

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



**CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES
FUNCIONALES DE LOS PROPÓLEOS.**

**TESIS DOCTORAL
EDDY VALENTÍN BETANCES SALCEDO**

**DIRECTORAS: Dra. MARÍA INMACULADA GONZÁLEZ MARTÍN
Dra. ANA MARÍA VIVAR QUINTANA
Dra. ISABEL REVILLA MARTÍN**

Salamanca, 2018.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	5
1. PROPÓLEOS	9
1.1. Recolección y procesamiento.....	10
1.2. Uso de los propóleos por las abejas	12
1.3. Formas de extracción de los propóleos	12
1.4. Elaboración y transformación	13
1.5. Característica organoléptica de los propóleos	14
1.6. Legislación	14
1.7. Composición química de los propóleos	15
1.7.1. Composición fenólica.....	18
1.7.2. Composición en fenoles simples y ácidos fenólicos.....	20
1.7.3. Composición de los Flavonoides.....	21
1.7.4. Composición de las flavonas + dihidroflavonoles.....	25
1.8. Cuantificación	26
1.8.1. Cuantificación de los compuestos fenólicos totales.....	26
1.8.2. Cuantificación de ácidos fenólicos.....	27
1.8.3. Cuantificación de las flavonas y flavonoles en los propóleos.....	31
1.8.4. Cuantificación de las flavanonas y dihidroflavonoles en los propóleos.....	31
1.9. Actividad antioxidante.....	33
1.9.1. Propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos.....	34
1.9.2. Propiedades antioxidantes de los flavonoides.....	36
1.9.3. Métodos para la determinación de la actividad antioxidante	36
Método DPPH.....	36
Método ABTS.....	39
Método del ácido linoleico/ β -caroteno.....	43
1.10. Compuestos tóxicos en los propóleos	47
1.10.1. Metales pesados.....	47
1.10.2. Pesticidas.....	49
1.11. Productos comerciales con propóleos	51
1.12. Influencia de la zona geográfica sobre la composición química de los propóleos.....	52
1.13. Referencias de los propóleos.....	55
2.1. FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIR)	71
2.2. Espectroscopia de reflectancia	72
2.3. Interpretación de espectros en la zona NIR.....	74
2.4. Instrumentación.....	80

2.5. Estandarización del equipo NIR.....	82
2.6. Ventajas e inconvenientes de la espectroscopia NIR.....	84
3. QUIMIOMETRÍA.....	87
3.1. Pretratamientos espectrales	87
3.2. Análisis de componentes principales (PCA).....	93
3.3. Análisis cuantitativos	96
3.3.1. Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS).....	96
3.4. Análisis cualitativo.....	101
3.4.1. Análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales (DPLS).....	101
3.5. Antecedentes bibliográficos	102
3.6. Referencias de espectroscopia NIR.....	106
4. MATERIALES Y MÉTODOS	111
4.1. Muestras	111
4.2. Equipos	114
4.3. Reactivos	115
4.3.1. Polifenoles totales	115
4.3.2. Flavonas + flavonoles.....	115
4.3.3. Flavanonas + dihidroflavonoles	115
4.3.4. Capacidad antioxidante	115
4.3.4.1. DPPH	115
4.3.4.2. ABTS.....	115
4.3.4.3. Ácido linoleico/ β -caroteno.....	115
4.4. Ácidos fenólicos por HPLC	116
4.5. Residuos de pesticidas en los propóleos crudos y procesados comerciales.....	116
4.6. Composición mineral	116
4.7. Procedimientos analíticos.....	116
4.7.1. Extracción de los propóleos	116
4.7.2. Polifenoles totales	117
4.7.3. Flavonas y flavonoles.....	117
4.7.4. Flavanonas y dihidroflavonoles	118
4.7.5. DPPH	118
4.7.6. ABTS.....	118
4.7.7. Ácido linoleico/ β -caroteno.....	119
4.7.8. HPLC para los ácidos fenólicos	119
4.7.9. Residuos de pesticidas.....	120
4.7.10. Composición mineral	121
COMENTARIO Y ENFOQUE DE LOS RESULTADOS Y PUBLICACIONES.....	123

5.1- RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN LOS PROPÓLEOS DE ESPAÑA Y CHILE. ENFOQUE DONDE SE UTILIZA LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CERCANA.....	123
5.1.1. Antecedentes.....	123
5.1.2. <i>Objetivos</i>	124
5.1.3. Parte experimental	125
5.1.4. <i>Conclusión</i>	126
<i>Publicación</i>	127
5.2- PREDICCIÓN DE FLAVONOIDES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PROPÓLEOS USANDO LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJO CERCANO. 138	
5.2.1. Antecedentes	138
5.2.2. <i>Objetivos</i>	139
5.2.3. Parte experimental.....	139
5.2.4. <i>Conclusión</i>	149
<i>Publicación</i>	141
6. ANEXOS DE TABLAS	157
6.1. <i>Datos químicos de los contenidos de flavonas y flavonoles (Referidos a la rutina y quercetina), flavanonas y dihidroflavonoles (Referidos a pinocembrina) y la capacidad antioxidante por los métodos del ABTS y del ácido linoleico/β-caroteno de las muestras de los propóleos crudos de España y Chile, obtenidos por espectrofotometría</i>	157
6.2. <i>Datos químicos de los contenidos de residuos de pesticidas de las muestras de los propóleos crudos de España y Chile, obtenidos por cromatografía CG-MS, expresados en mg/kg</i>	160

INTRODUCCIÓN

Los propóleos son un conjunto de sustancias de apariencia resinosa utilizadas por las abejas para cubrir y proteger la colmena, obtenidos a partir de las yemas y cortezas de algunos árboles. La mayoría de los propóleos comparten una considerable similitud en su naturaleza química general: 50% de resina, 30% de cera, 10% de aceites volátiles, 5% de polen y 5% de otros compuestos orgánicos. Es un producto rico en componentes bioquímicos de entre los que se han identificado más de 300 incluyendo varios polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, aldehídos fenólicos y cetonas, terpenos, esteroides, vitaminas y aminoácidos entre otros.

Las propiedades bioactivas de los propóleos se relacionan principalmente con la presencia de fenoles y flavonoides. Se considera un magnífico biorregulador, rehaciendo la capacidad de defensa, funcionamiento y adaptación del organismo. Los propóleos son una fuente natural de antioxidantes, que protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación, destacando sus efectos en la producción de anticuerpos y fortalecimiento del sistema inmunológico. Son numerosos los trabajos científicos centrados en los flavonoides en los propóleos y los relativos a la identificación y cuantificación de su composición polifenólica. Diferentes métodos, tales como el FRAP, ABTS o DPPH, han sido utilizados para evaluar su poder antioxidante.

