto de fusión constante y funden en un intervalo pequeño (normalmente de un grado o menos) (Ramsay, 1949). Las muestras estudiadas presentaron un rango amplio entre la temperatura de inicio y la temperatura final de fusión, lo que es consistente con que el propóleos es un material complejo y variable.

Tabla 2. Resultados de la determinación del punto de fusión, de las pérdidas por calentamiento y de las cenizas.

Muestra	Rango de fusión (°C)	Temperatura media de fusión (°C)	Pérdidas por calentamiento (%)	Cenizas (%)
M1	61 - 73	67	1,3984	1,8724
M2	64 - 71	67,5	1,0447	7,1870
M3	62 - 65	63,5	1,4375	0,9829
M4	56 - 70	63	1,4686	6,3577

Las pérdidas por calentamiento (Tabla 2), no mostraron grandes diferencias entre las muestras y todas ellas cumplieron con el requisito de la normativa argentina que permite un máximo del 10%. Los valores obtenidos fueron bajos en comparación a los reportados por otros autores para propóleos provenientes de Mendoza y de la Provincia de Buenos Aires. Por ejemplo, Bedascarrasbure et al., (2006) determinó que

las pérdidas por calentamiento promedio en propóleos cuyanos es de 3,59% y en bonaerenses de 4,79%.

Este parámetro es un indicativo de las diferencias que existen en la calidad de los propóleos y podría estar relacionado con el manejo en postcosecha del producto. Cuanta más humedad contenga una muestra, menor concentración de compuestos bioactivos presentará, lo que se verá reflejado en la disminución de su actividad biológica. Así mismo, esto podría afectar su estabilidad microbiológica (Martínez, J. 2009).

El contenido de cenizas presentó grandes diferencias entre muestras. M2 y M3 mostraron valores promedio más elevados que lo permitido por la norma argentina. Debido a que las cenizas están constituidas por el residuo inorgánico que queda después de que la materia orgánica se ha quemado, estos resultados podrían indicar un alto contenido de minerales o la presencia de impurezas mecánicas, tierra, u otros contaminantes (Funari y Ferro, 2006).

El contenido de fenoles, flavonoides y la determinación de extracto seco se muestran en la Tabla 3. En la estimación de las curvas de calibración para fenoles y flavonoides, se observaron coeficientes de correlación adecuados: [$R^2 = 0,9975$ (\pm) Ácido Gálico] y [$R^2 = 0,9997$ (\pm) Quercetina] respectivamente.

Todas las muestras cumplieron con los requisitos establecidos por la norma argentina para el contenido de fenoles y flavonoides, superando ampliamente el mínimo propuesto: 5 gr/100 de fenoles y 1 gr/100 gr de flavonoides. La variable flavonoides presentó un comportamiento diferente al de fenoles. El valor más alto de fenoles corresponde a HA M3, mientras que el de flavonoides a HA M4. Según Bedascarrasbure et al. (2004), un mayor contenido de fenoles totales no necesariamente determina un mayor contenido de flavonoides.

A su vez, los resultados obtenidos en la determinación de fenoles y flavonoides, difieren con los de otros autores. De acuerdo a lo establecido por Bedascarrasbure et al. (2006), los extractos alcohólicos de propóleos de la región cuyana argentina contienen en promedio 21,91 gr (% p/p) de fenoles y 12,58 gr (% p/p) de flavonoides; los de la provincia de Buenos Aires 21,59 gr (%p/p) y 9,18 gr (%p/p) respectivamente; y los de la región patagónica 5,54 gr (%p/p) de fenoles y 1,55 gr (%p/p) de flavonoides. Estas discrepancias podrían deberse, además de a cuestiones relacionadas con la vegetación cercana a los apiarios, a la forma de realizar la extracción y a los solventes utilizados.

Tabla 3. Resultados de la determinación de extracto seco, compuestos fenólicos y flavonoides totales.

Muestra	Extracto seco* (gr/ml)	Compuestos fenólicos** (gr/100 gr)	Flavonoides totales** (gr/100 gr)
HA M1	0,063	45,4523	2,5206
HA M2	0,035	66,9742	3,2085
HA M3	0,06	89,8616	2,6033
HA M4	0,09	26,95	1,3944

*El extracto seco está expresado en gramos de materia seca por mililitro de solución hidroalcohólica.

**Los fenoles y flavonoides se expresaron sobre 100 gramos de extracto seco de propóleos.

Los análisis del espectro de absorción UV-Vis para los extractos hidroalcohólicos de propóleos, se presentan en las Figuras 1, 2, 3 y 4. Las muestras exhiben un perfil de absorción con una banda amplia entre 240 nm y 340 nm, un máximo de absorbancia cercano a los 290 nm. y una banda levemente insinuada entre los 320 y 330 nm. En base a esto, se puede inferir que los distintos perfiles corresponden a diversas composiciones de polifenoles y flavonoides como consecuencia del origen fitogeográfico de los mismos.

