

Composición mineral del propóleos y su comportamiento

Mineral composition of propolis and its behavior

Autor: Dailen Guanche Gallardo

Centro de Investigaciones Apícolas, Carretera de El Cano a El Chico Km/0, La Lisa, La Habana, Cuba; teléfono: 72020890/72020897,

investigadora@ciapi.minag.cu

Resumen:

El propóleos es un producto de la colmena formado por una mezcla compleja de sustancias naturales a la que se le atribuyen varias propiedades biológicas que se aprovechan en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Se encuentra compuesto por resinas, ceras, polen, aceites esenciales, residuos orgánicos y minerales. Existen pocos antecedentes en relación a la composición mineral del propóleos y su comportamiento en virtud de su origen geográfico de recolección o como indicador de contaminación ambiental. Este trabajo presenta una revisión acerca de los principales conceptos concernientes a los minerales, macro y micronutrientes, metales tóxicos y su importancia; la caracterización mineral del propóleo según la región natural o localidades geográfica, además, el propóleos como buen candidato para indicador biológico de contaminación debido a sus concentraciones de metales tóxicos, así como la diversidad de factores que afectan el contenido mineral del propóleos y los métodos analíticos más empleados para su estudio. Se puede concluir que el contenido mineral en propóleos resulta muy variable y depende de muchos factores que determinan su presencia y concentración. Además, se pudo ver que a pesar de la variedad de técnicas analíticas para cuantificarlos, las más empleadas son las de espectrometría de masa, aunque se recomienda un consenso para estudios exhaustivos y de comparación.

Palabras claves: propóleos, minerales, caracterización, indicador de contaminación, espectrometría de masa

Abstract:

Propolis is a bee products formed by a complex mixture of natural substances which is attributed various biological properties that are used in the food, pharmaceutical and cosmetic industry. It is composed of resins, wax, pollen, essential oils, organic waste and minerals. There are a few precedents in relation to the mineral composition of propolis and its behavior according to its geographic region of collection and its use as an ecological indicator of environmental pollution. This paper presents a review about the principal concept concerning to the minerals, macronutrients, micronutrients, toxic metals and their importance, the mineral content and its behavior according to natural regions, climatic conditions, geographic localities and botanical sources, also, the propolis as a good candidate for biological indicator of environmental deterioration due to its concentrations of toxic metals, as well as the diversity of factors that influence the mineral content of propolis, the relationship and the role they play with the concentrations found and most used analytical methods

for the determination of minerals in propolis, advantages and applications. It can be concluded that the mineral content in propolis is very variable and depends on many factors that determine its presence and concentration. Each propolis of each crop will have different mineral characteristics no matter where it comes from. The variability in the presence and concentration of trace and toxic metals in propolis could promote its use as an indicator of environmental pollution although the diversity of factors would make it difficult to locate the pollutant source when it is not as explicit as the case of industries and roads. In addition, it was possible to see that despite the variety of analytical techniques to quantify them, the most used are those of mass spectrometry, although a consensus is recommended for comprehensive and comparison studies.

Key words: propolis, minerals, characterization, pollution indicator, mass spectrometry

Introducción

Existe un consenso en la literatura científica acerca de qué es el propóleos. Es un producto de la colmena resinoso y complejo, con una variable apariencia física obtenido por las abejas mediante la adición de cera y secreciones salivares al material gomoso o balsámico, que recolectan de las hojas y grietas en la corteza de numerosas especies vegetales¹. Es utilizado como material de construcción y reparación en la colmena, como “arma química” contra los microorganismos patógenos proporcionando un ambiente inadecuado para el crecimiento de bacterias y otros microorganismos y como medio embalsamador de intrusos que han entrado a la colmena¹.

A esta sustancia se le atribuyen varias propiedades biológicas. La humanidad a lo largo de los siglos ha extendido y diversificado su empleo aprovechándolas en la industria alimenticia, farmacéutica (tanto en medicina humana como medicina veterinaria) y cosmética, usándola además como base para preparar otros productos igualmente comercializables y útiles en las diferentes industrias mencionadas. A este producto apícola se le han encontrado efectos antiinflamatorios^{2,3}, inmunomoduladores^{4,5}, hepatoprotectores^{6,7}, anticariogénicos^{8,9}, antimicrobianos^{10,11}, antioxidantes^{12,13} y antifúngicos¹⁴ entre otros.