Los oligoelementos presentes en los propóleos justifican muchas virtudes, pues participan en procesos metabólicos, fermentativos y vitamínicos. Sin embargo, también puede ser un riesgo la presencia de elementos pesados como Pb, Cr, como posibles contaminantes. Las determinaciones de oligoelementos en los propóleos se utilizan como elemento diferenciador de las zonas geográficas donde se han producido y de su composición.

Parece pues que las diferencias de composición química, actividad biológica y terapéutica de los propóleos depende de diversidad fitogeográfica de la zona de recolección, clima, variedad de la abeja reina, época de recolección, etc. Estas diferencias serían susceptibles de verse reflejadas en los espectros NIR. Las técnicas quimiométricas junto con la tecnología NIR permitirían, por tanto, conocer la trazabilidad alimentaria y ayudar al sector apícola a identificar y proveer información de un producto como los propóleos de gran valor añadido.

OBJETIVOS

- **Caracterización de los propóleos crudos con datos físico-químicos y técnicas quimiométricas.** Se pretende establecer la relación de las propiedades nutraceuticas de los propóleos (efectos beneficiosos para la salud humana) con el origen y diversidad fitogeográfica de los mismos.
- **Detección de la presencia de posibles contaminantes en los propóleos crudos.** El estudio se centrará en la presencia de pesticidas y metales pesados.
- **Puesta a punto de nuevos métodos de análisis NIR que permitan determinar los parámetros de los propóleos que tienen relación con sus propiedades biocidas, de forma rápida, sin destrucción ni tratamiento de la muestra.** En este proyecto se pretende la caracterización de los propóleos mediante espectroscopia en el infrarrojo cercano con ayuda de una sonda de fibra óptica de reflectancia remota, con el fin de poner a punto métodos rápidos de análisis sin tratamiento de muestra (aplicando directamente la sonda sobre la muestra triturada). Los estudios quimiométricos se usarán para conocer las relaciones entre las variables de interés.
- **Detección de la presencia de posibles contaminantes en preparados comerciales.** Se analizará la presencia de pesticidas y metales pesados en preparados comerciales a base de los propóleos o que contengan propóleos en su formulación. Para ello se analizarán propóleos procesados disponibles comercialmente en forma de cápsulas, tabletas, caramelos, tinturas y jarabes.

PROPÓLEOS

El término propóleos o “Oro purpura de las abejas” fue usado en la antigua Grecia, Egipto, Roma e Incas y proviene del latín: pro (en frente de, a la entrada de) y poleos (ciudad o comunidad). Es decir, material que es usado para la defensa de la ciudad o colmena (Asís, 1989). Son numerosas las definiciones dadas a los propóleos, la mayoría de ellas coinciden en que es un producto resinoso que se forma a partir de exudados que las abejas mastican y que luego regurgitan en la colmena, mezclándolo con pequeñas cantidades de azúcares y cera (Greenaway *et al.*, 1987 y 1990; Ghisalberti, 1978; Banskota *et al.*, 2001).

Junto a la miel, la jalea real y el polen, los propóleos es uno más de los productos apícolas que se extraen de la colmena. El Diccionario de la Real Academia Española de la Lengua define los propóleos (Del lat. propóleos, genit. de propólis) como “sustancias cerasas con que las abejas bañan la colmena o los vasos antes de empezar a obrar”. Los compuestos fenólicos, flavonoides en particular, y algunos aceites esenciales son los responsables de la mayoría de las propiedades farmacológicas que se le atribuyen: anestésicas, antitumorales, antibióticas, antiinflamatorias, antioxidantes, antiparasitarias, antipsoriásicas, antivirales, cicatrizantes, fungicidas, vasoprotectoras y fitoinhedoras, entre otras, confiriéndole aplicaciones en veterinaria, clínica, agricultura, alimentación o cosmética (Asís, 1989; Caballero, 1990; Marcucci, 1995; Woisky, 1996; Burdock, 1998; Banskota, 2001; Rossi *et al.*, 2002; Castaldo *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2004; Fuliang *et al.*, 2005; Bankova, 2005 y 2005a; De Vecchy *et al.*, 2007; Adelman *et al.*, 2007; Viuda-Martos *et al.*, 2008; Sforcin *et al.*, 2010; Jean-Proust, 2010).

Los preparados comerciales con propóleos se utilizan en distintas aplicaciones tales como: tratamientos de resfriados, afecciones de garganta, preparaciones dermatológicas para el tratamiento de quemaduras, acné, herpes, etc. (Burdock, 1998). Además, se utiliza en enjuagues bucales o pastas dentales para prevenir las caries y tratar la gingivitis y la estomatitis (Libério *et al.*, 2009). Es utilizado en la industria como aditivo alimentario natural, como ingrediente alimentario funcional o complemento y como componente de los cosméticos naturales (Popova *et al.*, 2007; Duman *et al.*, 2015). Aplicado externamente, alivia varios tipos de infecciones causadas por bacterias y hongos (Castaldo *et al.*, 2002). En las décadas de los 70 y 80 se realizaron estudios en pacientes que demuestran la efectividad de los propóleos en dermatología, otorrinolaringología,

enfermedades ginecológicas, enfermedades digestivas, odontología y otras patologías (Marcucci, 1995).

Respecto de su toxicidad, los propóleos contienen algunos compuestos que pueden causar dermatitis de contacto y reacciones de hipersensibilidad (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Basista-Sołtys, 2013). El cálculo de la dosis letal al 50% (LD₅₀) en ratones se calcula superior a 2000 mg/kg (Burdock, 1998; Banskota, 2001), con lo que es un producto de muy baja toxicidad. La ingesta crónica de los propóleos también ha sido evaluada, no encontrándose alteraciones bioquímicas que sugieran toxicidad a largo plazo (Mani *et al.*, 2006), al contrario, mostrando una buena biodisponibilidad oral y un adecuado perfil de seguridad (Basista-Sołtys, 2013). Estas propiedades, que han sido acreditadas por diversos investigadores en los últimos 30 años, son las responsables de la proliferación en el mercado de productos derivados de los propóleos provenientes tanto de la industria farmacéutica como alimenticia (Venegas *et al.*, 2015). En la actualidad son numerosos los trabajos de investigación que avalan la eficacia de los propóleos en diferentes campos y mostrando resultados sorprendentes e innovadores, no solo en el campo de la Medicina sino también en Alimentación, Agricultura o Veterinaria (Pinto *et al.*, 2001; Gekker *et al.*, 2005; Cortés, 2008; Pastor *et al.*, 2010; Andrade-Carvalho *et al.*, 2011).