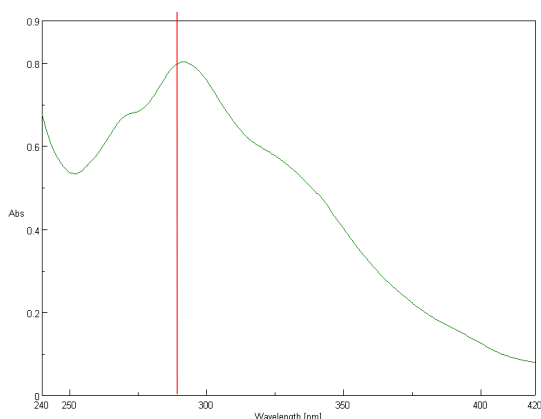


Figura 1. Espectrograma del EH M1

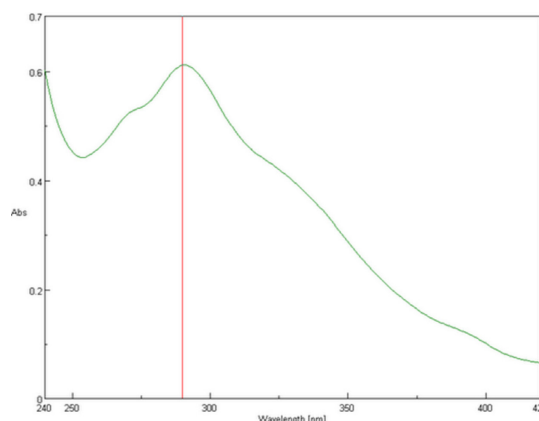


Figura 2. Espectrograma del EH M2

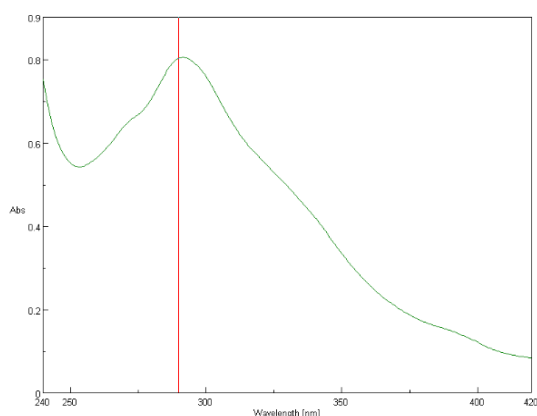


Figura 3. Espectrograma del EH M3

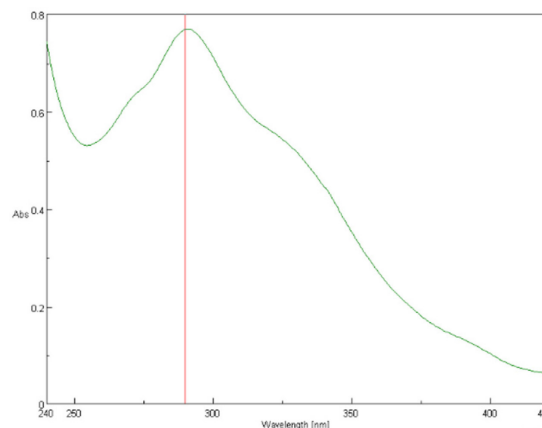


Figura 4. Espectrograma del EH M4

Conclusiones

Este trabajo generó datos sobre las características de los propóleos producidos en el sudoeste bonaerense, de los cuales se tenía muy poca información. Los propóleos analizados presentaron características organolépticas y fisicoquímicas variables, las cuales en su mayoría cumplen con los valores predeterminados por las normativas internacionales expuestas por IRAM-INTA (Instituto Argentino de Normalización). Finalmente, los extractos analizados presentaron un excelente perfil químico, lo que permite avanzar hacia el desarrollo de biofungicidas agrícolas más amigables con el medioambiente.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires) por el financiamiento del proyecto “Estrategias de valorización de la apicultura en el sur bonaerense” y por la beca doctoral de Irene Cibanal. Además, agradecen a los apicultores Germán P. Balbarrey, Victor Tittarelli y Jesús A. Cibanal por donar las muestras de propóleos y al Dr. en Agronomía Fernando López y a la Lic. Química Melissa Moiola por la ayuda brindada durante las distintas determinaciones.

Bibliografía

- Asis, M. 1989. *Propóleos: el oro púrpura de las abejas*. Centro de Información y Documentación Agropecuaria. Editorial CIDA. La Habana. Cuba.
- Bankova, V., Castro, S. L., Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Rev. Art. Apidologie*. 31: 3-15.

- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., & Rodriguez, E. 2004. Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23, 369-372.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Fierro Morales, W. y Alvarez, A. 2006. Propóleos, 218 p.
- Caillas, A. 1978. Propolis. In Remarkable hive product: Propolis Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics. Apimondia Standing Commission on Beekeeping technology and Equipment, Bucharest.
- Castaldo, S. y Capasso, F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73:S1-S6.
- Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A. 2004. El propolis y la salud. *Ars. Pharmaceutica*, 45 (1): 21- 42.
- Funari, C. S. y Ferro, V. O. 2006. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1), 171-178.
- Ghisalberti, 1978. E.L. Propolis: a review. *Bee Wld* 60, 59–84.
- Gojmerac, W. L. 1980. Activities and behavior of the colony as an organism. Em *Bees, Beekeeping, Honey and Pollination*. Eastern Graphics. Old Saybook, Conn. pp. 33-56.
- González Guerra, A. y Bernal Méndez, R. 1997. Propóleos: un camino hacia la salud. Editorial Pablo de la Torriente. La Habana. Cuba. Cap.1, p. 8-28.
- Grosso, G. S., Carvajal, I. L. C. y Principal, J. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, 25(2), 95-102.
- Konishi, S., Sawaya, A., Custódio, A. R., Cunha, I., y Shimizu, M. 2004. Influence of solubilising agents on antimicrobial activity of propolis extracts and of hydro alcoholic spray formula. *Mensagem Doce*, 75, 22-25.
- Martínez, J. 2009. Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. *Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Maestría en ciencia y tecnología de alimentos Medellín*.
- Matny, O. N. 2015. Efficacy evaluation of Iraqi propolis against gray mold of stored orange caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathology Journal*, 14(3), 153.
- Meda, A. C. y Mattos Meda, A. P. 1994. Própolis um bem da humanidade- produção e controle. Anales del x congreso brasileiro de apicultura. Pousada do Rio Quente Do. Brasil, p. 46-50.
- Morse, G. D. 1975. A cerca del Propóleos. Su utilización en la colmena. Propóleos. Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y

utilización con fines terapéuticos. Comisión Permanente de Tecnología y Utilaje apícolas. Editorial Apimondia. Bucarest. Rumania. Capítulo I: Generalidades, 59-63 p.

Norma, I. I. (2008). 15935-1. Propoleos en Bruto. *Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización*.

Norma, I. I. (2008). 15935-2. Extractos de Propóleos. *Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización*.

Orantes Bermejo, F. J. 2006. Los Propóleos en Andalucía. Grupo de Cooperación Columela - Asociación Provincial de Apicultores de Granada. Proyecto C/99/006.

Peña, R. C. 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e investigación agraria*, 35(1), 17-26.

Pereira, A. S., Seixas, S. F., Mathias Silva, F. e Aquino Neto, F. 2002. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova* 25:321-326.

Pérez Arquillue, C. y Jimeno Benito, M. F. 1987. *Los propóleos de las abejas* (No. Folleto 11390). España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Prytzyk, E. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003. Vol. 88, 189-193.

Ramsay, J. A. 1949. A new method of freezing-point determination for small quantities. *J. Exp. Biol.* 26 (1): 57-64. PMID 15406812.

Ribeiro Campos, M. G. 1987. Contribução para o Estudo do Mel, Polen, Geleia Real e Própolis. *Boletim da faculdade de Farmacia de Coimbra*. Portugal. v. 11, n. 2, p. 17-47.

Salamanca, G. G., Ramírez, C. y Rubiano, L. 2004. Contenido mineral de los propóleos colectados en algunas zonas biogeográficas colombianas. *Rev. Inst. Univer. Chocó*, 20: 79-85.

Sánchez, J., Acevedo, R. 1999. Propóleos de abejas (*Apis mellifera*) en el control de *Sclerotium cepivorum*, agente causal de la pudrición blanca del ajo. Resúmenes de los trabajos presentados en el XVI Congreso Venezolano de Fitopatología.

Santos, M. D., Message, D., Cruz, C. 1996. Influência dos fatores climáticos na coleta de própolis em abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Apicultura*, Teresina, Piauí. p. 372.

Sosa Lopez, A.A.; Rennis, L.; Cabrera, M.G.; Castillo, A.E. 2014. Determinación de hongos patógenos en cultivos ornamentales y su control con soluciones de propóleos *AGROTECNIA* 22: 13-17. Disponible en formato digital en http://baunne.unne.edu.ar/revista_agrotecnia/pdfs/AG_22_14_02-SosaLopez.pdf (consultado el 18/11/2016).

Stangaciu, S. 1998. Composición y Propiedades del Propóleos. *Apimondia Aiacta* n. 33, p. 71-77.

Thimann, R. y Manrique, A. J. 2002. Recolección de propóleos en colonias de abejas africanizadas durante la temporada de lluvias en Guanare, Venezuela Propolis harvest from hives of Africanized bees during the raining season in Guanare, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 20(4), 493-499.

Von Frisch, K. 1967. The dance language and orientation of bees.