



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Efecto herbicida de extractos de propóleos de distinto
origen geográfico de Argentina sobre la germinación de
lechuga (*Lactuca sativa* L.)**



Alumno: Pfeif Fernando Darío
Directora: Dra. en Agronomía Cibanal Irene Laura

Bahía Blanca 2024

Fecha de defensa oral: 20 de diciembre del 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Efecto herbicida de extractos de propóleos de distinto origen geográfico de Argentina sobre la germinación de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Tesis presentada como requisito para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

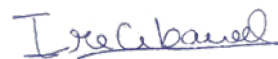
Alumno: Pfeif Fernando Darío

Directora: Dra. en Agronomía Cibanal Irene Laura

Docente Consejero: Dra. en Biología Calfuan Melina Lorena



Firma del Alumno/a



Firma del Director/a

Título abreviado: Efecto herbicida de propóleos argentinos sobre la germinación de lechuga



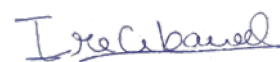
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Herbicidal effect of propolis extracts from different
geographical origins of Argentina on lettuce
(*Lactuca sativa* L.) germination**

Bachelor's Thesis in Biological Sciences



Student's Signature



Advisor's Signature

Short title: Herbicidal effect of argentine propolis on lettuce (*Lactuca sativa* L.) germination

AGRADECIMIENTOS

Conseguir culminar mi carrera fue posible, en gran parte, gracias al apoyo de Rodolfo Perata y su familia. Su apoyo indirecto, mediante sus negocios de gastronomía, me permitió obtener el trabajo que me sostuvo económicamente y me dio la oportunidad de dedicarme a lo que realmente me apasiona.

Quiero hacer un especial reconocimiento a mis compañeros de trabajo y encargados, quienes durante todos estos años me apoyaron en la difícil tarea de estudiar y trabajar al mismo tiempo, en particular a Mario Vecchi, quien no perdía oportunidad de recordarme “nunca dejes de estudiar”.

Un profundo agradecimiento a mi novia, por siempre interesarse en escuchar cada conocimiento que iba adquiriendo clase a clase, y por compartir conmigo una misma meta.

Por su invaluable guía, agradezco a mi docente consejera, quien me ayudó a superar todos los trámites y dudas que el plan de estudios implicaba.

A mi directora de tesis, por brindarme acompañamiento constante a lo largo del desarrollo de este proyecto final, guiándome con paciencia y dedicación en cada etapa del proceso.

Agradezco, con todo respeto, a los miembros del jurado evaluador, por poner a mi disposición su tiempo, en revisar y corregir esta tesina.

A mis compañeras de carrera, Rosario Cuppari y Tatiana Golovca, por su predisposición y ayuda durante la realización del ensayo.

Con gratitud, también quiero mencionar a Antonio Garayalde, asesor estadístico que contribuyó con el análisis de los numerosos resultados.

Finalmente agradezco, a todo el personal del Laboratorio de Estudios Apícolas, por hacerme sentir bienvenido y brindarme el material, los insumos y las instalaciones para realizar los ensayos de esta tesina.

Mil gracias, de corazón, a todos los que hicieron posible que hoy esté aquí, alcanzando esta meta que alguna vez pareció lejana, por haber desempeñado un papel fundamental y esencial en este logro, cuya importancia llevaré siempre conmigo.

Bendecido más que nunca, me siento verdaderamente listo y preparado para aplicar todos los conocimientos que he adquirido a lo largo de esta experiencia formativa.

Inmensamente agradecido cierro este ciclo, con un profundo aprecio por quienes me acompañaron en el camino, y con entusiasmo me dispongo a enfrentar los nuevos desafíos que están por venir, en mi camino profesional y personal.

Resumen

El propóleo es un producto elaborado por las abejas (*Apis mellifera* L.) a partir de resinas y exudados vegetales, en cuya composición se encuentran diversos compuestos, por ejemplo, del grupo de los fenoles, que le otorgan numerosas propiedades bioactivas. Dentro de estas se han documentado efectos fitoinhibidores y fitotóxicos sobre las plantas que podrían ser de interés para su aplicación como bioherbicida. El propóleo se presenta, por lo tanto, como un producto promisorio para la agricultura con potencial para el control de malezas. En este contexto, el objetivo general de esta tesina fue caracterizar y evaluar la acción herbicida de diez propóleos provenientes de distintas regiones de Argentina sobre la germinación de una especie modelo, la lechuga (*Lactuca sativa* L.).

A partir de cada propóleo en bruto se prepararon extractos hidroalcohólicos que fueron caracterizados por espectrometría UV-VIS para confirmar cualitativamente la presencia de compuestos fenólicos. Luego, estos se desolventizaron hasta obtener el extracto seco de cada muestra, que fue retomado con agua destilada estéril (ADE) para elaborar extractos acuosos de propóleos. A partir de cada uno de estos últimos, se elaboraron cuatro tratamientos de diferentes concentraciones de propóleos (100 %, 75 %, 50 % y 25 %) con ADE. La osmolaridad y la actividad herbicida de los tratamientos se evaluó, junto a un control con ADE, aplicándolos en forma de riego a germinadores con semillas de lechuga. Luego de cinco días de incubación, se contabilizó el número de semillas germinadas, diferenciando plántulas normales de defectuosas, y se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación respecto del control. El ensayo siguió un diseño en bloques completos al azar, con diez réplicas de diez semillas cada una. Se realizó el análisis de la varianza y cuando se detectaron diferencias significativas se aplicó el test de comparaciones de medias de a pares de Fisher.

Los resultados mostraron que todas las muestras de propóleos poseían compuestos fenólicos. En cuanto al bioensayo, se determinó que todos los tratamientos a base de este producto, en al menos una de las dosis probadas, inhibieron significativamente ($p < 0,05$) la germinación de la lechuga. A su vez, se encontraron diferencias entre tratamientos según la procedencia del propóleo y las dosis utilizadas, confirmando que tanto el origen del propóleo como la concentración del extracto influyen en su efectividad. A modo general, se observó una tendencia a que las soluciones con dosis más altas de este producto fueron las más efectivas para inhibir la germinación de las semillas y afectar negativamente el crecimiento y el desarrollo de las plántulas, generando una mayor proporción de plántulas defectuosas. Respecto a estas últimas se destaca que presentaban deformaciones severas como hipocótilos retorcidos, radículas cortas y cotiledones pálidos.

Se concluye, por lo tanto, que el propóleo podría ofrecer una alternativa viable y natural para el control de malezas gracias a sus propiedades bioherbicidas. Será fundamental realizar estudios adicionales para optimizar su aplicación en distintos contextos agrícolas.

Palabras clave: bioherbicida, bioactivo, fenoles, fitoinhibitorio, fitotoxicidad

Abstract

Propolis is a product made by bees (*Apis mellifera* L.) from plant resins and exudates. Its composition includes various compounds, for example, phenolic compounds, which give it numerous bioactive properties. Among these, phytotoxic and phytoinhibitory effects on plants have been documented, which could be of interest for its application as a bioherbicide. Propolis is therefore presented as a promising product for agriculture with potential for weed control. In this context, the general objective of this thesis was to characterize and evaluate the herbicidal action of ten propolis samples from different regions of Argentina on the germination of lettuce (*Lactuca sativa* L.).