Composición química de los propóleos

La variabilidad de los propóleos en su composición química depende del lugar de colecta, de los diferentes ecosistemas y de las secreciones que sirven como fuentes (Bankova *et al.*, 2000; Dos Santos-Pereira *et al.*, 2002), de lo que se deduce que el término “propóleos” no caracteriza químicamente al producto. El conocimiento de la composición química de los propóleos se considera un aspecto muy importante, ya que permite correlacionarla con la actividad biológica de los mismos. Por otra parte, permite controlar la calidad de las fórmulas farmacéuticas desde un punto de vista químico y determinar las dosis efectivas en las mismas, así como elaborar medicamentos más eficaces sobre la base de las propiedades físico-químicas de los componentes específicos (Chi *et al.*, 1994). Además, el potencial biológico de los propóleos se puede diversificar sobre la base de uno o varios componentes químicos (Campo-Fernández, 2007).

Los propóleos no eran considerados de importancia ni en la apicultura, ni para los apicultores dado que carecía de valor comercial, hasta que comienza a tener significado para los tratamientos de afecciones de la salud a partir de la década del 50 en la Unión de

Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) y los países de Europa del Este con resultados satisfactorios (Matsuno *et al.*, 1997). La primera patente se inscribió en Rumania en 1965. Peña, (2008), señaló que existen 239 y que el 43% de las mismas son de origen japonés. En América, en los países del oeste de Europa y en Japón, los propóleos no adquirieron popularidad, sino hasta la década del '80, cuando se anunciaron sus cualidades farmacológicas, en el 30th Congreso Internacional de apicultura en Nagoya (Salatino *et al.*, 2005). Por lo antedicho, Dos Santos-Pereira *et al.*, (2002), señala las perspectivas futuras de los propóleos e indica que en el *Chemical Abstracts* se publicaron en los últimos 100 años, 450 trabajos oriundos de 39 países (dos de cinco continentes) y 239 patentes. El incremento en las investigaciones a partir de la década del '80 osciló entre 44 y el 660% (Vázquez, 2010).

En numerosos estudios, se ha determinado que, los constituyentes principales de los propóleos son: cera, resinas, bálsamos, aceites esenciales, polen, además de impurezas orgánicas e inorgánicas denominadas genéricamente impurezas mecánicas (Ribeiro-Campos, 1987; Asís, 1989). La proporción de éstos es variable y depende de factores como la época de recolección, el origen vegetal de la resina y también es importante la raza de abejas (Meda *et al.*, 1994).

Un análisis primario de cualquier muestra de los propóleos permitirá determinar, en líneas generales, la presencia de cera, íntimamente mezclada en proporciones de 20-30 %. Las muestras obtenidas por raspado de cuadros presentan mayores cantidades de cera y además, resinas y bálsamos aromáticos (40-50%), aceites esenciales (5-10%), polen (4-5%) y mezclas mecánicas (10-30%). Estas últimas se encuentran en los propóleos empleados con fines constructivos (Ribeiro-Campos, 1987; Asís, 1989; Del Cueto-Leiva, 1994; Chaillou, 2005).

Debido a la participación de la abeja, la composición de los propóleos difiere de las resinas vegetales, pudiendo considerarse por lo tanto, un producto de origen mixto, vegetal y/o animal de acuerdo de la legislación vigente en cada país (Bonvehí *et al.*, 1994), Externamente las abejas forrajeras cosechan los propóleos solamente a partir de yemas y en otras diferentes partes de las plantas (Hegazi, 2000), este lo recolectan mediante sus mandíbulas y lo transportan en las cestillas de sus patas traseras. En Europa, Norte y el oeste de Asia la fuente principal de los propóleos es el exudado de yemas de álamo (*Populus sp.*) (Bedascarrasbure *et al.*, 2006; Koenig, 1985) y en Rusia del abedul (*Betula sp.*) (Bedascarrasbure *et al.*, 2006).

Por otro lado, Soleo-De Funari *et al.*, (2006), revelan que la presentación rígida de los propóleos, puede ser una característica deseable porque las actividades biológicas analizadas han sido atribuidas a sustancias contenidas en esta fracción. Por el contrario, su estado maleable, indicaría un elevado porcentaje de ceras. Respecto al sabor y aroma, son indicativos de edad de la muestra, dado que, al disminuir estos parámetros en la misma, señalaría antigüedad en su elaboración. Las ceras y las mezclas mecánicas constituyen casi siempre entre el 40 a 50 % de la masa total, siendo el resto lo que corresponde a la parte biológicamente activa. La calidad de los propóleos será inversamente proporcional a las cantidades de materias insolubles (Walter *et al.*, 1987).

Químicamente, se han identificado en los propóleos, aminoácidos, ácidos alifáticos y sus ésteres, ácidos aromáticos y sus ésteres, alcoholes, aldehídos, flavonoides agliconas, hidrocarburos, cetonas, terpenoides, vitaminas y minerales (González-Guerra *et al.*, 1997). Los componentes principales son compuestos fenólicos (Bankova *et al.*, 1992), que presentan en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Melo *et al.*, 2002, Chaillou, 2005). Estos compuestos polifenólicos constituyen mezclas complejas que contienen compuestos representativos de diversos grupos estructurales, destacándose entre los mismos los flavonoides y sus agliconas, a los cuales se les atribuye las propiedades antibacterianas, fungicidas, antivirales, anestésicas (Bankova *et al.*, 1992; Ghisalberti, 1978; González-Guerra *et al.*, 1997) y antioxidantes (Asís, 1989), así como también se incluyen los ácidos fenólicos y sus ésteres (Marcucci, 1995).

Desde que Dietrich y Kustenmacher en 1911, identificaron los primeros elementos activos entre los que se destacan la vainillina, el ácido y el alcohol cinámico (González-Guerra *et al.*, 1997; Vázquez, 2010). Propavko (1975), aisló once elementos y consideró como principales componentes las flavonas, los flavonoles, las flavanonas, los terpenos, la isovanillina y el acetoxi-betulenol. Cizmarik *et al.*, (1970), determinaron los ácidos aromáticos no saturados, caféico y ferúlico. Greenaway *et al.*, (1990), indica que los propóleos cualitativamente estaban compuestos por aminoácidos (más de veinte), ácidos alifáticos y sus ésteres, ácidos aromáticos y sus ésteres, alcoholes, aldehídos, calconas, dihidrocalconas, flavanonas, flavonas, hidrocarburos, cetonas, terpenoides y otros compuestos (Vázquez, 2010).