El propóleos es una mezcla compleja de sustancias naturales que contiene una gran variedad de compuestos químicos. A pesar de que existe una amplia gama de literatura científica sobre los compuestos fenólicos^{15,16,17} y los terpenos y los ésteres¹⁵ que contienen como principios activos los propóleos de varios países que abarcan desde Europa, América del Sur y Asia, pocos de estos mismos han dedicado estudios exhaustivos a los elementos minerales que lo contienen.

Debe señalarse que la mayoría de los estudios no pretenden determinar la composición química completa, si no tan solo algunos de los elementos de interés, así como la cuantificación de los mismos. Si bien, la composición del propóleos es compleja y variada, se puede hacer una estimación de sus componentes más importantes: resinas 50 %; cera 30 %; polen 5 %; aceites esenciales 10 % y 5 % de otros residuos orgánicos como son los minerales¹⁸. Existen pocos antecedentes en relación a la composición mineral del propóleos y su comportamiento en virtud de su origen geográfico o como indicador de contaminación ambiental. Debido a que el propóleos tiene importantes

aplicaciones en la medicina y la industria alimenticia, es importante determinar cómo variables locales tales como las estaciones, los métodos de recolección, la vegetación y otros factores pueden influenciar en su composición mineral y subsecuentemente afectar sus propiedades biológicas y nutricionales. La escasa información en relación al contenido de metales y de métodos oficiales para la determinación de minerales de este producto hace necesaria la investigación en el tema.

Minerales

Un mineral es una sustancia natural, de composición química definida, normalmente sólido e inorgánico y que tiene una cierta estructura cristalina. Es diferente de una roca, que puede ser un agregado de minerales o no minerales y que no tiene una composición química específica. Estos pueden ser metálicos y no metálicos. Los primeros se caracterizan por ser buenos conductores de calor y electricidad, poseer alta densidad y ser sólidos a temperatura ambiente (excepto el mercurio). Sin embargo, no se encuentran como tales cuando constituyen parte del metabolismo de un ser vivo, se encuentran en forma de cationes disueltos en los líquidos corporales o unidos a otras moléculas. Los segundos no tienen brillo propio ni conducen electricidad¹⁹.

El cuerpo humano requiere alrededor de 20 minerales diferentes para su correcto funcionamiento. Estos minerales son indispensables para el mantenimiento de la vida, el crecimiento y la reproducción y pueden ser clasificados como macronutrientes o micronutrientes. Entre los macronutrientes podemos encontrar el calcio, magnesio, potasio, sodio, azufre, cloro y fósforo, mientras que por otro lado, como micronutrientes tenemos el cobre, zinc, hierro, selenio y manganeso²⁰.

El papel que desempeñan algunos de estos metales en el organismo es bien conocido. Por ejemplo, el calcio (Ca) forma parte de huesos, dientes y tejido conjuntivo, interviene en la transmisión nerviosa y la contracción muscular. El magnesio (Mg) interviene en el desarrollo de los huesos, la síntesis proteica y de ADN, en la transmisión del impulso nervioso y la relajación muscular, así como en el mantenimiento del equilibrio ácido-base. El potasio (K) participa en el equilibrio osmótico, la síntesis de proteína, en el metabolismo de carbohidratos, la permeabilidad de membrana y la transmisión nerviosa. El hierro (Fe) está ligado al transporte de oxígeno y dióxido de carbono, al proceso de respiración celular y esencial en la elaboración de hormonas y tejido conectivo. El manganeso (Mn) participa en la síntesis de ácidos grasos y hormonas sexuales y en la producción del cartílago. El sodio (Na) interviene en el equilibrio osmótico, la transmisión del impulso nervioso, en la permeabilidad de membrana, regulación de la presión arterial y volumen sanguíneo.

Por otro lado tenemos que el cobre (Cu) estimula el sistema inmunitario, el cromo (Cr) potencia la acción de la insulina, el selenio (Se) es un potente antioxidante, el zinc (Zn) interviene en el funcionamiento de ciertas hormonas, el cobalto (Co) interviene en la fijación de glucosa en tejidos y el níquel (Ni) potencia el crecimiento.