Hydroalcoholic extracts were prepared from each raw propolis and characterized by UV-VIS spectrometry to confirm the presence of phenolic compounds. Subsequently the dry extract was obtained and aqueous propolis extracts (APE) were prepared with sterile distilled water. Four treatments with different APE concentrations (100%, 75%, 50%, and 25%) were prepared. The osmolarity and herbicidal activity of the treatments were evaluated, alongside a control with sterile distilled water. The herbicidal activity assay consisted of applying the treatments as irrigation to germinators containing lettuce seeds. After five days of incubation, the number of germinated seeds was recorded, quantifying normal seedlings from defective ones, and the germination inhibition percentage was calculated. The experiment followed a randomized complete block design with ten replicates of ten seeds each. Analysis of variance was performed, and significant differences were analyzed using Fisher's Least Significant Difference Test.

The results showed that all propolis samples contained phenolic compounds. Regarding the herbicidal assay, all propolis-based treatments, at least at one of the tested doses, significantly inhibited ($p < 0.05$) lettuce germination. Differences were also found between treatments depending on the origin of the propolis and the doses used, confirming that both the source of the propolis and the extract concentration influence its effectiveness. In general, higher-dose solutions of this product tended to be the most effective at inhibiting seed germination and negatively affecting seedling growth and development. The defective seedlings exhibited severe deformations, such as twisted hypocotyls, short radicles, and pale cotyledons.

It is therefore concluded that propolis could offer a viable and natural alternative for weed control thanks to its bioherbicidal properties. Further studies will be essential to optimize its application in different agricultural contexts.

Keywords: bioherbicide, bioactive, phenolic compounds, phytoinhibitory, phytotoxicity

Índice

Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	7
1.1. Propóleos: origen, composición y propiedades	7
1.2. Recolección y estandarización del propóleos.....	8
1.3. Aplicaciones del propóleos en agricultura y su potencial como bioherbicida	9
1.4. Los metabolitos secundarios vegetales y su rol en la actividad bioherbicida del propóleos.....	10
1.5. Hipótesis y objetivos	11
2. Materiales y métodos	12
2.1. Origen de las muestras brutas de propóleos	12
2.2. Elaboración y caracterización de extractos de propóleos.....	14
2.3. Formulación y caracterización de tratamientos para el bioensayo sobre actividad herbicida del propóleos.....	15
2.4. Bioensayo de actividad herbicida de propóleos sobre la germinación, el crecimiento y el desarrollo de plántulas.....	16
2.5. Diseño experimental y análisis de datos del bioensayo sobre actividad herbicida del propóleos	18
3. Resultados	19
3.1. Caracterización de extractos de propóleos	19
3.2. Caracterización de los tratamientos utilizados en el bioensayo sobre actividad herbicida del propóleos.....	21
3.3. Bioensayo de actividad herbicida de propóleos sobre la germinación, el crecimiento y el desarrollo de plántulas.....	22
4. Discusión.....	29
4.1. Caracterización de extractos de propóleos	29
4.2. Caracterización de los tratamientos utilizados en el bioensayo sobre actividad herbicida del propóleos.....	30
4.3. Bioensayo de la actividad herbicida de propóleos sobre la germinación, el crecimiento y desarrollo de plántulas.....	31
4.4. Potencial del propóleos en la agricultura	33
5. Conclusión.....	34
6. Bibliografía	35

1. Introducción

1.1. Propóleos: origen, composición y propiedades

El propóleos es un producto elaborado por las abejas (*Apis mellifera* L.) a partir de resinas y exudados de ciertas especies botánicas, tales como los sauces (*Salix* sp.), los álamos (*Populus* sp.) y los pinos (*Pinus* sp.). Las abejas recolectan estas sustancias utilizando su primer par de patas y las mandíbulas, para luego mezclarlas con secreciones salivales enzimáticas propias y así formar el propóleos (Anjum *et al.*, 2019). A este material lo emplean en la construcción y adaptación de las colmenas, por ejemplo, para sellar grietas, recubrir y aislar las superficies internas del habitáculo. Por otro lado, también es utilizado como agente protector de la colonia, ya que evita la descomposición de cadáveres de animales invasores, e inhibe la proliferación de bacterias y hongos. Esto resulta fundamental para la “inmunidad social” de las abejas, ya que en el reducido espacio físico de la colmena habitan entre 40.000 y 80.000 individuos, con una temperatura de 35 °C promedio y una humedad relativa que varía entre 40 % y 60 %, lo que constituye un ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos (Simone-Finstrom y Spivak, 2010).

El propóleos presenta una apariencia resino-cerosa, y su color puede variar entre el verde, amarillo, marrón y rojo, dependiendo de su origen geográfico y de las plantas de las que proviene. Sus características físicas cambian con la temperatura: es duro y quebradizo si se encuentra frío, y se vuelve suave, flexible y pegajoso cuando se calienta. En cuanto a su composición, contiene en general un 50 % de resinas, un 30 % de ceras, un 10 % de aceites esenciales, un 5 % de polen, y un 5 % de compuestos orgánicos diversos. Entre los más de 300 componentes identificados en el propóleos, se destacan los polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres), ácidos benzoicos, alcoholes, ácidos cinámicos, hidrocarburos sesquiterpénicos, triterpénicos, minerales, esteroides, azúcares y aminoácidos. Los flavonoides, como la galangina, pinocembrina, crisina y tectocrisina, junto con ácidos fenólicos como el ácido cafeico y el ácido ferúlico, son los compuestos bioactivos que le confieren propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, inmunoestimulantes, hepatoprotectoras, herbicidas y citotóxicas, entre otras (Wagh, 2013).

Las mencionadas cualidades son conocidas por el ser humano desde tiempos inmemorables. Los egipcios lo utilizaban para embalsamar los cuerpos de los faraones, mientras que los médicos griegos y romanos lo empleaban para tratar heridas y como desinfectante bucal. En la Europa del siglo XVII fue reconocido en farmacopeas oficiales y durante la Segunda Guerra Mundial se usó en clínicas soviéticas para el tratamiento de la tuberculosis. En la actualidad, el propóleos es un producto popular en todo el mundo, disponible en forma pura o combinada con otros productos naturales, en preparados de venta libre, cosméticos y como ingrediente de alimentos saludables (Bankova *et al.*, 2021).

1.2. Recolección y estandarización del propóleo

El apicultor cuenta con diferentes técnicas para recolectar propóleos. Una de las más conocidas es el raspado manual, que implica quitarlo de las áreas donde las abejas lo depositan, como los bordes de los cuadros, las esquinas y la cara interna del techo de la colmena. Para esto, se utiliza una espátula o raspador. Si bien este método no requiere equipamiento especial, puede dañar la estructura de la colmena y existe el riesgo de mezclar el propóleo con cera, madera o restos de abejas.

Otro método comúnmente utilizado son las mallas plásticas ranuradas, que se colocan en la parte superior de los cuadros de la colmena. Las abejas tienden a sellar las ranuras con propóleos y una vez que la malla está llena, se retira y se congela. De esta forma el propóleo se vuelve quebradizo y se desprende fácilmente, reduciendo las probabilidades de contaminación (Anjum *et al.*, 2019).

El propóleo en bruto, tal como se extrae de la colmena, no suele utilizarse industrialmente debido a su estructura compleja. En su lugar, se realiza una extracción con un solvente líquido que permite la disolución de sus componentes bioactivos. Debido a que este material es relativamente insoluble en agua, por poseer resinas más bien apolares, el etanol, metanol, cloroformo y éter, son las sustancias más utilizadas que permiten disolver, extraer y purificar las principales moléculas de interés. Idealmente, la elección del solvente y del procedimiento de extracción deben adaptarse a la composición química particular de cada muestra para mantener la efectividad de sus propiedades biológicas y lograr extractos de alta calidad (Bankova *et al.*, 2021).