Los más importantes constituyentes parecen ser los compuestos fenólicos, que constituyen más del 50 % de su peso total, (Bankova *et al.*, 2000). La literatura existente Orantes-Bermejo, (2006), señala que la actividad principal es debida a los flavonoides (compuestos no sintetizados por los animales), por eso la relación flavonoides-efecto

biológico de los propóleos revela el interés de cuantificar estos constituyentes (Bruschi *et al.*, 2003). El estudio de los compuestos fenólicos que contiene ha resultado una herramienta muy útil a la hora de determinar su origen geográfico y botánico; de hecho, se ha propuesto como posible marcador del origen floral de los propóleos (Matsuda *et al.*, 2008). Además de esto influye la estación (clima) y recolección existente en la zona, siendo la especie *Populus* la más frecuente en climas templados incluyendo a Europa, Norte América, Asia, Sur América y Nueva Zealanda (Kujumgiev *et al.*, 1999; Sforcin *et al.*, 2000; Bankova *et al.*, 2000; Velikova *et al.*, 2000; Melliou *et al.*, 2004; Bankova, 2005; Salatino *et al.*, 2005; Katircioglu *et al.*, 2006; Popova *et al.*, 2007; Mohammadzadeh *et al.*, 2007; Bankova *et al.*, 2008). Son cuantiosas las investigaciones que indican la existencia de una estrecha relación entre la flora circundante al colmenar que las abejas utilizan como fuente de resinas y la composición de polifenoles de los propóleos (Bankova *et al.*, 2000).

Compuestos tóxicos en los propóleos

Metales pesados

Existe muy poca información sobre el contenido de oligoelementos en los propóleos, especialmente la posible presencia de minerales tóxicos, lo que puede afectar significativamente a sus propiedades. Los elementos minerales justifican muchas virtudes de los propóleos, como su participación en los procesos metabólicos, previniendo la arteriosclerosis y el aumentando la capacidad inmune del cuerpo (Sforcin, 2007). El contenido mineral de los propóleos se utiliza como característica distintiva de las zonas geográficas donde se produce (Cantarelli *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2012) y como un indicador de contaminación medioambiental (Formicki *et al.*, 2013). En los propóleos se encuentran Ca, Mg, K, Fe, Zn y presencia de elementos tóxicos como Cr, Cd, Pb, Ni y Cu. En realidad, algunas especies de plantas empleadas por las abejas son conocidas y bien caracterizados por su capacidad para acumular altos niveles de metales pesados en su biomasa. Ellos se clasifican como hiperacumuladores (Meers *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2006). Algunas fuentes probables de cadmio y las emisiones de plomo son industriales (Conti *et al.*, 2001; Falcó *et al.*, 2005).

Entre los datos bibliográficos del contenido de compuestos minerales en los propóleos encontramos en Argentina, Sosa-López *et al.*, (2000 a y b), publican estudios donde determinan calcio, magnesio, potasio, hierro y zinc en los propóleos de este país,

así como niveles de zinc dentro de un mismo apiario, encontrando que los contenidos en el interior de la colmena superaron a las recogidas en la piquera. Sales *et al.*, (2006), considera que existe menor contaminación con plomo cuando se usan mallas tipo mosquitero (Vázquez, 2010). Además, es conocido que los flavonoides tienden a formar complejos estables con elementos minerales divalentes como hierro, cromo, níquel, cobre o plomo (Havsteen *et al.*, 2002). Esta propiedad hace que estos elementos se acumulan en los propóleos y se convierten en contaminantes de los mismos (González-Martín *et al.*, 2015).

Por otra parte, la presencia de elementos tóxicos en los propóleos se asocia con la contaminación ambiental de origen antropogénico alrededor de los apiarios a través de diversas fuentes como el aire, el agua, las plantas y el suelo. Los metales pesados y los residuos de plaguicidas están entre los elementos potencialmente tóxicos que pueden encontrarse dentro de los propóleos. Formicki *et al.*, (2013) determinan los contenidos de níquel, cadmio, plomo, hierro, magnesio y zinc en los productos con propóleos y abejas recogidos en Polonia. Gong *et al.*, (2012), estudian el contenido de calcio, aluminio, magnesio, potasio, hierro, sodio, zinc, manganeso, estroncio, cobre, cromo, níquel y toxinas, como el arsénico, el cadmio y el plomo en muestras de los propóleos Chinos.

Parece existir una relación del origen de los propóleos, su composición y la contaminación ambiental. Pierini *et al.*, (2016), cuantifican el contenido de plomo en los propóleos argentino, Serra-Bonvehí *et al.*, (2013), determinan, entre otros, los niveles de arsénico, cadmio, mercurio y plomo en las muestras de los propóleos recogidas en el sur de España, y Finger *et al.*, (2014), estudian en Brasil el contenido de cadmio, en los propóleos. Además, González-Martín *et al.*, (2015), cuantifican los contenidos de Zn, Cr, Ni, Cu y Pb en los propóleos españoles y chilenos. Como reflexión, el contenido de minerales en los propóleos puede ser utilizado como un rasgo distintivo de las áreas geográficas donde se produce (Formicki *et al.*, 2013), como indicador de la contaminación ambiental (Cantarelli *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2012) y para el desarrollo de métodos fiables de trazabilidad (Pierini *et al.*, 2016). Los metales pesados se determinan habitualmente por absorción atómica y mediante la tecnología NIR en los propóleos (González-Martín *et al.*, 2015).

Pesticidas

Desde 1950 la producción agrícola ha ido aumentando continuamente a un ritmo que ha superado con creces el tan importante aumento de la población. Este incremento

se ha conseguido, principalmente, sin poner nuevas tierras en cultivo, sino aumentando el rendimiento por superficie, es decir, consiguiendo una mayor producción por cada hectárea cultivada. Dicho aumento de la productividad se ha desarrollado con la difusión de nuevas variedades de cultivo de alto rendimiento, unido a nuevas prácticas agrícolas que utilizan grandes cantidades de fertilizantes y pesticidas, así como tractores y otra maquinaria pesada. Los beneficios alcanzados por esta mejora agrícola son indiscutibles, pero han surgido diversos problemas entre los que destacan los daños medioambientales generados, incluyendo la erosión del suelo, la salinización y el anegamiento de suelos muy irrigados, el agotamiento de acuíferos, deforestación, etc. y la contaminación del medioambiente por el uso excesivo de pesticidas (Hernández, 2005).