Un metal tóxico es aquel que tiene la capacidad de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo al entrar en contacto con él, incluso a bajas concentraciones. Por otro lado, el término "metal pesado" no está muy bien definido. A veces, se utiliza como criterio de densidad para determinar si un metal es pesado o no. Otras veces, el número atómico y el peso atómico son

los criterios empleados. Básicamente, son un grupo de elementos químicos cuya densidad es superior a cinco gramos por cm³.

Es muy importante dejar claro que no todos los metales pesados son tóxicos. Además, muchos son esenciales para la salud del ser humano en bajas concentraciones ya que permiten a nuestro cuerpo funcionar bien. Es el caso del cobalto, del hierro y del zinc. Sin embargo, una concentración elevada de estos metales pesados en nuestro organismo es a menudo perjudicial.

La mayoría de los autores para la investigación del contenido mineral del propóleo se descartan por dos vertientes fundamentalmente: su caracterización según la región geográfica de recolección y su empleo como marcador ecológico de contaminación ambiental.

Caracterización según la región geográfica

La caracterización según el origen geográfico resulta difícil ya que se ha visto que incluso dentro de una misma colmena el propóleo extraído de la piquera difiere en concentración mineral respecto al extraído del interior de la colmena²¹ no digamos entonces entre dos propóleos de regiones o localidades diferentes dentro de un mismo país.

No todas las variedades de abejas propolizan con la misma intensidad. Una misma colmena propolizará diferentes cantidades en distintas épocas y aún puede haber diferencias en las cantidades producidas en cada año, pues las abejas trabajan según sus necesidades y posibilidades²². La versatilidad del medio en que se encuentran las colmenas determina una variabilidad considerable de la concentración de sus minerales viéndose que, aunque mantienen los mismos minerales, las concentraciones de los mismos varían con la región.

El hecho de que la abeja salga de la colmena y emplee material foráneo para la producción del propóleo incluye una fuente sustancial de variables que determinen el contenido mineral del propóleo.

Se ha visto que aunque mantienen igual presencia mineral, las concentraciones de los mismos varían con la región. Ejemplo de ello es el estudio de Korn et al²³ que realizó una comparación del contenido de Ca, K, Mg y Fe en propóleos de diferentes estados de Brasil, un país exuberante en vegetación, con diferentes tipos de suelo, regiones naturales y condiciones climáticas, encontrando diferencias entre los distintos orígenes de las concentraciones de los mismos.

Şahinler et al²⁴ en muestras de propóleo de cinco regiones de Turquía encontró mayores concentraciones de Al, Cu, Cr y Mg en regiones del Mediterraneo, Ni y K en regiones del Mar Negro y Ba, Na, Zn y Ca en Anatolia Central demostrando la diversidad de la presencia y contenido mineral.

Resultados semejantes han encontrado otros autores como Salamanca et al²² en Colombia, Dogan et al²⁵ en Turquía, Gong et al²⁶ en China, Cantarelli et al²⁷ en Argentina y Bonvehi y Bermejo²⁸ en España.

Cabe esperar que si existen diferencias entre regiones y estados de un mismo país, también existan diferencias entre diferentes países y continentes. Souza et al²⁹ encontraron similitudes en las concentraciones de Ca, Na y Fe en propóleos brasileño comparado con el producido en el sur de España, mientras las concentraciones de Zn fueron relativamente bajas y Mg, K y Cu se encontraron dentro del mismo rango.

Países de América del Sur y Europa son los más representativos en el estudio de minerales en propóleos donde fundamentalmente la vegetación, los suelos y el clima son diferentes. Así pues, de la literatura analizada, tenemos que países

como Colombia, Chile, Brasil y Argentina son característicos de zonas tropicales y subtropicales mientras que otros como Serbia, Macedonia, Polonia, España, Rumania y Turquía son característicos de zonas templadas.

La composición del propóleo es determinada por varios factores como la localización geográfica, las fuentes botánicas, estación de recolección, razas de abejas, entre otras. Hay autores que han empleado herramientas estadísticas para estudiar la relación de las concentraciones de elementos minerales en muestras de propóleo que son cosechadas en diferentes regiones agrupándolas según zonas climáticas, colores, áreas de recolección u otras para ayudar a una mejor caracterización del producto.