Tal como se mencionó previamente, las características y composición del propóleo varían significativamente según su origen geográfico, las condiciones climáticas imperantes en la zona del colmenar y las fuentes botánicas disponibles en su entorno. Estas variaciones impactan directamente en su actividad biológica. Si bien algunas sustancias del grupo de los fenoles, ácidos aromáticos y ácidos diterpénicos son comunes en todas las muestras, y determinan las propiedades características de este producto, otros compuestos específicos pueden estar presentes solo en propóleos derivados de ciertas plantas y áreas. En este sentido, numerosos estudios han evidenciado que muestras recolectadas en distintas regiones, incluso dentro de un mismo país, pueden contener diferentes compuestos bioactivos (Anjum *et al.*, 2019; Ghisalberti, 1979). Por ejemplo, en propóleos de Egipto se han identificado ésteres del ácido cafeico, así como alcoholes grasos de cadena larga, incluidos el tetradecanol, hexadecanol y dodecanol. Estos compuestos, que derivan del álamo negro (*Populus nigra* L.), forman parte de la cutícula de las plantas, actuando como barrera protectora frente a fitopatógenos (Bankova *et al.*, 2000). En Brasil, el propóleo proveniente de la resina foliar de la chilca (*Baccharis dracunculifolia* DC.) contiene altos niveles de artepilina C, molécula derivada del ácido cinámico, compuesta por un anillo aromático, dobles enlaces y grupos carboxilo e hidroxilo (Lima, 2018). El propóleo cubano, derivado de copey (*Clusia rosea* Jacq.), contiene como distintivo benzofenonas polipreniladas, compuestos que pueden neutralizar los radicales libres y proteger a las células del estrés oxidativo (Anjum *et al.*, 2019; Castelo, 2018).

Uno de los principales desafíos en la investigación y aplicación del propóleo, cuya demanda mundial está en aumento, es su estandarización. De hecho, su uso en diversas industrias se ve limitado por su compleja variabilidad química y biológica (Peixoto *et al.*, 2022). Esto plantea la necesidad de desarrollar métodos estandarizados que aseguren la calidad, la seguridad y la eficacia de los distintos extractos de propóleos. La estandarización no solo permite una mejor comparación de resultados en investigaciones futuras, sino que también, facilita la regulación y el control en la producción industrial (Esposito *et al.*, 2021). No obstante, la variabilidad y la complejidad de la composición del propóleo puede ser vista como una ventaja, ya que esta variación combina naturalmente diferentes mecanismos y modos de acción, lo que evita el desarrollo de resistencia en organismos blanco (Almuhayawi, 2020). Por otro lado, permite explorar un amplio espectro de propiedades útiles para diversas aplicaciones (Anjum *et al.*, 2019; Fernandes-Silva *et al.*, 2015). En la industria agrícola, por ejemplo, su uso aún es poco extendido, y una adecuada tipificación de propóleos podría fomentar su empleo como agente fitosanitario en prácticas agrícolas sostenibles (Bankova y Popova, 2023; Talero *et al.*, 2012). Esto incluye caracterizar y promover aquellas muestras con mayor potencial para el control de plagas y enfermedades, optimizando así sus beneficios en la agricultura (Khuat *et al.*, 2023; Tolosa y Cañizares, 2002).

1.3. Aplicaciones del propóleo en agricultura y su potencial como bioherbicida

En la agricultura moderna, las malezas, así como también las plagas y las enfermedades, representan una problemática que afecta el rendimiento de los cultivos. Tradicionalmente, se han utilizado herbicidas sintéticos para controlar las especies vegetales perjudiciales en las plantaciones. Sin embargo, su uso excesivo ha creado preocupaciones por su impacto sobre el ambiente y la salud de la población, además de generar resistencia en las malezas. Esto ha impulsado la búsqueda de herbicidas de origen natural, que carezcan de los efectos indeseados de los productos sintéticos y sean compatibles con planteos agroecológicos sustentables. En tal sentido, el propóleo se presenta como un producto promisorio para la agricultura, ya que debido a sus efectos fitoinhibitorios y/o fitotóxicos tiene potencial aplicación como bioherbicida (Bankova y Popova, 2023).

De acuerdo con los estudios realizados por Dadgostar y Nozari (2020) y Gonnet (1968), el propóleo puede inhibir la división de células vegetales y afectar procesos fundamentales en la fotosíntesis, como, por ejemplo, la fotofosforilación en los cloroplastos. El efecto inhibitorio de los compuestos bioactivos del propóleo sobre la fotosíntesis también puede modificar los niveles de clorofila o causar el cierre de los estomas y la subsecuente reducción en la provisión de CO₂ (Sampietro, 2001). En conjunto, esto puede llevar a una reducción en la producción de energía necesaria para el crecimiento y el desarrollo de las plantas, comprometiendo su supervivencia. Más aun, investigaciones recientes, han confirmado que extractos de propóleos pueden inhibir la germinación de semillas de especies como el arroz (*Oryza sativa*) y la lechuga (*Lactuca sativa*), mostrando que su efectividad varía según la concentración y el tipo de propóleos utilizado (Khuat *et al.*, 2023).

Cabe mencionar que, además de su potencial como bioherbicida, el propóleo ha resultado de interés para otras aplicaciones agronómicas. Este producto muestra una notable capacidad antifúngica, lo que lo convierte en una alternativa natural para el control de enfermedades causadas por hongos en los cultivos y postcosecha. Por ejemplo, se ha demostrado su eficacia frente a hongos como *Penicillium allii*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Cibanal *et al.*, 2021 y 2022), *P. italicum* y *Aspergillus parasiticus* (Fernandes-Silva *et al.*, 2015). También ha sido evaluado por su potencial frente a otras plagas vegetales, como nemátodos, resultando eficaz sobre el control de larvas de *Meloidogyne* spp. y *Tylenchulus semipenetrans*, sobre las raíces de cultivos como la berenjena y cítricos, respectivamente (Bankova y Popova, 2023).

1.4. Los metabolitos secundarios vegetales y su rol en la actividad bioherbicida del propóleo

Los materiales resinosos que las abejas recolectan para elaborar el propóleo contienen metabolitos secundarios vegetales, como fenoles y terpenos, entre otros ya mencionados. Estos compuestos orgánicos, de bajo peso molecular, se destacan por mediar en las interacciones ecológicas de las plantas con su entorno, gracias a sus propiedades bioactivas. Las plantas los producen y liberan como parte de sus mecanismos de defensa y como una estrategia evolutiva para optimizar el acceso a recursos limitados, como el agua, la luz y diferentes nutrientes (Sampietro, 2001). Dentro de los metabolitos secundarios vegetales también se encuentran los compuestos alelopáticos, que son liberados al ambiente mediante procesos como la lixiviación, la descomposición de residuos vegetales y la volatilización, y que afectan negativamente el crecimiento y el desarrollo de otros vegetales que se encuentran en el entorno de la planta emisora. Por ello, los compuestos alelopáticos son considerados herbicidas naturales (Sampietro, 2001), y han sido incorporados en el manejo integrado de malezas para minimizar el uso de herbicidas sintéticos y sus impactos negativos (Aragão *et al.*, 2015; Dunan *et al.*, 2023). En consecuencia, el propóleo podría considerarse para el mismo uso.

