



Avances en el desarrollo de un biofungicida: caracterización físico-química y actividad antifúngica de propóleos

Cibanal I¹ , Fernández L^{1*} , Krepper G² , Pellegrini C¹ , Gallez L¹ 

¹Universidad Nacional del Sur, Departamento de Agronomía, Laboratorio de Estudios Apícola (LABEA). Calle San Andrés 800, Barrio Altos del Palihue, ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina.

²Universidad Nacional del Sur, Departamento de Química, Instituto de Química del Sur (INQUISUR). Calle Av. Alem 1253, ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina.

*Email: fernandezletic@yahoo.com.ar

Recibido: 25/06/2018 - Aceptado: 25/02/2019

Resumen

El propóleo constituye, gracias a sus propiedades antimicrobianas, una alternativa para el control de fitopatógenos. En este trabajo se realizó, mediante técnicas convencionales, la caracterización sensorial y físico-química de cuatro muestras de propóleos provenientes de diferentes regiones de Argentina y de sus respectivos extractos hidroalcohólicos. Asimismo, se evaluó in vitro la actividad antifúngica de los extractos sobre el hongo *Penicillium* sp. causante de la «mufa del ajo» (*Allium sativum*). Los propóleos en bruto presentaron aroma resinoso, coloración marrón con diferentes tintes y aspecto de trozos irregulares. El análisis de las muestras evidenció diferencias significativas en los parámetros ceras (9,43-31,16 %), pérdidas por calentamiento (1,04-1,46 %), cenizas (0,98-7,18 %) y temperatura media de fusión (63,16-67,5 °C). En los extractos hidroalcohólicos de propóleos también se detectaron diferencias estadísticas en el extracto seco (5,50-9,30 %), contenido de fenoles (23,44-53,91 mg eq gálico/g propóleos), flavonoides totales (11,23-15,88 mg eq quercetina/g propóleos) e índice de oxidación (2,25-4,33 segundos). Todos los tratamientos a base de extractos de propóleos tuvieron un efecto inhibitor superior al 99 % sobre el desarrollo de unidades formadoras de colonias fúngicas. Los resultados permiten concluir que, si bien los propóleos y extractos analizados en este trabajo presentaron diferentes características, coincidieron en la excelente actividad antifúngica sobre *Penicillium* sp. Esto demuestra la potencialidad de los propóleos para el desarrollo de un biofungicida de uso agrícola.

Palabras clave: *Apis mellifera*, biofungicida, fenoles, flavonoides, *Penicillium* sp.

Advances in the Development of a Biofungicide: Physical-Chemical Characterization and Antifungal Activity of Propolis

Summary

Propolis is a viable alternative for chemical control of plant pathogens due to its antimicrobial properties. The present study was conducted to determine the sensorial, physical and chemical characteristics of four propolis from Argentina, and their respective hydroalcoholic extracts. In vitro antifungal activity of hydroalcoholic propolis extracts against *Penicillium* sp. that cause the decay of garlic (*Allium sativum*) was also studied. All propolis samples were composed of irregular fragments. The aroma was mainly resinous. The predominant colour was brown. The analysis of the raw samples showed differences in the parameters wax content (9.43-31.16 %), loss by heating (1.04-1.46 %), ashes (0.98-7.18 %) and melting point (63.16-67.5 °C). The hydroalcoholic extracts of propolis also differ in the dry residue (5.50-9.30 %), content of phenols (23.44-53.91 mg eq galic/g propolis), total flavonoids (11.23-15.88 mg eq quercetin/g propolis) and oxidation index (2.25-4.33 seconds). The evaluation of the antifungal activity demonstrated that all the treatments containing propolis had an inhibitory effect over 99 % on fungi colony-forming units' development. Although the physical and chemical study showed significant differences between propolis samples, all exhibited excellent antifungal activity against *Penicillium* sp. This demonstrates the potential of different propolis for the development of a biofungicide for agricultural use.

Keywords: *Apis mellifera*, biofungicide, flavonoids, *Penicillium* sp., phenols

Introducción

El propóleo es un producto natural elaborado y utilizado por la abeja melífera (*Apis mellifera*) en la construcción, adaptación y protección de la colmena⁽¹⁾. Este material es duro y frágil si se encuentra frío, tornándose blando, flexible y pegajoso a medida que aumenta la temperatura⁽²⁾. Exhibe diferentes características debido a la variabilidad en su composición química, la que a su vez depende del origen geográfico, las fuentes vegetales y la época de recolección⁽³⁾⁽⁴⁾. Los principales componentes del propóleo son resinas y bálsamos (50 - 55 %), ceras (25 - 35 %), aceites aromáticos y etéreos (10 %), polen (5 %) y sustancias orgánicas y minerales (5 %)⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

El propóleo es valorado desde la antigüedad por su acción antioxidante, bacteriostática, antifúngica y por las diversas propiedades terapéuticas que posee, estando su actividad biológica directamente relacionada con los contenidos de fenoles y flavonoides⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾. Es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica, cosmética, veterinaria y alimentaria⁽¹¹⁾. En el ámbito agrícola, se ha reportado la acción antifúngica del propóleo sobre distintos hongos fitopatógenos⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾.