Entre las herramientas estadísticas utilizadas con mayor frecuencia en la temática tratada se encuentran el análisis de componentes principales y el análisis de clúster empleadas para agrupar muestras de propóleo según la presencia y concentraciones de minerales encontrados.

Ejemplo de ello han sido los estudios de un grupo de investigadores²² que emplearon muestras de propóleo colombiano colectados en zonas climáticas diferentes (bosque húmedo tropical, bosque seco tropical, bosque húmedo premontano) sometidas a análisis de componentes principales resultaron en dos grupos de los que sugieren uno explicaría el origen fitogeográfico de las muestras mientras el otro se relacionaría con las condiciones de cosecha, formas de recolección, flora y tipo de suelo. El análisis de clúster les permitió por su parte agruparlos en nueve grupos según las concentraciones minerales.

Otro grupo de investigadores asiáticos²⁶ empleó estas herramientas estadísticas para agrupar muestras de propóleo de origen chino según el color y el origen geográfico determinando que muestras de color negro y verde oscuro son propóleos con altas concentraciones minerales especialmente Pb y Cd, mientras el amarillo y amarillo verdoso es escaso en muchos minerales. También encontraron que la concentración de minerales es mayor en propóleos chinos de climas monzónicos de zonas templadas y de zonas de clima continental templado y baja en zonas monzónicas subtropicales y zonas de clima de montaña alta.

Basado en el resultado de varios autores, los macroelementos más comunes y de mayor contenido son Ca, K, Mg y Na^{22, 25,28,30,32}.

De los elementos trazas el Fe y el Zn resultaron los más comunes y de mayor contenido^{22,25,28,30,31,32}.

Indicador biológico de contaminación

La contaminación ambiental ha incrementado conjuntamente con los químicos, la industria pesada y alimenticia, el desarrollo de la motorización y la agricultura intensiva. Cuando las materias primas, dígase néctar, polen y exudados de las plantas, son procesadas por las abejas, estos no se encuentran purificados o descontaminados y producto de ello, los contaminantes del aire, las plantas y suelos son transportados a las colmenas.

Siguiendo esta premisa se ha considerado que los productos de la colmena como el propóleo son buenos indicadores biológicos del deterioro químico del medio ambiente^{31,33}. Con el propósito de biomonitorizar muestras ambientales de esta clase mediante métodos analíticos factibles, se puede determinar la presencia de pesticidas o sus residuos, metales tóxicos y radioactivos así como contaminantes orgánicos.

Los metales pesados o minerales tóxicos son emitidos por fuentes naturales y antrópicas y dado que no son biodegradables, penetran en el ciclo biológico al

depositarse sobre el cuerpo o las patas de las abejas y ser trasladados a las colmenas con el polen o las resinas, o ser absorbidos por el néctar y el agua. Hay autores que plantean que el polen y el propóleo son los productos de la colmena con menos procesamiento en comparación con la miel y la cera y que por tanto reflejan mejor la contaminación ambiental evitando procesos como la bioacumulación o la toxicidad no inmediata³⁰. También se ha encontrado en estudios comparativos del contenido de metales trazas en propóleos y miel, que esta última contiene menor concentración de elementos trazas en comparación con el propóleo^{34,35}.

De los estudios de cuantificación de minerales en propóleos bruto se ha visto una incidencia de la presencia de metales tóxicos en su composición, ya sea en muy alta o baja concentración. Palacios et al³⁶ realizaron una comparación del contenido de metales pesados entre propóleos bruto de origen convencional y ecológico. Encontraron que, a pesar de las diferencias de origen, no hubo diferencias significativas en el contenido de metales (Pb, Ni y Cu), excepto el Cr, donde los convencionales obtuvieron una media significativamente mayor, detectándose que a pesar de provenir de apiarios ecológicos existe la presencia de metales pesados en este tipo de propóleos sugiriendo el estudio de otras fuentes de origen.

El Pb es uno de los elementos pesados más diseminados en el ambiente.

Existen varios estudios en los que se han encontrado concentraciones altas de este metal, considerando esta por encima de 1 mg/kg como recomienda la FAO para limitar sus uso en alimentación humana^{24,28,30,31, 32, 33, 36,37}.