Entre los estudios llevados a cabo para investigar el efecto de las sustancias naturales, incluso alelopáticas, sobre procesos fisiológicos de las plantas como la germinación, el uso de la lechuga como especie modelo ha ganado relevancia debido a su corto ciclo de crecimiento y a su alta sensibilidad a diversas sustancias químicas. En estas investigaciones se suelen evaluar indicadores clave como la inhibición de la germinación, y la elongación de la radícula y el hipocótilo de las plántulas, lo que proporciona una visión inicial del impacto de los compuestos en estudio en las primeras etapas de vida de los vegetales (Sobrero y Ronco, 2004).

1.5. Hipótesis y objetivos

A pesar de los numerosos estudios que describen las propiedades bioactivas del propóleo, existen escasas investigaciones que evalúen su acción herbicida sobre la germinación de las semillas. Más aún, hasta el momento, en Argentina no se han presentado estudios que analicen comparativamente el efecto de propóleos de distintas regiones del país sobre la germinación de semillas de lechuga. La hipótesis del presente trabajo fue que la aplicación de extractos acuosos de propóleos, mediante riego, tiene efecto herbicida sobre la germinación de semillas de lechuga, dependiendo de la procedencia del propóleo y de la concentración del extracto empleado. El objetivo general de esta tesis de grado fue evaluar la acción herbicida de diez propóleos provenientes de distintas regiones de Argentina, mientras que los objetivos específicos fueron:

- caracterizar químicamente parámetros relevantes de los distintos extractos de propóleos;
- determinar y comparar el efecto herbicida de los diferentes extractos de propóleos sobre la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas de lechuga;
- evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cada extracto sobre la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas de lechuga.

2. Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA), centro asociado a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), y en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional del Sur (UNS). Ambos laboratorios funcionan en el Departamento de Agronomía de la mencionada casa de altos estudios. Cabe destacar que en el LabEA, desde el año 2009, se realiza investigación básica y aplicada sobre la caracterización y potenciales aplicaciones agronómicas del propóleo. Los estudios realizados se enmarcaron en el PGI (Proyecto de Grupos de Investigación) aprobado y financiado por la UNS denominado “Evaluación de extractos de propóleos y de aceites esenciales para su aplicación como biopesticidas agrícolas”, en el que participan integrantes de ambos laboratorios.

2.1. Origen de las muestras brutas de propóleos

Los propóleos en bruto (Fig. 1) fueron recolectados en distintas localidades de Argentina (Fig. 2).

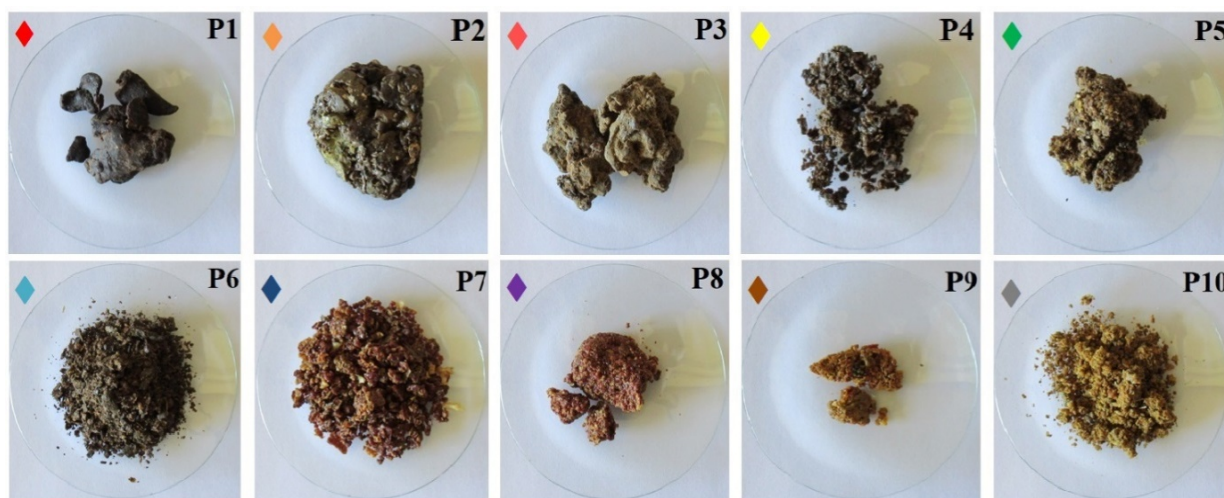


Figura 1. Muestras de propóleos en bruto (P), acompañadas de un código de color que se utilizó como rótulo, facilitando su identificación y seguimiento a lo largo del ensayo.

La información del origen de las diez muestras de propóleos utilizadas en este trabajo se resume, a continuación, en la Tabla 1.

Tabla 1. Identificación del origen de los propóleos en bruto (P) utilizados en este trabajo, acompañadas de un código de color utilizado como rótulo durante el ensayo, facilitando su identificación y seguimiento. La información fue brindada por los apicultores que donaron las muestras. Todos los propóleos fueron recolectados en Argentina.

Muestra	Localidad, provincia y año de recolección	Método de recolección	Fuentes vegetales (*) y otras observaciones
♦P1	Municipio de Aristóbulo del Valle, Misiones, 2022	Malla y raspado	<i>Gochnatia</i> spp., <i>Parapiptadenia</i> spp., <i>Nectandra</i> spp., <i>Ocotea</i> spp., <i>Syagrus romanzoffiana</i> , <i>Handroanthus heptaphyllus</i> , <i>Campomanesia xanthocarpa</i> , <i>Balfourodendron riedelianum</i> y <i>Baccharis latifolia</i>
♦P2	San Miguel de Tucumán – Villa Muñecas, Tucumán, 2019	Malla	<i>Zuccagnia punctata</i>
♦P3	San Cosme, Corrientes, 2024	Raspado	<i>Eucalyptus</i> spp.. Muestra deteriorada debido a la presencia de pupas y larvas de <i>Galleria mellonella</i> y/o <i>Achroia grisella</i>
♦P4	Capivara, departamento de San Cristóbal, Santa Fe, 2022	Malla	<i>Vachellia caven</i> , <i>Prosopis alba</i> , <i>Prosopis affinis</i> , <i>Sapium</i> spp., <i>Euphorbia hirta</i> , <i>Celtis tala</i> y <i>Baccharis</i> spp.
♦P5	La Picada, Paraná, Entre Ríos, 2021	Malla	<i>Salix</i> spp., <i>Vachellia caven</i> , <i>Schinus longifolius</i> , <i>Gleditsia triacanthos</i> , <i>Schinus molle</i> , <i>Prosopis</i> spp., <i>Ligustrum lucidum</i> , <i>Psidium guajava</i> , <i>Aspidosperma</i> spp.
♦P6	Tunuyán, Mendoza, 2022	Raspado	<i>Populus</i> spp., <i>Salix</i> spp., <i>Malus domestica</i> , <i>Prunus persica</i> , <i>Prunus domestica</i> , <i>Prunus avium</i> , <i>Larrea divaricata</i> , <i>Muehlenbeckia hastulata</i> y <i>Geoffroea decorticans</i>
♦P7	Chascomús, Provincia de Buenos Aires, 2023	Malla	<i>Salix</i> spp., <i>Acacia</i> spp., <i>Eucalyptus</i> spp.
♦P8	Colonia Lejarraga, Hilario Ascasubi, Buenos Aires, 2022	Malla	<i>Eucalyptus</i> spp., <i>Acacia</i> spp., <i>Populus</i> spp., <i>Tamarix</i> spp., <i>Hyalis argentea</i> , <i>Baccharis latifolia</i> , <i>Geoffroea decorticans</i> , <i>Schinus longifolius</i>
♦P9	Choele-Choel, Río Negro, 2024	Malla	<i>Populus</i> spp., <i>Salix</i> spp., <i>Elaeagnus angustifolia</i> , <i>Acacia</i> spp., <i>Eucalyptus</i> spp., <i>Tamarix</i> spp.
♦P10	Paso Aguerre, Neuquén, 2024	Malla	<i>Larrea divaricata</i> , <i>Prosopis alpataco</i> , <i>Atriplex lampa</i> , <i>Salix</i> spp., <i>Tamarix</i> spp., <i>Medicago sativa</i>