En Argentina se pueden encontrar diferentes tipos de propóleos, ya que a lo largo del territorio existen una gran

variedad de ambientes y especies vegetales⁽¹⁵⁾. Bedascarrasbure y otros⁽¹⁶⁾ consideran que, aun exhibiendo diferencias según la región, los propóleos argentinos presentan un elevado contenido de compuestos biológicamente activos. Estas características convierten a los propóleos en potencial materia prima para la elaboración de biofungicidas, herramientas promisorias para una agricultura de bajo impacto ambiental en numerosos cultivos de pequeña escala.

Con el fin de avanzar en el desarrollo de un biofungicida de uso agrícola, este trabajo tiene como objetivo caracterizar algunos parámetros relevantes de propóleos argentinos y su actividad antifúngica sobre el hongo fitopatógeno *Penicillium* sp., agente causal de la «mufa del ajo» (*Allium sativum*).

Materiales y métodos

Origen y caracterización de las muestras de propóleos

La información sobre el origen de las muestras de propóleos se resume en la Tabla 1. Dichas muestras fueron almacenadas al abrigo de la luz, a -15 ± 2 °C.

La caracterización sensorial de los propóleos en bruto se realizó mediante un panel de diez personas semientre-

Tabla 1. Identificación y características del lugar de origen de las muestras de los propóleos argentinos estudiados.

Muestra	M1	M2	M3	M4
Localidad y provincia de origen	Río Colorado, provincia de Río Negro (36°09'02"S 70°23'47"W)	Carmen de Patagones, provincia de Buenos Aires (40°47'S 62°58'W)	Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires (38°43'S 62°16'W)	Luján de Cuyo, provincia de Mendoza (33°01'S 68°52'W)
Año de recolección	2014	2015	2015	2012
Método de recolección	Raspado	Raspado y mallas plásticas matrizadas	Mallas plásticas matrizadas	Raspado y mallas plásticas matrizadas
Vegetación en cercanías del apiario	Álamos (<i>Populus</i> sp.), sauces (<i>Salix</i> sp.), manzanos (<i>Malus domestica</i>), durazneros (<i>Prunus persica</i>), perales (<i>Pyrus communis</i>)		Pinos (<i>Pinus</i> sp.), cipreses (<i>Cupressus</i> sp.), calocedros (<i>Calocedrus decurrens</i>), ciruelos de jardín (<i>Prunus cerasifera</i>), eucaliptos (<i>Eucalyptus</i> sp.)	Principalmente álamos (<i>Populus</i> sp.) y sauces (<i>Salix</i> sp.)
Observaciones	Donación de apicultores que vuelcan su producción de propóleos al circuito comercial		Procedente del apiario experimental del Laboratorio de Estudios Apícolas de la Universidad Nacional del Sur	Donación de apicultores que vuelcan su producción de propóleos al circuito comercial

nadas que describieron el aroma, color, sabor, sensaciones en boca, aspecto, consistencia e impurezas visibles. Para ello, partes representativas de las muestras se colocaron en frascos de vidrio codificados, con tapa a rosca y se mantuvieron a 25 ± 2 °C durante las 72 h previas a la evaluación⁽¹⁵⁾.

Para realizar la caracterización físico-química de las muestras, se evaluaron los siguientes parámetros según la metodología propuesta por la norma IRAM-INTA 15935-1 de Propóleos en bruto: contenido porcentual de ceras, pérdidas por calentamiento y cenizas⁽¹⁶⁾. Asimismo, se estudió el punto de fusión adaptando la técnica descrita por Chaillou y otros⁽¹⁷⁾. Para esto se utilizó un microscopio integrado a una platina de calentamiento con termómetro de mercurio, sobre el que se colocó una fracción representativa de propóleos molido en un portaobjetos. Se registró el rango de temperaturas desde el comienzo hasta el final de la fusión y se estableció la temperatura media de fusión como el promedio entre ambas mediciones.

Elaboración y caracterización de los extractos hidroalcohólicos de propóleos

A partir de cada muestra de propóleos se elaboró un extracto hidroalcohólico (EH). Para esto se colocaron 15,0 g de propóleos molido en 150,0 ml de alcohol etílico al 70 % en volumen. La mezcla se llevó a estufa a 40 ± 2 °C, con agitación continua durante 24 h, y la solución resultante se filtró con papel Whatman n.° 40 para retener impurezas. Los extractos obtenidos se conservaron en frascos color ámbar, en un lugar oscuro y fresco.

Los EH se caracterizaron de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-2 de Extractos de Propóleos⁽¹⁶⁾. Los parámetros medidos fueron: porcentaje de extracto seco, índice de oxidación, contenido de fenoles y flavonoides totales⁽¹⁸⁾. Las curvas de calibración para fenoles y flavonoides totales se hicieron con base en ácido gálico (98,0 % Sigma-Aldrich) y quercetina (95,0 % Sigma-Aldrich) respectivamente, y ambas mostraron coeficientes de regresión adecuados ($R^2 = 0,9975$; $R^2 = 0,9997$). Asimismo, se determinaron las absorbancias de cada extracto en un espectrofotómetro *Lambda 265 UV-VIS* utilizando cubetas de cuarzo⁽¹⁹⁾.

Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos de propóleos

Se realizó un ensayo para evaluar la actividad antifúngica de los extractos de propóleos sobre la germinación de conidios del hongo *Penicillium* sp. fitopatógeno de ajo.

Se siguió la técnica del envenenamiento del medio de cultivo⁽²⁰⁾ y se aplicaron siete tratamientos: cuatro correspondientes a los EH de propóleos descriptos (EH-M1, EH-M2, EH-M3, EH-M4); uno a base de un fungicida sintético comercial: Carbendazim SC 50 %, a razón de 2 mL.L⁻¹ según las especificaciones de la Guía fitosanitaria para el control de la mufa del ajo en la República Argentina⁽²¹⁾; un control del solvente de los EH (alcohol al 70 %), y un control negativo sin agregados.

Los distintos productos se mezclaron en cajas de Petri a razón de 1,5 ml en 20 ml de medio de cultivo para Hongos y Levaduras (Britania, Argentina) fundido y enfriado hasta 45 °C. Una vez solidificado el agar, se diseminaron sobre su superficie 100 µL de una suspensión de esporas de 1.10^5 conidios mL⁻¹ obtenida a partir de un cultivo monospórico y cuantificada con Cámara de Neubauer (Boeco, Alemania). Las cajas se incubaron a 25 ± 2 °C por 216 h. A las 72 y 144 h se cuantificó el número de conidios germinados presentes en cada tratamiento por observación directa bajo microscopio estereoscópico Nikon SMZ 745T⁽²²⁾.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con cuatro réplicas por tratamiento.

Análisis estadístico de los datos

Se evaluaron las diferencias en los resultados de las determinaciones físico-químicas y en la caracterización antimicrobiana mediante análisis de la varianza (ANAVA). Para la comparación de medias se utilizó el test de Tukey. Los análisis estadísticos mencionados se realizaron con el software Infostat⁽²³⁾.

Resultados

Los resultados de la caracterización sensorial de las muestras de propóleos en bruto se presentan en la Tabla 2a. En esta se observa que existe una gran similitud entre M1 y M2. El aroma dominante en las muestras del centro-sur de Argentina (M1, M2 y M3) fue el resinoso, mientras que M4 se diferenció por ser levemente químico. Todos los propóleos presentaron una coloración amarillada, con vetas amarillas, rojas o verdosas (Fig. 1). En cuanto al gusto, todas las muestras se percibieron amargas. La consistencia diferenció a M1, M2 y M4 (poco blandas) de M3 (dura). Los propóleos presentaron aspecto de trozos irregulares, siendo M1 y M2 opacos, M3 brillante y M4 ligeramente brillante. El contenido de

Tabla 2. Características sensoriales y físico-químicas de las muestras (a) y de los extractos hidroalcohólicos (b) de propóleos.

a. Muestra	M1	M2	M3	M4
Aroma	Resinoso, fuerte	Resinoso, fuerte	Resinoso, suave	Aromático, químico
Color	Marrón oscuro, amarillento	Marrón oscuro, amarillento	Marrón claro, rojizo, amarillento	Marrón claro, verdoso
Gustos y sensaciones en boca	Amargo, picante	Amargo, picante	Amargo	Amargo, picante
Consistencia	Poco blanda	Poco blanda	Dura	Poco blanda
Aspecto	Trozos irregulares	Trozos irregulares	Trozos irregulares	Trozos irregulares
Ceras (%)	31,16 ± 3,16 a	31,01 ± 2,85 a	9,43 ± 0,84 b	23,36 ± 3,08 a
Pérdidas por calentamiento (%)	1,22 ± 0,10 ab	1,46 ± 0,04 a	1,43 ± 0,23 a	1,04 ± 0,06 b
Cenizas (%)	1,93 ± 0,01 a	6,35 ± 0,83 b	0,98 ± 0,96 a	7,18 ± 0,44 b
Temperatura media de fusión (°C)	67,33 ± 0,57 a	63,16 ± 0,28 b	67,5 ± 0,76 a	63,5 ± 1,04 b
b. Extractos hidroalcohólicos	EH-M1	EH-M2	EH-M3	EH-M4
Extracto seco (%)	7,87 ± 0,42 a b	6,60 ± 0,60 a	9,30 ± 0,11 b	5,50 ± 0,30 a
Contenido de fenoles (mg eq gálico/g propóleos)	28,64 ± 0,17 a	24,25 ± 0,88 a	53,91 ± 1,76 b	23,44 ± 4,86 a
Flavonoides totales (mg eq quercetina/g propóleos)	15,88 ± 0,42 a	12,55 ± 0,85 b	15,62 ± 0,59 a	11,23 ± 0,57 b
Índice de oxidación (s)	2,33 ± 0,57 a	3,00 ± 1,00 a b	2,25 ± 0,57 a	4,33 ± 0,50 b

En las determinaciones físico-químicas, cada dato es la media de 4 repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales no son estadísticamente diferentes ($p=0,05$), según la prueba de Tukey.

impurezas visibles fue inferior al 5 % en todas las muestras, encontrando entre ellas astillas de madera, restos de panales y partes de abeja.