La denominación de pesticidas o plaguicidas, incluye una amplia variedad de productos muy diferentes en su composición y propiedades a pesar de su utilización común. Para los fines del Codex Alimentarius (Comisión creada en 1963 por la Food and Agricultural Organization, FAO, y la Organización Mundial de la Salud, OMS o WHO, World Health Organization, pertenecientes a la ONU), se entiende por plaguicida o pesticida, “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el alimento o medicamentos para animales. Actualmente, se utilizan cada año en Europa cerca de 300.000 toneladas de pesticidas. Muchos de ellos presentan una alta toxicidad así como una gran persistencia y movilidad medioambiental, lo que los convierte en uno de los grupos de contaminantes más importantes. Se han detectado residuos de pesticidas en alimentos, aguas, suelos, fluidos biológicos, etc. (Dean *et al.*, 1996; Ahmed, 2001; Barr *et al.*, 2002; Berrada *et al.*, 2003) y en lugares tan remotos como la Antártida o el Ártico.

Por otro lado, el número de referencias existentes está creciendo cada vez más en cuanto a la presencia de insecticidas en los productos derivados de las abejas (Mullin *et al.*, 2010; Panseri *et al.*, 2014; Barbosa, *et al.*, 2015). Insecticidas, tales como organofosfatos, piretroides, carbamatos y organoclorados, se han encontrado en la miel y cera de abejas (Pareja *et al.*, 2011; Zhu, *et al.*, 2014; Niell *et al.*, 2015). Otras familias de

insecticidas, así como fungicidas y herbicidas, se han encontrado por (Mullin *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2014; Rodríguez-López *et al.*, 2014 y Stanley *et al.*, 2015). Sin embargo, el tipo más común de contaminantes que se encuentran en la miel, propóleos y cera son acaricidas, como coumafos, fluvalinato y chlorpheninfos, que suelen estar presentes en concentraciones superiores a los encontrados en la contaminación del medio ambiente. (Chauzat *et al.*, 2007; Mullin *et al.*, 2010; Serra-Bonvehí *et al.*, 2013; Al Nagggar *et al.*, 2015). Los residuos de insecticidas en los productos derivados de la colmena provienen de la contaminación producida por las prácticas agrícolas y la aplicación de plaguicidas en la colmena, por ejemplo, en el tratamiento contra la varroa (Adamczyk *et al.*, 2010; Serra-Bonvehí *et al.*, 2010; Niell *et al.*, 2015).

La determinación de estos tipos de contaminantes en los propóleos implica un procedimiento de extracción que incluye el uso de disolventes, tal como acetonitrilo, acetona o acetato de etilo, y la purificación adicional de extracto de las muestras a analizar, por lo general mediante el uso de espectrometría de masas de cromatografía de gases. Así se han determinado pesticidas organofosforados (Pérez-Parada *et al.*, 2011; Acosta-Tejada *et al.*, 2011; Medina-Dzul *et al.*, 2014), organoclorados (Chen *et al.*, 2009) y otros pesticidas tales como bifentrina, buprofezina, tetradifón y vinclozolina (Santana-Dos Santos *et al.*, 2008).

Sin embargo, no hay referencias existentes que informen de la aplicación de la tecnología NIR para la cuantificación de residuos de pesticidas en los propóleos.

Influencia de la zona geográfica sobre la composición química de los propóleos

En la actualidad es admitido y está químicamente demostrado que, en las zonas templadas de Europa, Norte América y regiones no tropicales de Asia, la principal fuente de los propóleos son los exudados de los brotes de las especies *Populus* y sus híbridos. Las investigaciones realizadas sobre la composición química de los propóleos recolectados en diferentes regiones, tales como Bulgaria, España, Francia, Gran Bretaña, Hungría y México, revelan que el origen de éstos es el mismo, y que su fuente principal son las secreciones de los álamos negros (*Populus nigra*) (Bankova, 2000). En Rusia se ha encontrado que las abejas colectan las resinas de los brotes de los abedules (*Betula verrucosa*). En Ucrania, las secreciones para la elaboración de los propóleos provienen de *B. verrucosa*, *P. nigra* y *Populus tremula*, mientras que en Mongolia provienen de *Populus suaveolens* (Bankova, 2000; Marcucci *et al.*, 2001). Así mismo, los estudios revelan que las muestras originarias de estas zonas se caracterizan por tener una

composición similar, siendo sus principales constituyentes los compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres (Bankova, 2000). Otros autores citan como menos frecuentes a *Eucalyptus spp.* Castaño Silvestre (*Aesculus hippocastanum*), Abedul (*Betula spp.*), Aliso (*Alnus spp.*), Olmo (*Ulmus spp.*), Acacia (*Robinia pseudoacacia*), Alerce (*Picea sp.*), Pino (*Pinus sp.*), Fresno (*Fraxinus sp.*), Cerezo (*Prunus avium*), Ciruelo (*Prunus domestica*), Abeto (*Abies sp.*), Sauce (*Salix spp.*), Roble (*Quercus spp.*), Acacia (*Gleditsia triacanthos*) (Koenig, 1985; Tomás-Barberén *et al.*, 1993 a y b; Bonvehí *et al.*, 1994). Se sabe que las colmenas ubicadas en bosques tienen mayor cantidad de los propóleos que las que se encuentran en otros sitios (Hegazi, 2000a).

En zonas tropicales, los propóleos contienen flavonoides análogos a las muestras europeas, pero a partir de plantas diferentes (Wollenweber *et al.*, 1997). Las investigaciones de Volpi *et al.*, (2006), han encontrado en extractos etanólicos de los propóleos de Argentina, Italia y España un perfil cromatográfico aproximadamente similar. Todos presentan una importante cantidad (49 %, 48 % y 39 % respectivamente) de pinocembrina y una variable, pero similar porcentaje de otros compuestos. Salatino *et al.*, (2005), afirman que la amplia diversidad en la composición de los propóleos revela que los últimos 15 años de investigación son escasos para realizar una evaluación completa de la potencialidad de los propóleos en las áreas químico-farmacológicas.

Estudios de los propóleos de diversas latitudes han demostrado que tanto su composición como su actividad biológica se encuentran directamente relacionadas con las especies vegetales, que visitan las abejas propolizadoras (Bankova, 2005b). Es por ello por lo que el origen botánico es crucial para la caracterización de los propóleos, la que también es afectada por las características geográficas y climáticas del sitio de recolección (Bankova *et al.*, 1998). La determinación del tipo de los propóleos en relación con su origen botánico debería ser el primer eslabón en la cadena de su control de calidad (Bankova *et al.*, 2000).