*Géneros y especies vegetales consideradas como probables fuentes de resinas y exudados para la elaboración del propóleos, considerando especialmente su presencia en cercanías de los apiarios.



Figura 2. Localidades de origen de las diez muestras de propóleos utilizadas en este estudio.

2.2. Elaboración y caracterización de extractos de propóleos

En una primera etapa, a partir de cada muestra de propóleos en bruto, se elaboraron extractos hidroalcohólicos (EP) siguiendo la metodología de Cibanal *et al.* (2017). Brevemente, esto consistió en colocar 15 gr de propóleos finamente molido en 150 ml de hidroalcohol (70 % etanol 96° y 30 % agua destilada). La mezcla se llevó a estufa a 40 ± 2 °C, con agitación magnética continua durante 24 h. La solución resultante se filtró con papel Whatman n° 40 para retener las impurezas. Los extractos obtenidos se conservaron en frascos color ámbar, al resguardo de la luz y a baja temperatura (entre 3 °C y 5 °C).

El porcentaje de extracto seco de cada EP se determinó adaptando la metodología de la norma IRAM-INTA 15935-2 de extractos de propóleos. Además, se realizaron las curvas espectrofotométricas UV-VIS para determinar cualitativamente la presencia de compuestos fenólicos bioactivos en cada muestra. A continuación se describen ambas caracterizaciones:

a. Extracto seco: la metodología consistió en colocar 50 ml de cada EP en un vaso de precipitado que se llevó a estufa a una temperatura máxima de 40 ± 2 °C durante 10 días, momento en el que se observó su completa desolventización (Fig. 3). Luego, se calculó el extracto seco (%), utilizando la siguiente fórmula:

$$ES \% = \frac{m1 - m0}{m2} \times 100$$

donde m0 es la masa de la cápsula de porcelana vacía (g), m1 es la masa de la cápsula más el residuo seco (g) y m2 es la masa de la muestra (g).

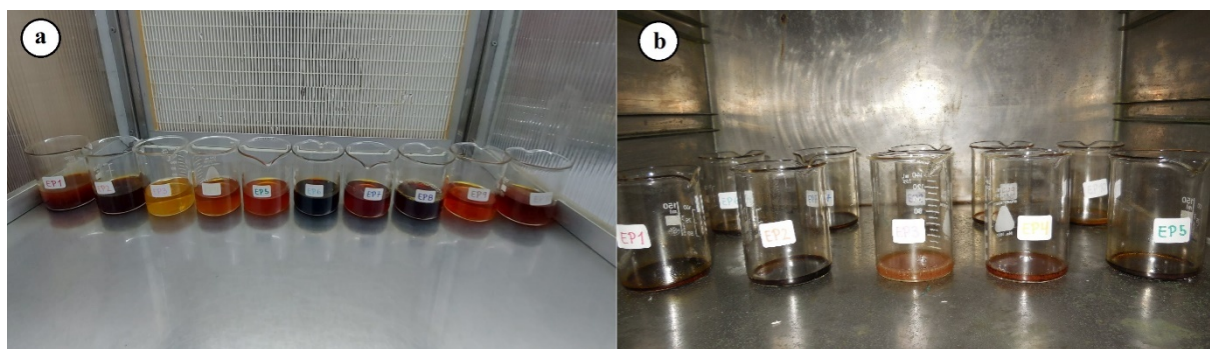


Figura 3. a. Extractos hidroalcohólicos de propóleos; **b.** Extracto seco obtenido luego del proceso de desolventización.

b. Curvas espectrofotométricas UV-VIS: se realizó un barrido completo de longitudes de onda a intervalos de 10 nm, desde 220 nm hasta 400 nm (valores a los cuales la mayoría de los fenoles presentan absorbancia), evaluando la presencia de picos máximos de absorbancia entre 270 nm y 315 nm. Para esto se utilizó un espectrofotómetro Lambda 265 UV-VIS (Perkin Elmer) y cubetas de cuarzo.

2.3. Formulación y caracterización de tratamientos para el bioensayo sobre actividad herbicida del propóleos

Los tratamientos empleados en el bioensayo de acción herbicida de propóleos consistieron en soluciones acuosas de distinta concentración de este producto, formulados a partir de los EP. Para esto, a los extractos secos obtenidos en el punto anterior (2.2.a.) se les agregaron 50 ml de agua destilada estéril. Estos se agitaron en un baño termostatzado a 80 rpm y 92 ± 2 °C durante 15 min. Posteriormente, se llevaron a un agitador magnético a 700 rpm durante 15 min. Finalmente, fueron sonicados (dispositivo que genera ondas ultrasónicas y sirve para homogeneizar muestras) durante 15 minutos. Las soluciones obtenidas se trasladaron a tubos Falcon de 50 ml (Fig. 4). La eficacia de esta metodología ha sido comprobada para preservar la capacidad bioactiva de los componentes y, al mismo tiempo, facilitar la disolución de las resinas en agua. Los dos primeros procedimientos fueron adaptados de Bucio-Villalobos y Martinez-Jaime (2017), Talero *et al.*, (2012) y Tolosa y Cañizares (2002). La última etapa se adaptó de Bankova *et al.* (2021), ya que mejora la disolución de las resinas, favoreciendo la homogeneidad de la mezcla resultante.

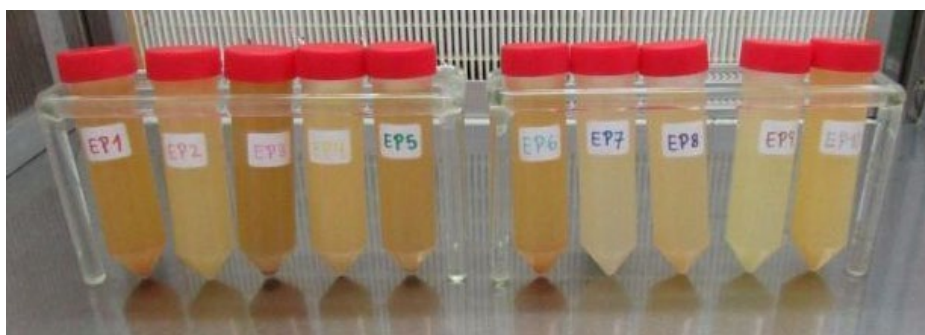


Figura 4. Soluciones acuosas de propóleos, obtenidas luego de los procesos de agitación y sonicación.