Otros metales pesados que se han encontrado han sido el Cr, Ni, Cd y Zn^{22,24,31,32,33,36,37}.

Factores que afectan la concentración mineral

En la literatura científica consultada sobre esta temática existe el criterio unánime acerca de la diversidad de factores que influyen en el contenido mineral del propóleo. Además de los ya mencionados como las zonas geográficas, el origen botánico o la región climática, también cabe mencionar otros factores que contribuyen a cambios en los niveles minerales del propóleo como el procesamiento, preparación y almacenamiento durante la cosecha, el manejo de las colmenas, la utilización de acaricidas, repelentes, pesticidas y fertilizantes, cercanía a zonas industriales, caminos y carreteras, los tipos de suelos y eventos meteorológicos y de cambio climático.

Se ha hablado de los aportes de trazas metálicas por parte de los contenedores y el resto de las maquinarias e implementos mecánicos empleados en el procesamiento de las mieles como fuente de contaminación, pero no se han publicado iguales estudios en propóleos; aunque suelen hacerse extrapolaciones de estos sugiriendo que los productos de las colmenas suelen ser ácidos por naturaleza por lo que, tal como sucede en la miel, el almacenamiento del propóleo en contenedores galvanizados puede ser fuente de contaminación por Zn, partes basadas en acero pueden ser fuentes de Cr y componentes de latón fuentes de Zn y Cu^{33,38,39}.

Estudios como el llevado a cabo por Souza et al²⁹ mostraron que las estaciones del año y los métodos empleados para la cosecha del propóleo intervienen en la composición del contenido mineral en colmenas localizadas en la misma área de recolección de resina. Según estos autores las abejas recolectan resina de diferentes plantas a través de todo el año y estas varían la absorción de nutrientes según cada especie, desarrollo y condiciones climáticas lo cual

explicaría la diferencia estacional del contenido mineral. En cuanto a los métodos de recolección, atribuyen las variaciones al contenido de cera puesto que las condiciones de escasez de resina y el estímulo recibido por las abejas del colector de propóleos pueden causar que aumente el contenido de cera en la producción de propóleos influyendo en las concentraciones de minerales. A pesar de la variedad de factores que influyen en el contenido mineral y de las sugerencias de los autores acerca del papel que juegan en las concentraciones encontradas en los propóleos analizados, pocos y aislados estudios han sido publicados que analicen la relación del contenido mineral de esas fuentes con los contenidos minerales de los propóleos expuestos a ellas.

Bogdanova et al³³ en el 2017 publicó un estudio donde pretende dilucidar los factores que determinen el contenido mineral del propóleos cosechado en cuatro apiarios de la República de Macedonia y la conexión existente entre el contenido mineral del propóleos y el suelo en los cuales se encuentran estos apiarios. Los resultados arrojaron concentraciones de metales más altas en suelos de zonas bajas y cercanas al río en comparación con las zonas montañosas, siendo semejantes los resultados en el propóleos cosechado en apiarios de zonas bajas en comparación con las zonas montañosas. Los coeficientes de correlación del contenido metálico en suelo y propóleos resultaron desde muy fuerte hasta muy débiles demostrando que existe un grado de correspondencia de las concentraciones minerales halladas en los suelos con los propóleos cosechados en esas zonas.

Estudios como este darían una luz importante en cuanto a la caracterización de los propóleos según su región geográfica de origen y en cuanto a la utilización del propóleos como indicador ecológico de contaminación. La cuantificación de minerales en plantas, suelos y agua cercanos a los apiarios, ayudarían a determinar no solo la presencia de estos sino además su relación con los contenidos minerales presentes en muestras de propóleos cosechados en los mismos despejando incógnitas acerca de los posibles orígenes o fuentes.

Métodos Analíticos

Existen un grupo de investigaciones encaminadas a los métodos analíticos empleados para la determinación de minerales en propóleos. Las más comunes resultan en Espectrometría de Emisión con Plasma Inductivamente Acoplado y Detección Óptica (ICP-OES) y Espectrometría de Absorción Atómica (EAA), aunque se pueden encontrar estudios llevados a cabo mediante Espectrometría de Masas con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-MS)³⁶, Espectroscopia Cercano al Infrarrojo (NIR)⁴⁰ y Espectroscopia UV-Vis⁴¹. Ante la variedad de métodos empleados, sobresalen por sus ventajas y aplicabilidad los de espectrometría atómica.