Los resultados de la caracterización físico-química de las muestras de propóleos se presentan en la Tabla 2a. En relación al contenido de ceras, M3 presentó valores significativamente menores que las otras muestras. Las pérdidas por calentamiento se encontraron en el rango de 1,04 a 1,46 %. Las determinaciones de cenizas y de la temperatura media de fusión diferenciaron estadísticamente a M1 y M3 de M2 y M4. Los rangos de temperaturas desde el comienzo hasta el final de la fusión (máximos y

mínimos) de las muestras fueron: 61-73 °C para M1, 56-70 °C para M2, 64-71 °C para M3 y 62 - 65 °C para M4.

En la Tabla 2b se muestran los resultados de los análisis efectuados a los extractos hidroalcohólicos de propóleos. EH-M3 se destacó por presentar el valor más alto en las determinaciones de extracto seco y contenido de fenoles. La variable flavonoides totales diferenció a EH-M1 y EH-M3, por sus valores estadísticamente superiores, de EH-M2 y EH-M4. En cuanto al índice de oxidación, los extractos presentaron valores en el rango de 2 a 5 segundos.

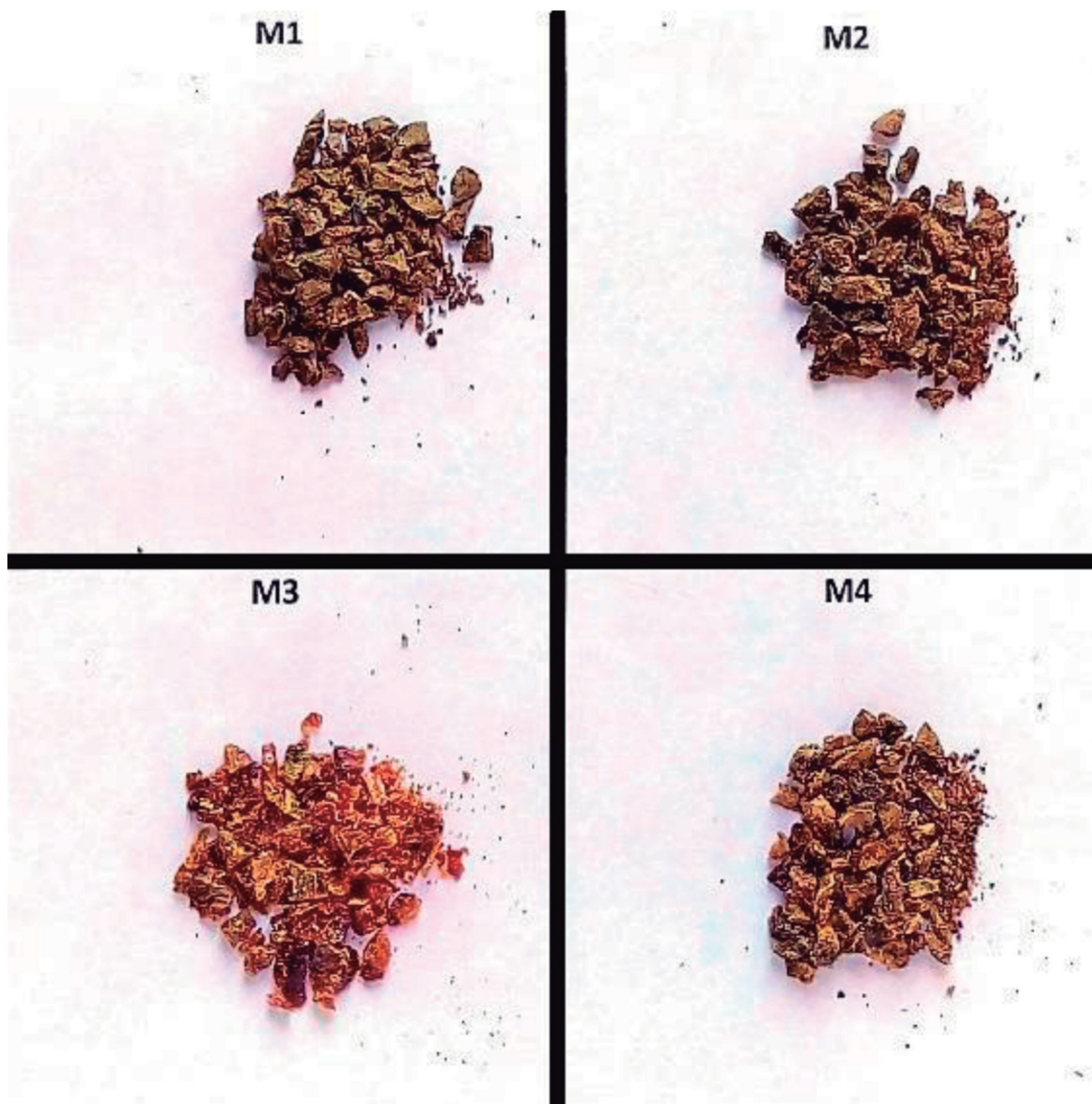


Figura 1. Muestras de propóleos (M) argentinos estudiados: Río Colorado (M1), Carmen de Patagones (M2), Bahía Blanca (M3), Luján de Cuyo (M4).