La zona central de Chile de donde proceden las muestras de este trabajo presenta un clima mediterráneo, en donde las lluvias caen cada año en la época de invierno y durante el verano hay una larga temporada de sequía. Este tipo de clima está presente en diversas partes del planeta, como, por ejemplo, el mediterráneo europeo, el suroeste de Australia, California, entre otros. (Hoffmann, 1998). Sin embargo, a pesar de la similitud del clima con el nuestro, los propóleos chilenos poseen un origen botánico diferente al de esas regiones, debido a que la flora de Chile se ha desarrollado como resultado del

aislamiento geográfico entre el Océano Pacífico y la cordillera de los Andes (Valcic *et al.*, 1998).

En muchos países ha sido posible asociar la composición química de los propóleos con la flora botánica (Chen *et al.*, 2007; Lozina *et al.*, 2010). Sin embargo, en España, en especial en Galicia y Castilla y León, donde existe una gran variedad de especies vegetales para la obtención de sus resinas, son escasos los estudios en este sentido.

Las zona geográfica parece ser la responsable de la composición química de los propóleos, se han encontrado más de 300 compuestos químicos en los propóleos de diversos orígenes (Castaldo *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2002). En la figura 17, se muestran los países y regiones de procedencia de los propóleos utilizados en esta investigación.

COMENTARIO Y ENFOQUE DE LOS RESULTADOS Y PUBLICACIONES.

1- RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN LOS PROPÓLEOS DE ESPAÑA Y CHILE. ENFOQUE DONDE SE UTILIZA LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CERCANA.

González Martín, María Inmaculada; Revilla Isabel, Vivar Quintana, Ana María; Betances Salcedo, Eddy Valentín: *Pesticide residues in propolis from Spain and Chile. An approach using near infrared spectroscopy*. En: *Talanta* 2017. Vol. 165. Pág. 533–539, doi: 10.1016/j.talanta.2016.12.061.

1.1. Antecedentes

Los productos naturales son las fuentes más demandadas por los seres humanos desde la antigüedad, ya sean por sus atributos alimenticios, como para la salud en sentido general. En este trabajo se analizan la existencia de residuos de pesticidas en las muestras de los propóleos crudos de España y Chile, mediante las técnicas de cromatografía GC-MS y espectroscopia infrarroja cercana (NIR). Como bien se conoce, la composición de los propóleos es muy compleja y variada en función de la diversidad de la zona geográfica, la temporada y el área de recolección (Bankova *et al.*, 2002; Gómez-Caravaca *et al.*, 2006). Las investigaciones en este campo están creciendo cada vez más en cuanto a la presencia de insecticidas en los productos derivados de las abejas (Mullin *et al.*, 2010; Panseri *et al.*, 2014; Barbosa *et al.*, 2015). Insecticidas, tales como organofosfatos, piretroides, carbamatos y organoclorados, se han encontrado en la miel y cera de abejas (Pareja *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2014; Niell *et al.*, 2015). Otras familias de insecticidas, así como fungicidas y herbicidas, también se han encontrado por (Mullin *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2014; Rodríguez-López *et al.*, 2014 y Stanley *et al.*, 2015).

Sin embargo, el tipo más común de contaminantes que se encuentran en la miel, propóleos y cera son acaricidas, como coumafos, fluvalinato y chlorphenvinfos, que suelen estar presentes en concentraciones superiores a los encontrados en la contaminación del medio ambiente. (Chauzat *et al.*, 2007; Mullin *et al.*, 2010; Serra-Bonvehí *et al.*, 2013; Al Naggar *et al.*, 2015), residuos de insecticidas en los productos derivados de la colmena provienen de la contaminación producida por las prácticas agrícolas y la aplicación de plaguicidas en la colmena, por ejemplo, en el tratamiento contra la varroa (Adamczyk *et al.*, 2010; Serra-Bonvehí *et al.*, 2010; Niell *et al.*, 2015).

La determinación de estos tipos de contaminantes en los propóleos exige un procedimiento de extracción que incluye el uso de disolventes, tal como acetonitrilo, acetona o acetato de etilo, y la purificación adicional de extracto de las muestras a

analizar, por lo general mediante el uso de espectrometría de masas de cromatografía de gas. Han sido determinados en propóleos pesticidas organofosforados (Pérez-Parada *et al.*, 2011; Acosta-Tejada *et al.*, 2011; Medina-Dzul *et al.*, 2014), organoclorados (Chen *et al.*, 2009) y otros tales como bifentrina, buprofezina, tetradifón y vinclozolina (Santana-Dos Santos *et al.*, 2008).

Sin embargo, hay pocos estudios que evalúan el potencial de la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) para el análisis cuantitativo de los propóleos, la espectroscopia de infrarrojo visible/Cerca (Vis/NIRS) se ha aplicado para el análisis de la crisina y galangina en los propóleos chinos (Nie *et al.*, 2013), o explorar su aplicabilidad para la determinación de propiedades antioxidantes (Cruz *et al.*, 2008). La detección de falsificación de propóleos por la adición de flavonoides glucósido y látex de árbol ha sido llevado a cabo con NIR-transformada de Fourier (Xu *et al.*, 2013). NIR también se ha utilizado para confirmar la identidad de los aislados de cera de abeja y propóleos (Hogendoorn *et al.*, 2013), y para cuantificar algunos minerales y oligoelementos en los propóleos crudo (González-Martín *et al.*, 2015).

No hay referencias existentes que informan de la aplicación de la tecnología NIR para la cuantificación de residuos de plaguicidas en los propóleos. La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) ha demostrado ser una técnica analítica rápida que no es destructiva y requiere poca o ninguna preparación de la muestra (Muller *et al.*, 2006). En este trabajo, el análisis de pesticidas en los propóleos crudo, procedente de España y Chile, se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Además, el uso de la espectroscopia NIR fue explorada inicialmente para la diferenciación de las muestras contaminadas o no contaminadas con triadimefon, y, posteriormente, para la determinación cuantitativa de este plaguicida en los propóleos crudo.

1.2. Objetivos

El objetivo del presente estudio es analizar si existe la presencia de residuos indeseables de pesticidas en los propóleos, por medio de cromatografía y comparar los resultados obtenidos con la tecnología de la espectroscopia en el infrarrojo de cercano (NIR) como herramienta para usar las distintas metodologías.

- Determinar la detención de residuos de pesticidas en los propóleos por medio de cromatografía GC-MS.

- Puesta a punto de nuevos métodos de análisis NIR que permitan determinar los pesticidas en los propóleos.
- Diferenciación de las muestras de propóleos contaminados con triadimefon.

1.3. Parte experimental

Se analizan 106 muestras de los propóleos crudos procedentes de España (Galicia (14) y (Castilla y León (33), Extremadura (1)), y Chile (Región Bio-Bio (58)). Se tritura cada muestra y se registra los espectros NIR con mucho cuidado, a una longitud de onda que va entre 1100-2000 nm, con datos tomados cada 2 nm.