El ICP-OES es una técnica que después de atomizar e ionizar las muestras genera espectros de emisión atómica cuyas intensidades son detectadas por el equipo, siendo proporcional la concentración del elemento en la muestra con la intensidad detectada. Tiene las ventajas de detectar casi la totalidad del sistema periódico con análisis simultáneos y de poseer intervalos lineales de concentración de varias decenas de órdenes. Dado la compleja composición del propóleos ha sido empleado para la determinación del contenido de macro y microelementos en propóleos crudos que difieren en color, origen botánico o geográfico^{24,26,28,33} y en la determinación del grado de acumulación de metales tóxicos en miel y propóleos de zonas industrializadas³¹.

La EAA es un método químico de analítica cuantificable cuyo principio es similar al ICP-OES solo que la intensidad a detectar corresponde al espectro de absorción atómica. Tiene las ventajas de ser muy sensible, con límites de detección bajos, es fácil de operar y necesita poca cantidad de muestra. Estas características lo hacen un método factible para el análisis del propóleo siendo empleada para determinar el contenido mineral del propóleo en Macedonia y establecer si existe una conexión entre el contenido mineral del suelo y este producto apícola³³. En Brasil se empleó para evaluar el efecto de la variación estacional y los métodos de recolección sobre el contenido mineral de propóleos²⁹ en tanto fue empleado en el análisis de muestras de diferentes regiones de Colombia²².

La predicción de elementos trazas por NIR en productos agrícolas ha sido reportada cada vez con menos frecuencia y siempre usado en el contexto de plantas. Pocos reportes se han encontrado que empleen este método para el análisis de macroelementos y trazas minerales⁴⁰. En un estudio en propóleos crudo aplicando este método analítico se comprobó su efectividad para la determinación de algunos minerales y elementos trazas tóxicos siendo aplicable a muestras con un amplio rango en contenido de Al, Ca, Fe, K, Mg, P, Zn, Cr, Ni, Cu y Pb⁴⁰.

Conclusiones

De la bibliografía consultada se puede concluir que el contenido mineral del propóleo resulta muy variable pues para ello intervienen muchos factores que determinan la presencia y concentración de estos en las muestras. Cada propóleo de cada cosecha tendrá características minerales diferentes, no importa si viene del otro lado del mar, de otra región o de la misma colmena. La variabilidad en la presencia y concentración de metales trazas y tóxicos podría promover su uso como indicador de contaminación ambiental; sin embargo el amplio rango de vuelo de las abejas y la diversidad de factores naturales y antrópicos pondrían difícil la localización de la fuente contaminante cuando esta no sea tan explícita como el caso de industrias y carreteras. Además, todavía quedarían pendientes los estudios donde se cuantifique el contenido mineral en agua, suelo, plantas y aire de los apiarios y zonas cercanas para establecer una relación con el contenido mineral del propóleo cosechado en estos y poder determinar si la contaminación de estas fuentes influye mucha, poca o de ninguna forma sobre este producto de la colmena. Por último, a pesar de la variedad de técnicas mediante las cuales se pueden cuantificar buena parte de los minerales, resultaría práctico un consenso en el uso de estas para estudios exhaustivo y posteriores comparaciones que permitan la mejor caracterización del propóleo y para ello una buena parte de las ventajas las llevan las técnicas de espectrometría atómica.