Los análisis del espectro de absorción UV-Vis se presentan en la Figura 2. Todos los EH exhibieron un perfil de absorción con una banda amplia entre 240 nm y 340 nm, con máximos cercanos a los 290 nm y una banda levemente insinuada entre los 320 y 330 nm. Los picos más elevados correspondieron a EH-M1 y EH-M3.

En el ensayo in vitro (Fig. 3), los tratamientos a base de extractos de propóleos mostraron un menor número de conidios germinados y se diferenciaron estadísticamente ($p < 0,05$) de los demás. Las colonias fúngicas que se desarrollaron luego de las 72 h en EH-M4 presentaron una morfología diferente al testigo y menor diámetro.

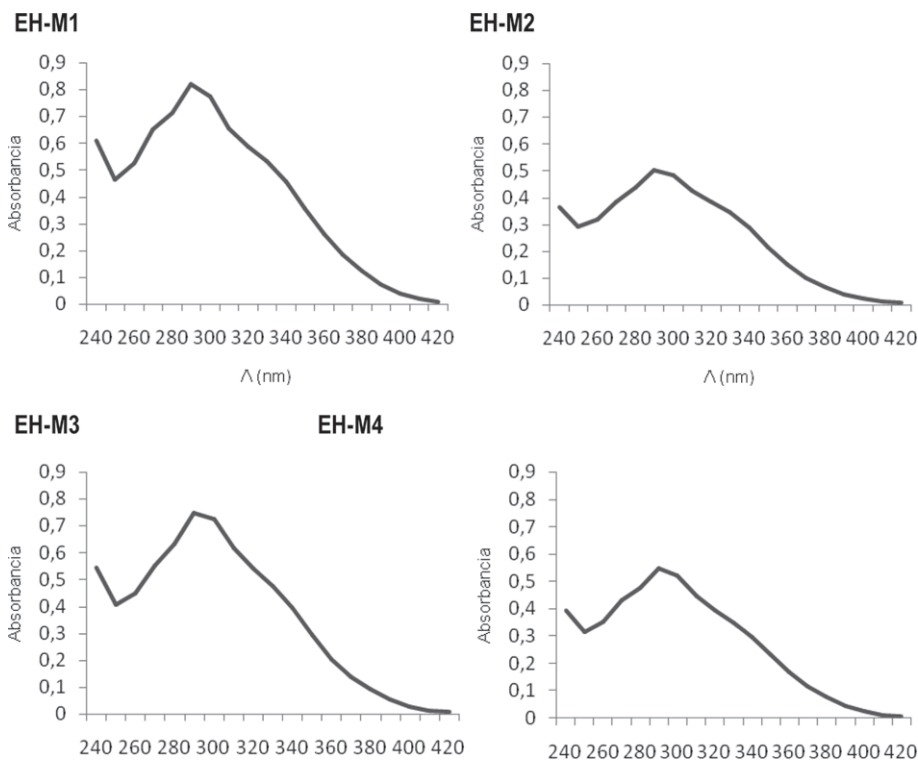


Figura 2. Espectro UV-VIS de los extractos hidroalcohólicos de propóleos estudiados: Río Colorado (EH-M1), Carmen de Patagones (EH-M2), Bahía Blanca (EH-M3), Luján de Cuyo (EH-M4).

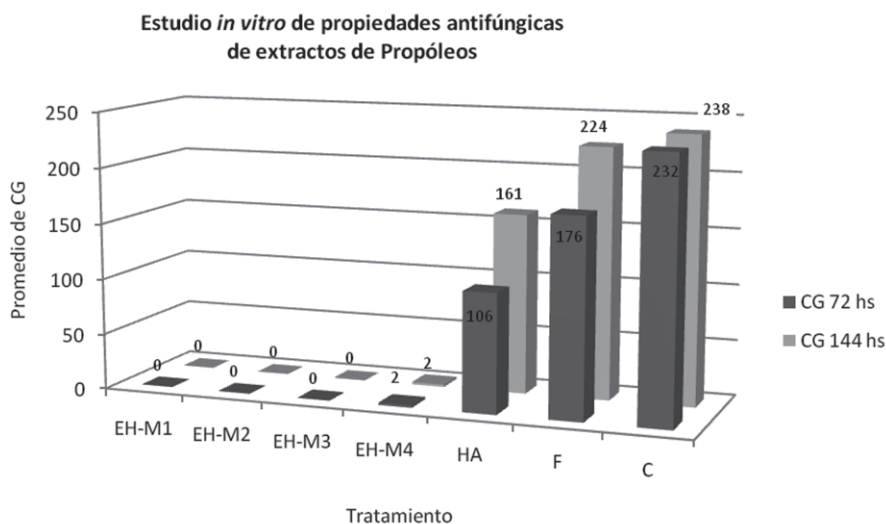


Figura 3. Estudio in vitro de propiedades antifúngicas de cuatro extractos hidroalcohólicos de propóleos (EH), de un fungicida comercial (F), de un control hidroalcohólico (HA) y de un control sin agregados (C). Recuento de conidios germinados (CG) a las 72 h y a las 144 h de iniciado el ensayo.