Por último, se extrae la tintura de los propóleos por medio de metanol, ultrasonido, centrifugado, filtrado y diluido 1:100. Los extractos obtenidos fueron sometidos a un análisis cromatográfico GC-MS con el fin de conocer los perfiles cromatográficos de los residuos de pesticidas identificándose hasta encontrar 7 residuos de pesticidas, en función a las características espectrales y los picos cromatográficos (por orden de dilución: Triadimefon, Profam, Procimidona, Metazaclo, Folpet, Dicofol y Diclofluanida. Se registran las concentraciones que van desde 5-500 µl, esta área se vincula con la recta de calibrado para cada uno de estos residuos. Los resultados se expresaron en miligramos por kilogramos de los propóleos.

A partir de los datos cromatográficos y utilizando el método de regresión MPLS se optimizan los modelos para la determinación de pesticidas mediante NIR.

Para la discriminación de los propóleos contaminados y no contaminados con triadimefon se utiliza el método de reconocimiento de pautas prefijadas DPLS, para ello se usa la información espectral NIR de todas las muestras recogidas que constituyen el conjunto de entrenamiento, en este caso sin realizar ningún pretratamiento de los datos espectrales. El modelo se valida interna y externamente. El porcentaje de muestras correctamente clasificadas en las clases a las que pertenecen indica la bondad del modelo desarrollado.

1.4. Conclusión

Se ha puesto de manifiesto la presencia de residuos de pesticidas: Triadimefon, Profam, Procimidona, Metazaclo, Folpet, Dicofol y Diclofluanida en muestras de los propóleos crudos originarias de Chile y España (Castilla y León y Galicia). Se encuentran diferencias tanto en los pesticidas presentes como en los rangos de concentración de los pesticidas en las diferentes regiones. Se utilizó la espectroscopia de infrarrojo cercano

(NIR) con una sonda de fibra óptica de reflectancia remota para detectar y cuantificar el pesticida triadimefon en los propóleos. La ecuación desarrollada utilizando la tecnología NIRS permitió la cuantificación del pesticida triadimefon en muestras de los propóleos sin tratamiento o manipulación de las muestras en un amplio rango de concentración (0,74-42,17 mg/kg de los propóleos). El procedimiento tiene un excelente potencial para la determinación rápida y rentable del pesticida triadimefon en propóleos. Los resultados indican que la espectroscopia NIR podría convertirse en una alternativa a la cromatografía de gases.

Se detecta la presencia de triadimefon en propóleos, utilizando sólo los espectros NIR mediante el modelo DPLS. Se obtiene un coeficiente de correlación de 0,71, con un nivel de detección del triadimefon en las muestras de un 79%.

2- PREDICCIÓN DE FLAVONOIDES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PROPÓLEOS USANDO LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJO CERCANO.

Betances Salcedo, Eddy Valentín, Revilla Isabel, Vivar-Quintana, Ana María, González Martín, María Inmaculada. *Flavonoid and Antioxidant Capacity of Propolis Prediction Using Near Infrared Spectroscopy*. En: *Sensors* 2017, 17, 1647; doi:10.3390/s17071647.

2.1. Antecedentes

Son conocidos los beneficios desde la antigüedad de los propóleos como sustancias naturales producidas por las abejas *Apis melliferas* (Farré *et al.*, 2004; Dussart *et al.*, 2007; Pineda *et al.*, 2010). Estas sustancias de aspecto resinoso presentan un aroma dulce agradable y en función de la época en que es recolectada y su origen botánico difieren en color, sabor y consistencia, siendo quebradiza a bajas temperaturas y viscoso a temperaturas más altas, aspectos que influyen en sus propiedades (Alarcón, 1989; Farré *et al.*, 2004). Su composición química es muy compleja (Bankova, 2005), destacando la presencia de compuestos biológicamente activos tales como los polifenoles, en los que se incluyen los flavonoides, los ácidos fenólicos y sus ésteres (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

Esta variada composición presente en los propóleos, le confiere múltiples propiedades terapéuticas tales como, antioxidante, antimicrobiano (antibacteriano, antifúngico y antiviral), antiinflamatorio, antitumoral (citostático), cicatrizante, inmunestimulador, anestésico, antiulceroso, hipotensivo, anticariógeno, antialérgico y antiparasitario (Grange *et al.*, 1990; Marcucci, 1995; Kujumgiev *et al.*, 1999; Sforcin *et al.*, 2011). Son numerosos los trabajos que tratan de la determinación espectrofotométrica de los flavonoides en los propóleos como flavonas y flavonoles utilizando como referencia la quercetina o la rutina, aplicando el método propuesto por Bonvehí *et al.*, (1994) y que ha sido adaptado por otros investigadores Popova *et al.*, (2004) y Valencia *et al.*, (2012).

La determinación de las flavanonas y dihidroflavonoles en los propóleos mediante métodos espectrofotométricos (Nagy *et al.*, 1996), se basan en la reacción de dichos compuestos con 3,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) para obtener fenilhidrazona coloreada de color amarillo, utilizando la pinocembrina como referencia (Popova *et al.*, 2004 y Falcão *et al.*, 2013). En cuanto a la cuantificación individualizada de estos compuestos, se realiza

por cromatografía (García *et al.*, 1993; Hostettmann *et al.*, 1997; Popova *et al.*, 2004 y 2005).

En la determinación de la capacidad antioxidante en los propóleos crudos se puede realizar por diferentes métodos. Así, en numerosos trabajos se realiza la medida de la actividad inhibidora del radical ABTS, utilizando Trolox como referencia (Ahn *et al.*, 2007; Gülçin *et al.*, 2010; Graça *et al.*, 2010; Debbache *et al.*, 2014). De igual forma, la determinación de la capacidad antioxidante medida como actividad inhibidora del radical del ácido linoleico/ β -caroteno, utilizando el Trolox como método de referencia, se ha aplicado a la determinación en propóleos por los autores (Kumazawa *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2007; Chaillou *et al.*, 2006 y 2009; Oldoni *et al.*, 2011; Shimomura *et al.*, 2012).