Declaración de conflicto de intereses

La autora del artículo declara no tener ningún tipo de conflicto de intereses, ni ninguna relación económica, personal, política, interés financiero ni académico que pueda influir en su juicio. Declara, además, no haber recibido ningún tipo de beneficio monetario, bienes ni subsidios de alguna fuente que pudiera tener interés en los resultados de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

1. Martínez J, García C, Durango D, Gil J. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Revista MVZ Córdoba*. 2012; 17(1): 2861-2869.
2. Gao W, Wu J, Wei J, Pu L, Guo C, Yang J, et al. Brazilian Green propolis improves immune function in aged mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2014; 55(1): 7–10.
3. Valenzuela-Barra G, Castro C, Figueroa C, Barriga A, Silva X, de las Heras B, et al. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 168:37-44.
4. Draganova-Filipova M, Nikolova M, Mihova A, Peychev L, Sarafian V. A pilot study on the immunomodulatory effect of Bulgarian Propolis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2010; 24(sup1): 119-124.
5. Búfalo MC, Bordon-Graciani AP, Conti BJ, de AssisGolim M, Sforcin JM. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2014; 66(10): 1497-504.
6. Nakamura T, Ohta Y, Ohashi K, Ikeno K, Watanabe R, Tokunaga K, et al. Protective Effect of Brazilian Propolis against Liver Damage with Cholestasis in Rats Treated with α -Naphthylisothiocyanate. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013; 2013 (9): 302720.
7. Almahdy A, Azlin N, Arifin H, Rivai H. Propolis Hepatoprotector Effect on Liver Damage of White Mice Induced by Valproic Acid. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Medicine*. 2018; 3(8): 1-12.
8. Santiago KB, Conti BJ, Cardoso EO, Golim MA, Sforcin JM. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. *Pathogens and Disease*. 2016; 74(8): 1-8.
9. Santiago KB, Piana GM, Conti BJ, Cardoso EO, Murbach BF, Zanutto MR, et al. Microbiological control and antibacterial action of a propolis-containing mouthwash and control of dental plaque in humans. *Natural Product Research*. 2018; 32(12): 1441-1445.

10. Palomino LR, Martínez JP, García CM, Gil JH, Durango DL.
Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el municipio de la Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 2010; 63(1): 5373-5383.
11. Torres AR, Sandjo LP, Friedemann MT, Tomazzoli MM, Maraschin M, Mello CF, et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonis caangustulas* stingless bees. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2018; 51(6): 7118.
12. Babatunde IR, Abdulbasit A, Oladayo MI, Olasile OI, Olamide FR, Gbolahan BW. Hepatoprotective and Pancreatoprotective Properties of the Ethanolic Extract of Nigerian Propolis. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 2015; 4(2): 102–108.
13. Guzmán-Gutiérrez SL, Nieto-Camacho A, Castillo-Arellano JI, Huerta-Salazar E, Hernández-Pasteur G, Silva-Miranda M, et al. Mexican Propolis: A Source of Antioxidants and Anti-Inflammatory Compounds, and Isolation of a Novel Chalcone and ϵ -Caprolactone Derivative. *Molecules*. 2018; 23(2): 334-350.
14. Palomino LR, Martínez JP, García CM, Gil JH, Durango DL.
Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 2010; 63(1): 5373-5383.
15. Machado CS, Mokochinski JB, de Lira TO, de Oliveira FC, Cardoso MV, Ferreira R, et al. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016; 9: 1-11.
16. Paula VB, Estevinho LM, Dias LG. Quantification of three phenolic classes and total phenolic content of propolis extracts using a single UV-vis spectrum. *Journal of Apicultural Research*. 2017; 56(5): 569-580.
17. Bankova V, Popova M, Trusheva B. The phytochemistry of the honey bee. *Phytochemistry*. 2018; 155,1–11.
18. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013: 13.