Discusión

Los resultados del estudio sensorial (Tabla 2a) fueron consistentes con las descripciones reportadas en la bibliografía internacional, donde se menciona que las características de los propóleos de distintas regiones geográficas dependen de las resinas utilizadas en su elaboración⁽⁷⁾⁽²⁴⁾. La semejanza que presentaron M1 y M2 es atribuible a un origen botánico similar y a una relativa cercanía geográfica (Tabla 1). La presencia de brillo y la dureza de M3 podrían deberse a la abundancia de especies coníferas en el entorno del colmenar. Estas observaciones fueron similares a las de Días y otros⁽²⁵⁾, quienes encontraron que las muestras cuyo origen botánico incluía *Pinus* sp. presentaron una consistencia más dura que las que provienen de *Populus* sp.

La fracción ceras carece de compuestos fenólicos y de otras moléculas bioactivas, no obstante, su determinación resulta de interés, ya que un alto contenido de ceras indicaría un bajo contenido de resinas⁽²⁶⁾. Todas las muestras analizadas en este trabajo presentaron valores comprendidos dentro de la tolerancia establecida por la norma IRAM-INTA 15935-1 de propóleos de Argentina (Tabla 2a), que fija un máximo del 35 % en peso. La muestra M3 se destacó por su bajo contenido de ceras, mientras que M4 presentó valores cercanos a los reportados por distintos autores⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾. El mayor contenido de ceras de M1 y M2 podría ser atribuido al método de cosecha utilizado y a la disponibilidad de resinas en la flora cercana al apiario (Tabla 1). De acuerdo con Vázquez⁽³⁰⁾, el uso de mallas plásticas matrizadas, a diferencia de lo que ocurre con el raspado, evita la adición accidental de otros materiales al propóleo durante la recolección. Agra da Silva y otros⁽³¹⁾ mencionaron que las abejas adicionan mayor cantidad de ceras al propóleo cuando la oferta de resinas vegetales es baja.

Las pérdidas por calentamiento cuantifican fundamentalmente la evaporación de agua. El contenido de humedad es determinante en la preservación de los propóleos, ya que el exceso de agua puede conducir a reacciones de hidrólisis de las moléculas bioactivas y favorecer el crecimiento de microorganismos⁽³²⁾. Los valores de las muestras analizadas en este trabajo (Tabla 2a) fueron inferiores a los obtenidos por otros autores⁽¹⁶⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾. Esto podría deberse a que provienen de regiones áridas y a que el período de almacenamiento en un ambiente seco fue relativamente largo.

En cuanto al contenido de cenizas, las muestras M1 y M3 presentaron porcentajes bajos, inferiores al 2 % (Tabla 2a), y cercanos a lo reportado por distintos autores⁽¹⁵⁾⁽³⁵⁾. Los valores de M2 y M4 fueron notablemente más elevados. Angulo Vaca⁽³⁶⁾ encontró porcentajes superiores al 6 % y los atribuyó a que en determinadas ocasiones las abejas adicionan lodo, maderas, etc., al propóleo para brindarle mayor consistencia.

La consistencia del propóleo a temperatura ambiente es una característica valorada desde el punto de vista comercial. La mayoría de las muestras pasan al estado líquido entre los 60 y 70 °C⁽¹⁷⁾⁽³⁷⁾, tal como se observó en nuestro estudio (Tabla 2a). Es destacable que muestras con temperaturas medias de fusión muy similares (M1-M3 y M2-M4) presentaron diferente amplitud en los rangos de fusión.

El extracto seco de todas las soluciones hidroalcohólicas de propóleos analizadas fue inferior al 10 % de peso en volumen (Tabla 2b), valores cercanos a los reportados por otros autores que utilizaron el mismo solvente⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾. En este sentido, Talero y otros⁽³⁹⁾ describen que las extracciones con etanol al 70 % muestran valores promedio de extractos secos menores a los obtenidos con etanol al 96 %. Esto contribuye a explicar que los resultados de este estudio estén por debajo de los umbrales establecidos por las normas para extractos etanólicos de Argentina y de Brasil, que fijan un mínimo del 10 y 11 %, respectivamente. La elección de hidroalcohol queda respaldada por los estudios de Da Silva Frozza y otros⁽⁴⁰⁾, Miguel y otros⁽⁴¹⁾ y Woisky y Salatino⁽⁴²⁾, que indican que este extractante es capaz de solubilizar fenoles y distintos compuestos bioactivos en cantidades considerables, siendo menos tóxico que otros solventes.