A partir de cada solución acuosa de propóleos se prepararon cuatro tratamientos (Fig. 5). Estos consistieron en la solución acuosa al 100 % (solución acuosa original, tal como se obtuvo al resolubilizar los extractos secos; tratamientos a), y tres diluciones seriadas respecto de estas, diluidas con agua destilada estéril: solución acuosa de propóleos al 75 % (tratamientos b), al 50 % (tratamientos c), y 25 % (tratamientos d). De esta forma, los tratamientos quedaron codificados con el n° del EP y de la letra correspondiente a la concentración, por ejemplo: EP 1 c correspondió a la solución acuosa de propóleos proveniente de Misiones al 50 %. En total, se obtuvieron 40 soluciones acuosas de propóleos de distinta concentración y origen geográfico.

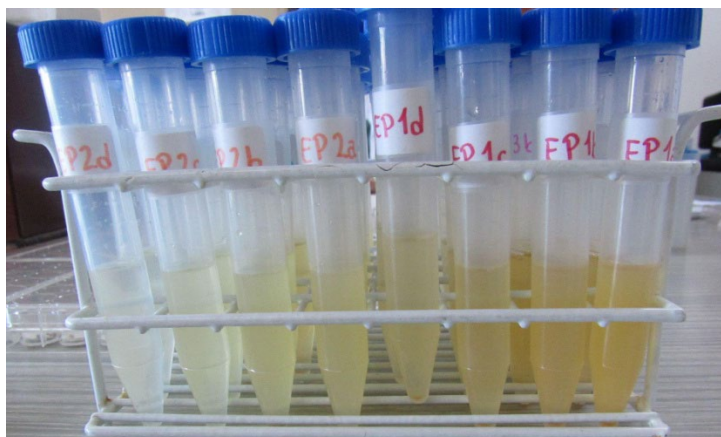


Figura 5. Soluciones acuosas de propóleos en distintas concentraciones utilizadas como tratamientos en el bioensayo de acción herbicida.

La osmolaridad de cada tratamiento (solución acuosa) se midió con un osmómetro VAPRO 5520 (Wescor). Los valores registrados en mmol/kg fueron convertidos posteriormente a Megapascuales (MPa), utilizando el factor de conversión -0,0025 proporcionado por el fabricante para establecer la presión osmótica.

2.4. Bioensayo de actividad herbicida de propóleos sobre la germinación, el crecimiento y el desarrollo de plántulas

La actividad herbicida de los distintos tratamientos formulados según el punto anterior (2.3.) se evaluó mediante un bioensayo en el que las soluciones se aplicaron en forma de riego a germinadores. A modo de control metodológico se utilizó un tratamiento con agua destilada estéril (C). En el bioensayo se utilizaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), variedad Prizehead, con 85 % de poder germinativo declarado por el proveedor, y un peso de mil semillas de 1,05 g (AmsaSeed, Estados Unidos). Estas se desinfectaron con una solución acuosa de lavandina (1:3) durante 15 segundos. Luego se les realizó un triple enjuague con agua destilada estéril y se dejaron secar a 25 °C entre papel servilleta estéril por 24 horas.

A modo de germinador se utilizaron microplacas de plástico con pozos de 17 mm de diámetro. En cada pozo se colocaron 2 discos de papel absorbente, apto para ensayos de germinación, y diez semillas de lechuga (Fig. 6.a.). En base a los resultados obtenidos en una prueba preliminar, cada pozo se humedeció con 0,4 ml de la solución del tratamiento correspondiente (Fig. 6.b.). Los germinadores se incubaron durante cinco días en una cámara a 20 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Al finalizar, se contabilizó la cantidad de semillas germinadas y no germinadas siguiendo los criterios de las normas ISTA, y se calculó el porcentaje de cada caso sobre el total de semillas dispuestas a germinar en cada repetición (para subsanar los mínimos casos en los que hubo errores operativos al disponer el número de semillas en los pozos). Como semillas germinadas se consideraron aquellas en las que ocurrió la emergencia y el desarrollo de las estructuras esenciales para la plántula a partir del embrión. A su vez, dentro de esta categoría, se distinguió entre plántulas normales o defectuosas respecto del control (Tabla 2).

A partir de los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de inhibición (I %) de la germinación respecto al control (C) utilizando la siguiente fórmula adaptada de Khuat *et al.* (2023):

$$I \% = \left(\frac{\text{Promedio de semillas germinadas en C} - \text{Promedio de semillas germinadas en el tratamiento}}{\text{Promedio de semillas germinadas en C}} \right) \times 100$$

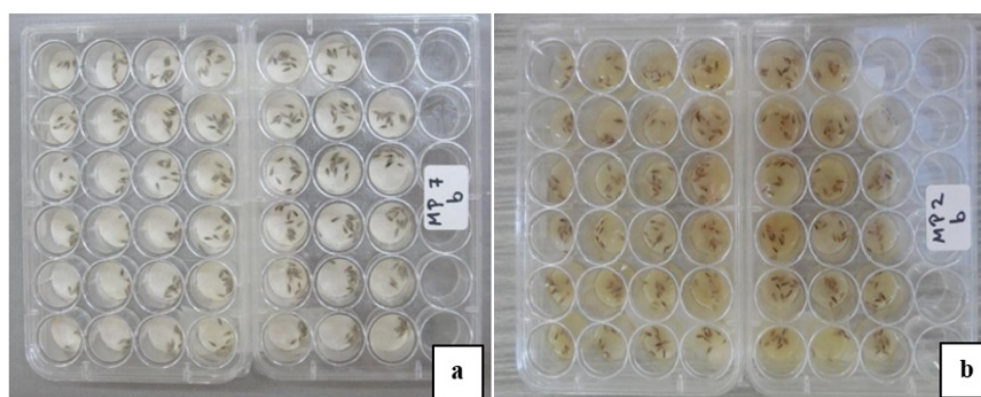


Figura 6. a. Germinador con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) previo a la aplicación de los tratamientos; **b.** Germinador con los diferentes tratamientos aplicados de manera aleatoria, siguiendo un croquis impreso en papel y las coordenadas de cada pozo.

Tabla 2. Criterios de clasificación cualitativos para el bioensayo de actividad herbicida de las soluciones acuosas de propóleos sobre el crecimiento y el desarrollo de plántulas de lechuga.

Categoría	Descripción
Plántulas normales	Estructuras esenciales bien desarrolladas y conservadas; radícula alargada, con típica presencia de pilosidades; hipocótilo sin lesiones, alargado, sin retorcimientos; coloración verde intensa en los cotiledones; largo aproximado total de las plántulas: 25 mm.
Plántulas defectuosas	Desarrollo de estructuras esenciales débil o desequilibrado; hipocótilos retorcidos o atrofiados; zona apical de la radícula con coloración oscura, sin pilosidades notables; cotiledones pequeños, curvados hacia abajo, con una coloración verde pálida; en ocasiones desarrollo anormal de raíces secundarias; largo aproximado total de la plántula: < 15 mm.

2.5. Diseño experimental y análisis de datos del bioensayo sobre actividad herbicida del propóleos

El diseño experimental fue de bloques completos al azar, considerando como bloque a cada microplaca. Se utilizaron un total de diez microplacas, a modo de disponer de diez repeticiones de cada bloque. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías, y, tras corroborar los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, cuando se detectaron diferencias significativas en la prueba F, las medias se compararon mediante el test de comparaciones múltiples de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher utilizando el software estadístico INFOSTAT, versión 2021. Además, se construyó un diagrama ternario con los resultados del bioensayo de actividad herbicida empleando el software Paleontological Statistics, versión 4.03.