19. Latham MC. Nutrición humana en el mundo en desarrollo. [CD-ROM] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29. 2002.
20. Máhán KL y Escott-Stump S. Krause's food, nutrition & diet therapy. Philadelphia: Saunders, 11th ed.; 2004.
21. Sosa LA, Maidana JF, Bedacarrasbure EL, Subovsky MJ, Ramírez SS, Castillo AE. Determinación de cinc en propóleos del nordeste argentino. Congreso Internacional de Propóleos. Memorias. Buenos Aires. Argentina.2000.
22. Salamanca G, Ramírez C, Pubian LL. Composición mineral de algunas muestras de propóleo colombiano colectados por *Apis mellifera scutellata*. Apiservice. [serie en Internet] 2006. [citado 5 febrero 2019]; Disponible en: <https://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/736-composicion-mineral-de-algunas-muestras-de-propoleo-colombiano>.
23. Korn MGA, Guida MAB, Barbosa JTP, Torres EA, Fernandes AP, Santos JCC, et al. Evaluation of sample preparation procedures for trace element determination in Brazilian propolis by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and their discrimination according to geographic origin. *Food Analytical Methods*. 2013; 6(3): 872-880.
24. Şahinler N, Gül A, Şahinler S. Heavy metals and trace elements content of different propolis types. *European International Journal of Science and Technology*. 2017; 6(3): 21-25.
25. Dogan M, Silici S, Saraymen R, Ilhan IO. Element content of propolis from different regions of Turkey. *Acta alimentaria*. 2006; 35(1): 127-130.
26. Gong S, Luo L, Gong W, Gao Y, Xie M. Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. *Food Chemistry*. 2012; 134: 583–588.
27. Cantarelli MA, Camina JM, Pettenati EM, Marchevsky EJ, Pellerano RG. Trace mineral content of Argentinean raw propolis by neutron activation analysis (NAA): Assessment of geographical provenance by chemometrics. *LWT –FoodScience and Technology*. 2011; 44(1): 256-260.
28. Bonvehi J y Bermejo FJ. Element content of propolis collected from different areas of South Spain. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2013; 185(7): 6035-6047.

29. Souza EA, Zaluski R, Veiga N, Orsi RO. Effects of seasonal variations and collection methods on the mineral composition of propolis from *Apis mellifera* Linnaeus Beehives. *Brazilian Journal of Biology*. 2016; 76(2): 396-401.
30. Formicki G, Gren A, Stawarz R, Zysk B, Gal A. Metal Content in Honey, Propolis, Wax, and Bee Pollen and Implications for Metal Pollution Monitoring. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2013; 22(1): 99-106.
31. Roman A, Madras-Majewska B, Popiela-Pleban E. Comparative study of selected toxic elements in propolis and honey. *Journal of Apicultural Science*. 2011; 55(2): 97-105.
32. Totic S, Stojanovic G, Mitic S, Pavlovic A, Alagic S. Mineral composition of selected Serbian Propolis. *Journal of Apicultural Science*. 2017; 61(1): 5-15.
33. Bogdanova B, Karapetkovska V, Presilski S, Ali Shariati M, Najman S. Assessment of heavy metals in propolis and soil from the pelagonia región, republic of Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2017; 36(1), 23–33.
34. Matei N, Birghila S, Dobrinas S, Capota P. Determination of C vitamin and some essential trace elements (Ni, Mn, Fe, Cr) in bee products. *Acta Chimica Slovenica*. 2004; 51(1):169-175.
35. Dobrinas S, Matei N, Soceanu A, Birghila S, Popescu V. Estimation of vitamin C and Cd, Cu, Pb content in honey and propolis. *Scientific Study & Research*. 2006; 7(4): 729-734.
36. Palacios C, Gonzales I, Revilla I, Vivar A, Blanco MA, Escudero O, Coello MC. Contenido de metales pesados en muestras de propóleos ecológicos versus convencionales, estudios preliminares. *Actas del XI Congreso de SEAE: «Agricultura ecológica familiar»*; 2014, 1-4 octubre. Vitoria-Gasteiz (Álava).
37. Finger D, Filho IK, Torres YR, Quinaia SP. Propolis as an indicator of environmental contamination by metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2014; 92(3): 259-264.
38. Silici S, Uluozlu OD, Tuzen M, Soylak M. Assessment of trace element levels in *Rhododendron* honeys of Black Sea Region, Turkey. *Journal of Hazardous Materials*. 2008; 156(1-3): 612–618.

39. Pohl P, Sergiel I. Direct analysis of dark honeys for total content of copper and its fractionation forms, *Food Analytical Methods*. 2012; 5(1): 113–118.
40. González-Martín I, Escuredo O, Revilla I, Vivar-Quintana AM, Coello MC, Palacios-Riocerezo C, et al. Determination of the Mineral Composition and Toxic Element Contents of Propolis by Near Infrared Spectroscopy. *Sensors*. 2015; 15: 27854-27868.
41. Sales A, Álvarez A, Rodríguez M, Maldonado L, Marchisio P, Rodríguez M, et al. The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-vis. *Journal of Hazardous Materials*. 2006; 137(3): 1352–1356.