Por otra parte, la espectrometría NIR podría ser un método eficaz y rápido para la determinación de la calidad de los propóleos, entre ellos, un estudio caracteriza los propóleos de Jalisco (México), mediante técnicas de espectroscopia UV-Vis fluorescencia-FTIR, considerando que el espectro FTIR cambia en función del área geográfica y de la estación del año (Delgado-Aceves *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha aplicado espectroscopia visible/ infrarrojo cercano para el análisis de crisina y galangina en los propóleos chinos (Nie *et al.*, 2013), para detectar adulteración con Poplar balata (Xu, *et al.*, 2013), para identificar cera de abejas en los propóleos (Hogendoorn *et al.*, 2013), para la determinación de la composición mineral (González-Martín *et al.*, 2015), la cuantificación del éster fenil del ácido cafeico o CAPE (Venegas *et al.*, 2015). Aplicaciones más recientes determinan de las características fenólicas, antioxidantes, del color y bactericidas de los propóleos crudos utilizando NIR (Revilla *et al.*, 2017).

2.2. Objetivos

El objetivo de este estudio fue desarrollar un método rápido para cuantificar en los propóleos, la composición de flavonas y flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles y la capacidad antioxidante por los métodos del ABTS y del ácido linoleico/ β -caroteno usando la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR) con una sonda de fibra óptica de reflectancia remota aplicada directamente a la muestra triturada de los propóleos, con muestras procedentes de España y Chile.

2.3. Parte experimental

Se analizan 99 muestras de los propóleos crudos procedentes de España ((Gállica (14) y (Castilla y León (33)) y Chile (Región Bio-Bio (52)). Las muestras se recolectan

por los apicultores en los años 2014-2015. En cada uno de los apiarios se recolectan por medio de malla, raspado, envasado, rotulado y refrigerado a una temperatura de -4°C . Después de ello se tritura cada muestra y se registra los espectros con mucho cuidado, a una longitud de onda que va entre 1100-2000 nm, con datos tomado cada 2 nm. A la matriz espectral obtenida se le aplica un análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de reducir su dimensión, con 6 componentes principales, se mantiene la variabilidad espectral en un 99%.

Por último, se extrae la tintura de los propóleos por medio de metanol, ultrasonido, centrifugado, filtrado y diluido 1:100. Los extractos obtenidos se llevaron a un espectrofotómetro para conocer la composición de las flavonas más flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles y la capacidad antioxidante por los métodos del ABTS y del ácido linoleico/ β -caroteno. Los resultados se expresaron en cada de las flavonas más flavonoles en relación a mg de rutina o quercetina/gr propóleos; flavanonas y dihidroflavonoles en mg de pinocembrina/gr propóleos; ABTS (% inhibición) y la del ácido linoleico/ β -caroteno (% inhibición).

Con los datos espectrofotométricos y los espectros NIR de las muestras de propóleos se construyen modelos para determinar los flavonoides y capacidad antioxidante mediante el método de regresión por Mínimos Cuadrados Parciales Modificado (MPLS).

2.4. Conclusión

A la vista de los resultados, podemos concluir que, la metodología NIR se puede utilizar para predecir el contenido total de flavonas y flavonoles, la suma de flavanonas y dihidroflavonoles y la actividad inhibidora del radical ABTS y la actividad antioxidante sobre la oxidación del ácido linoleico en los propóleos con valores comparables a espectrofotometría. Esta metodología es que puede ser aplicada a cualquier tipo de los propóleos desconocidos triturados de diferentes orígenes sin tratamiento previo y sin destrucción de las muestras, es decir, de la aplicación directa de la sonda de fibra óptica sobre la muestra.

CONCLUSIONES

En los últimos años se ha incrementado la demanda comercial del propóleo, producto apícola que resulta una alternativa interesante en el sector dado su alto valor económico. La composición del propóleo es muy compleja y variada en función de la diversidad fitogeográfica de las zonas de recolección, época del año, tipo y subespecie de *Apis mellifera*. Además, a los propóleos se les atribuye importantes propiedades beneficiosas para la salud, relacionadas con la actividad biológica del producto, proporcionadas principalmente por los compuestos fenólicos y flavonoides. En este sentido, la determinación de estas propiedades de una forma rápida y económica permitiría otorgarles a los propóleos de cada región un valor añadido basado en su capacidad biocida.

La definición de la calidad de los alimentos con gran valor añadido como los propóleos exige la búsqueda de métodos de análisis, lo más rápidos, objetivos y económicos posibles para la caracterización de este producto. Entre estos nuevos métodos se encuentra la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR); esta tecnología como técnica analítica tiene las ventajas de ser rápida, no destructiva, y que requiere escasa o nula preparación de la muestra, además de ser multiparamétrica y no requiere reactivo alguno.

Esta tesis se planteó como objetivo aplicar técnicas quimiométricas junto con la tecnología NIR para conocer la trazabilidad alimentaria y ayudar al sector apícola a identificar y proveer información de un producto como los propóleos de gran valor añadido.

Para llevar a cabo este objetivo se han analizado 106 muestras de propóleos crudos, procedentes de apiarios españoles y chilenos, recolectadas directamente por los apicultores. Se han determinado parámetros físico-químicos característicos de las propiedades biocidas de los propóleos (composición fenólica, composición mineral y capacidad antioxidante) así como la presencia de metales pesados y pesticidas.

Además de los propóleos crudos, se han analizado 31 muestras de preparados comerciales que contienen propóleo y que proceden mayoritariamente de España, Portugal y Chile, en menor proporción de Bélgica, Inglaterra y USA. Las formas de presentación estudiadas han sido pastillas, comprimidos, cápsulas, extractos y jarabes y caramelos. En estas muestras se ha analizado la presencia de metales pesados y pesticidas.

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto la presencia de residuos de pesticidas: Triadimefon, Profam, Procimidona, Metazacloro, Folpet, Dicofol y Diclofluanida en muestras de propóleo crudo encontrándose diferencias tanto en los pesticidas presentes como en los rangos de concentración de los pesticidas en las diferentes regiones. Respecto a los preparados comerciales se ha detectado la presencia de metales pesados como Cr, Ni, Cu, Zn y Pb, y plaguicidas como los fungicidas triadimefón, procimidona, diclofluanida, folpet, herbicidas como el metazacloro y acaricidas como el clorofensón.

La utilización de la tecnología NIRS permitió la cuantificación, en muestras de propóleos crudos triturados y sin manipulación previa, del pesticida triadimefon en el margen (0,74-42,17 mg/kg de propóleos). El contenido total de flavonas y flavonoles, la suma de flavanonas y dihidroflavonoles, la actividad inhibidora del radical ABTS y la actividad antioxidante sobre la oxidación del ácido linoleico, han podido predecirse con la utilización de esta tecnología. Así mismo se ha podido determinar los contenidos de 13 ácidos fenólicos y sus derivados con valores similares comparables a los obtenidos por métodos químicos, espectrofotométricos y HPLC.