3. Resultados

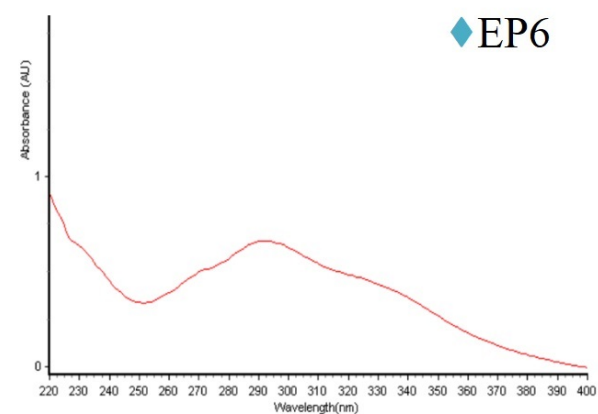
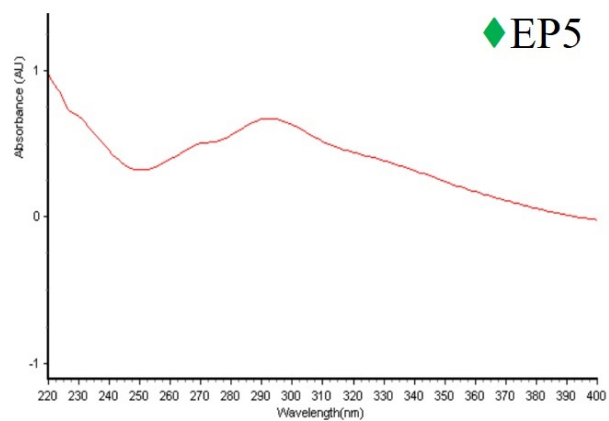
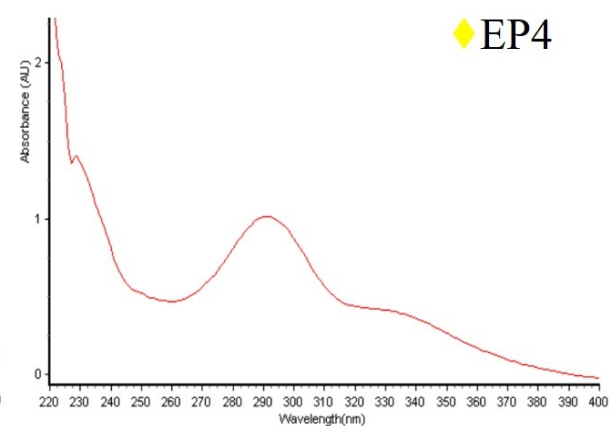
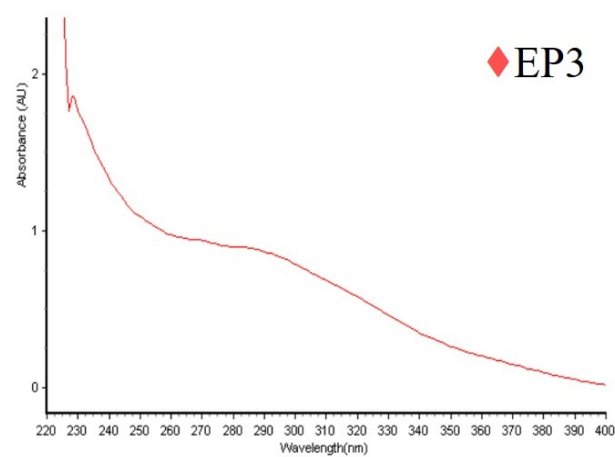
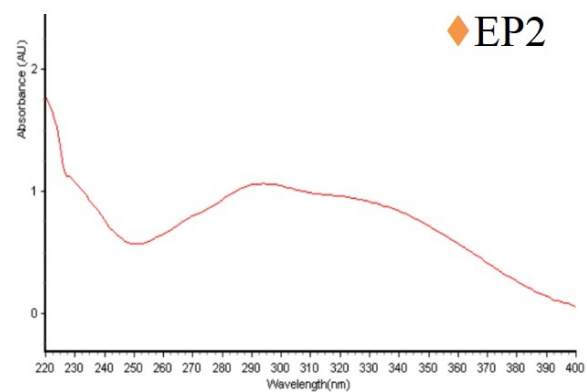
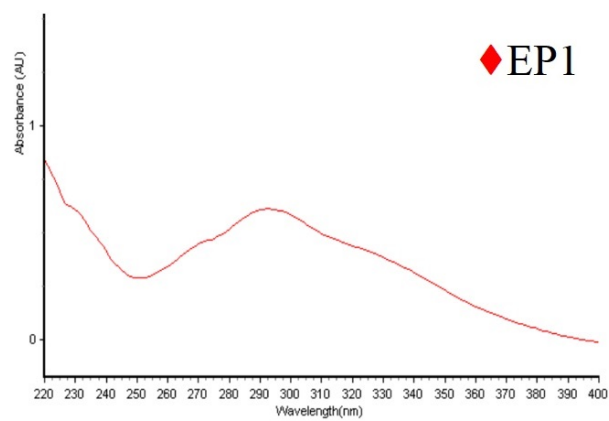
3.1. Caracterización de extractos de propóleos

Los valores de extracto seco obtenidos luego de la desolventización de los EP variaron entre 4,57 % y 16,34 % y se listan en la Tabla 3. Las muestras que presentaron los valores más bajos fueron el EP5 (4,57 %) y el EP2 (6,22 %), mientras que el EP3 (16,34 %) y el EP10 (12,96 %) se destacaron al superar el 10 % ES. En el caso puntual del EP 3, cabe mencionar que al desolventizar se observó un alto contenido de ceras en la fracción seca.

Tabla 3. Valores de extracto seco obtenidos de los extractos hidroalcohólicos de propóleos (EP), elaborados a partir de muestras brutas recolectadas en distintas localidades de Argentina.

Muestra	Extracto seco (%)
♦ EP1	8,42
♦ EP2	6,22
♦ EP3	16,34
♦ EP4	8,63
♦ EP5	4,57
♦ EP6	6,41
♦ EP7	8,90
♦ EP8	9,56
♦ EP9	7,19
♦ EP10	12,96

Los análisis del espectro de absorción UV-VIS de los EP se muestran en la Fig. 7. Si bien los EP presentaron diferentes curvas espectrofotométricas, todos exhibieron una banda amplia de absorción entre 250 nm y 340 nm, con máximos cercanos a los 290 nm, indicando la presencia de compuestos fenólicos.