Los fenoles y flavonoides del propóleo son los mayores responsables de su actividad biológica⁽⁴³⁾. Los resultados del contenido de fenoles y de flavonoides totales de EH-M1, EH-M2 y EH-M4 (Tabla 2b) fueron acordes con los reportados por otros autores⁽¹⁷⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾. El extracto EH-M3 se diferenció y se destacó por su elevado contenido de fenoles, que podría atribuirse a la gran diversidad de especies forestales presentes en cercanías del apiario que pudieron ser fuentes de resinas de M3⁽⁴⁶⁾. Si bien estos valores no son directamente comparables con las normas para extractos etanólicos, los niveles obtenidos en los propóleos analizados fueron notablemente superiores al mínimo establecido por las normas de Argentina y Brasil, que es del 0,25 % para ambos parámetros.

Los índices de oxidación (Tabla 2b) fueron inferiores a los resultados reportados por otros autores para extractos de distintos orígenes⁽¹⁵⁾⁽³⁶⁾. Este parámetro es uno de los indicadores de la calidad del propóleo, ya que mantiene una relación inversamente proporcional al contenido de compuestos fenólicos⁽⁴⁷⁾.

La espectrofotometría UV (Fig. 2) permitió confirmar la presencia de compuestos fenólicos en los extractos. Las curvas fueron similares a las obtenidas por Bedascarrasbure y otros⁽¹⁹⁾ para propóleos de las mismas regiones.

Los resultados del ensayo in vitro referido al control de *Penicillium* sp. (Fig. 3) mostraron que bajo la aplicación de los extractos hidroalcohólicos de propóleos la germinación de conidios de este hongo fitopatógeno es menor, pese a las diferencias físico-químicas presentes entre los mismos. En este sentido, Bankova⁽⁴⁸⁾ y Kujumgiev y otros⁽¹⁰⁾ sostienen que las propiedades biológicas de los propóleos suelen ser similares, a pesar de tener un origen botánico diferente.

Las diferencias observadas entre el número de conidios germinados de los extractos y el control de hidroalcohol confirman que la actividad antifúngica observada es atribuible al propóleo y no al extractante.

Conclusiones

Los propóleos analizados en este trabajo presentaron diferentes características sensoriales y físico-químicas, sin embargo, coincidieron en la excelente actividad antifúngica sobre el hongo *Penicillium* sp. Los resultados demuestran la potencialidad de diversos propóleos para el tratamiento y control de fitopatógenos. Esto permitiría avanzar hacia el desarrollo de biofungicidas agrícolas formulados a base de propóleos.

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». Además, agradecemos al Dr. Fernando López por la asistencia brindada durante las distintas determinaciones.

Contribución de los autores

C.I. participación en el diseño y realización de todo el trabajo, ya sea la caracterización físico-química, así como el ensayo microbiológico, procesamiento estadístico, análisis de resultados y redacción del manuscrito.

F.L. participación en el diseño del ensayo microbiológico, redacción del manuscrito.

K.G. contribución en el procesamiento de muestras para la caracterización físico-química.

P.C. participación en la interpretación de resultados, redacción y corrección final del manuscrito.

G.L. participación en la interpretación de resultados, redacción y corrección final del manuscrito.

Bibliografía

- 1) Ghisalberti EL. Propolis: A review. *Bee World*. 1979;60:59-84.
- 2) Marcucci MC. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995;26(2):83-99.
- 3) Bankova V, De Castro S, Marcucci MC. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000;31(1):3-15.
- 4) Peña RC. Estandarización en propóleos: Antecedentes químicos y biológicos. *Cienc Investig Agrar*. 2008;35(1):17-26.
- 5) Pietta PG, Gardana C, Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*. 2002;73(1):7-20.
- 6) Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:697390.
- 7) Wagh VD. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Sci*. 2013; 2013: 308249.
- 8) Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*. 1998; 36:347-63.
- 9) Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol*. 1991;35(1):77-82.
- 10) Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva YU, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins. *J Ethnopharmacol*. 1999;64(3):235-40.
- 11) Dos Santos Pereira A, Seixas FRMS, De Aquino Neto FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova*. 2002;25(2):321-6.

- 12) Ali A, Cheong CK, Zahid N. Composite effect of propolis and gum arabic to control postharvest anthracnose and maintain quality of papaya during storage. *Int J Agric Biol.* 2014;16(6):1117-22.
- 13) Gallez L, Kiehr M, Fernández L, Delhey R, Stikar D. Antifungal activity *in vitro* of propolis solutions from Argentina against two plant pathogenic fungi: *Didymella bryoniae* and *Rhizoctonia solani*. *J Apic Res.* 2014;53(4):438-40.
- 14) Matny ON, Abdul-Karim EK, Naemah RA, Al-Ani RA. Activity of propolis and *Boswellia* sp. resins extract against *Sclerotinia sclerotiorum* causative agent of white rot disease of *Phaseolus vulgaris* and *Daucus carota* under storage conditions. *JEBAS.* 2014;2(1):65-71.
- 15) Lozina LA, Peichoto ME, Acosta OC, Granero GE. Estandarización y caracterización organoléptica y físico-química de quince propóleos argentinos. *Lat Am J Pharm.* 2010;29(1):102-10.
- 16) Bedascarrabure E, Maldonado L, Fierro Morales W, Álvarez A. Propóleos. Tucumán: Editorial Magna; 2006. 218 p.
- 17) Chaillou LL, Herrera HA, Maidana JF. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Cienc Tecnol Aliment.* 2004;24(1):11-5.
- 18) Bianchi EM. Calidad del propóleos. Santiago del Estero: Editorial CEDIA; 1996. 35 p.
- 19) Bedascarrabure E, Maldonado L, Álvarez A, Rodríguez E. Contenido de fenoles y flavonoides del propóleos argentino. *Acta Farm Bonaerense.* 2004;23(3):369-72.
- 20) Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016;6(2):71-9.
- 21) Guía de Productos Fitosanitarios. Buenos Aires: CASAFE; 891 p.
- 22) Tian SP, Bertolini P. Effects of low temperature on mycelial growth and spore germination of *Botrytis allii* in culture and on its pathogenicity to stored garlic bulbs. *Plant Pathol.* 1995;44(6):1008-15.
- 23) Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat [Internet]. Version 2010. Córdoba: InfoStat Group; 2012 [cited 2019 Mar 11]. Available from: <http://www.infostat.com.ar/>.
- 24) Fontana JD, Adelman J, Passos M, Maraschin M, de Lacerda CA, Lanças FM. Propolis: Chemical Micro-Heterogeneity and Bioactivity. In: Walker JM, Spencer JFT, Ragout de Spencer AL, editors. *Environmental Microbiology: Methods and Protocols.* Totowa (NJ): Humana Press; 2004. pp. 203-218. (Methods in Biotechnology; 16).
- 25) Días LG, Pereira AP, Estevinho LM. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(12):4246-53.
- 26) Figueiredo FJB, Días-Souza MV, Nascimento EA, Lima LD. Physicochemical characterization and flavonoid contents of artisanal Brazilian green propolis. *Int J Pharm Sci.* 2015;7(3):64-8.
- 27) Lacalle A. Propoleo, el «antibiótico» natural de la colmena. *Sustrai.* 2008;85: 56-61.
- 28) Palomino García LR, Martínez Galán JPM, García Pajón CM, Gil González JH, Durango Restrepo DL. Caracterización físico-química y actividad antimicrobiana del propóleos en el municipio de la unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía.* 2010;63(1):5373-83.
- 29) Sousa JP, Furtado NAJC, Jorge R, Soares AE, Bastos JK. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacogn.* 2007;17(1):85-93.
- 30) Vázquez JC. Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícola I-Cuenca del Salado, Pcia. de Buenos Aires [doctoral's thesis]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Ciencia Animal; 2010. 211 p.
- 31) Agra da Silva R, Evangelista Rodrigues A, Marcucci Ribeiro MC, Ramalho Custódio A, Domingues Andrade NE, Esfrain Pereira W. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Cienc Rural.* 2006;36(6):1842-8.
- 32) Martínez Galán JP. Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño [master's thesis]. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2009. 102 p.
- 33) Bonvehí JS, Coll FV. Study on propolis quality from China and Uruguay. *Z Naturforsch.* 2000;55:778-84.
- 34) Sosa López A, Subovsky MJ, Castillo AE, Ramírez SS, Rolin H, Oviedo B. Calidad de los propóleos de la Provincia de Misiones [Internet]. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste; 2000 [cited 2019 Mar 11]. Available from: http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/5_agrarias/a_pdf/a_030.pdf.
- 35) Funari CS, Ferro VO. Análise de própolis. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2006;26(1):171-8.
- 36) Angulo Vaca JB. Caracterización y actividad antioxidante de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de Chimborazo utilizados en la empresa Apicare-Riobamba [grade's thesis]. Riobamba (EC): Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias; 2014. 111 p.
- 37) Krell R. Value-added products from beekeeping [Internet]. Rome: FAO; 1996 [cited 2019 Mar 11]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm#con>.
- 38) Bastos EMFA, Galbiati C, Loureiro EM, Scoaris DO. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2011;63(5):1255-9.
- 39) Talero C, Hernández D, Figueroa J. Calidad microbiológica de propóleo crudo y sólidos solubles de extractos de propóleos de *Apis mellifera* en Colombia. *Rev Med Vet Zoot.* 2012;59(2):109-18.

- 40) Da Silva Frozza CO, García CSC, Gambato G, de Souza MDO, Salvador M, Moura S, Dellagostin OA. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol.* 2013;52:137-42.
- 41) Miguel MG, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM, Antunes MD. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(12):3418-23.
- 42) Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res.* 1998;37(2):99-105.
- 43) Mărghita^o LA, Dezmirean DS, Bobi^o OX. Important developments in romanian propolis research. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:159392.
- 44) Choi YM, Noh DO, Cho SY, Suh HJ, Kim KM, Kim JM. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology.* 2006; 39(7):756-61.
- 45) Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(11):3482-5.
- 46) Bankova V, Marcucci MC. Standardization of propolis: Present status and perspectives. *Bee World.* 2000;81(4):182-8.
- 47) Yoong Kuffó AM. Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya [grade's thesis]. Zamorano (HN): Carrera de Agroindustria; 2004. 50 p.
- 48) Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005;2(1):29-32.