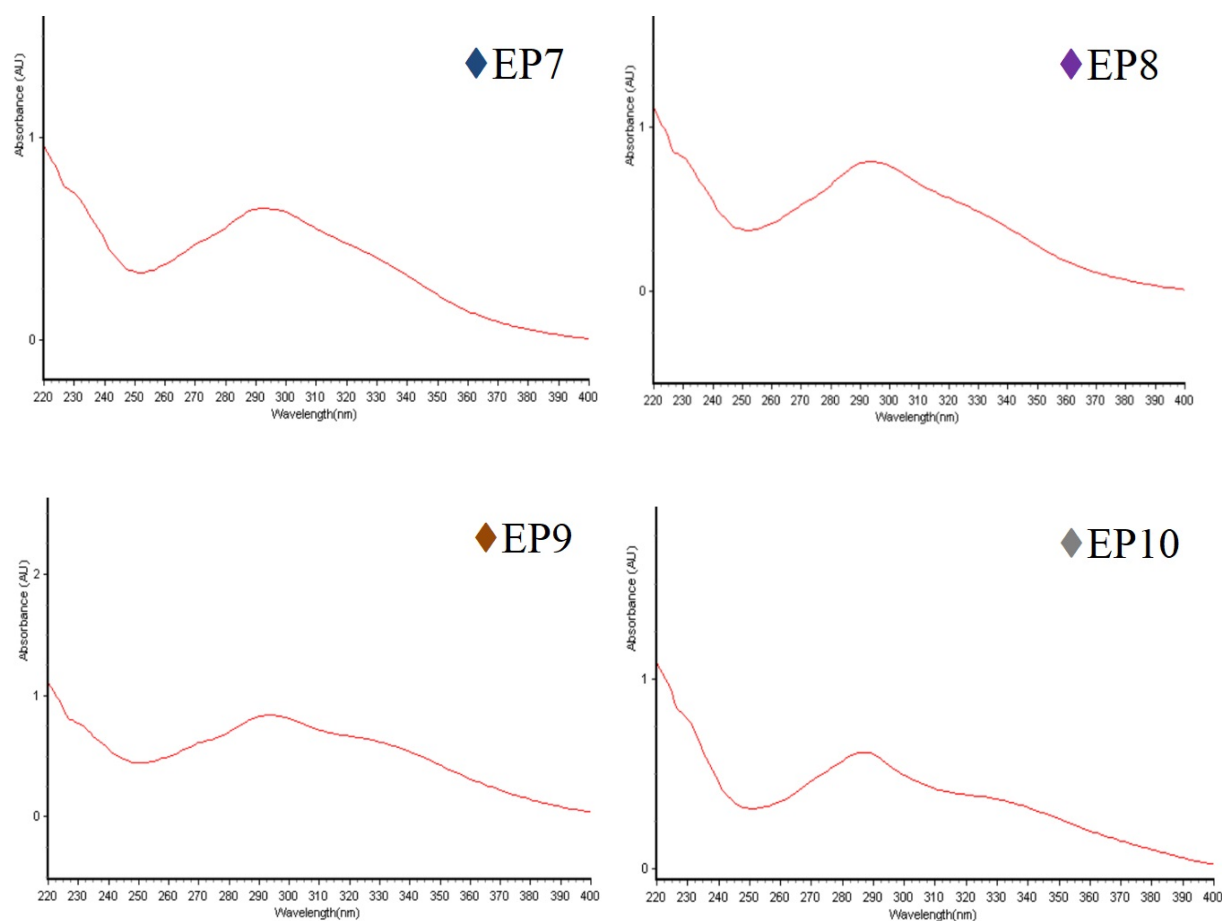


Figura 7. Espectros UV-VIS de extractos hidroalcohólicos de propóleos, elaborados a partir de muestras recolectadas en distintas localidades de Argentina.

3.2. Caracterización de los tratamientos utilizados en el bioensayo sobre actividad herbicida del propóleos

Los valores de presión osmótica de los tratamientos se presentan en la Tabla 4. Variaron entre -0,187 MPa y -0,110 MPa, mientras que el valor del control con agua destilada estéril fue de -0,102 MPa. Los tratamientos con valores más negativos fueron el EP 4a (-0,187 MPa) y el EP 10a (-0,185 MPa), mientras que los tratamientos con valores menos negativos fueron el EP 7d (-0,110 MPa) y el EP 9d (-0,125 MPa). A modo general, las soluciones con mayor concentración de propóleos presentaron menores valores de presión osmótica que los de menor concentración, aunque se observaron ligeras variaciones entre los distintos tipos de propóleos. Esto sugiere un gradiente de presión osmótica dependiente de la concentración en las soluciones de cada tipo de propóleos.

Tabla 4. Valores de presión osmótica (MPa) de las distintas soluciones acuosas de propóleos utilizadas en el bioensayo de acción herbicida. En la tabla se muestran los valores de cada tratamiento formulado a base de un extracto de propóleos (EP 1-10), en distintas concentraciones (a-d).

Tratamiento -EP-		♦1	♦2	♦3	♦4	♦5	♦6	♦7	♦8	♦9	♦10
-Concentración-	a (100 %)	-0,175	-0,172	-0,170	-0,187	-0,162	-0,169	-0,137	-0,162	-0,157	-0,185
	b (75 %)	-0,175	-0,150	-0,170	-0,175	-0,162	-0,165	-0,140	-0,155	-0,145	-0,162
	c (50 %)	-0,150	-0,145	-0,155	-0,170	-0,155	-0,157	-0,122	-0,142	-0,145	-0,152
	d (25 %)	-0,145	-0,140	-0,150	-0,147	-0,137	-0,147	-0,110	-0,137	-0,125	-0,137

3.3. Bioensayo de actividad herbicida de propóleos sobre la germinación, el crecimiento y el desarrollo de plántulas

Al finalizar el ensayo (Fig. 8), se observó en primer lugar y a modo general que todos los tratamientos con propóleos tuvieron efectos inhibitorios sobre la germinación de la lechuga. También se evidenció como tendencia que las soluciones con dosis más altas de este producto fueron más efectivas para inhibir la germinación de las semillas, y afectar negativamente el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

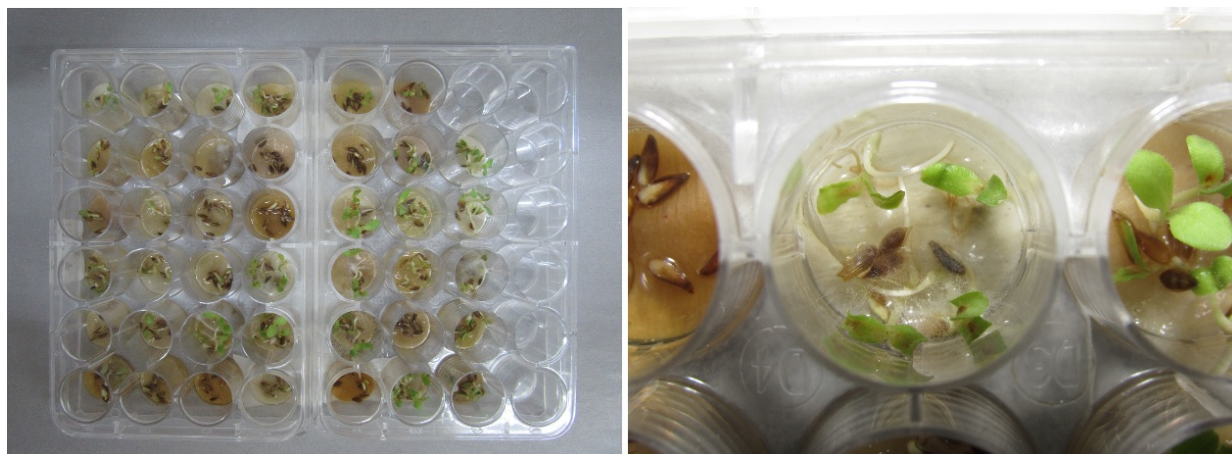


Figura 8. Germinadores al finalizar el ensayo (vista general de una microplaca y detalle de sus pozos).

En la Figura 9 se muestra un diagrama ternario para representar en cada uno de sus vértices las tres variables cualitativas consideradas al finalizar el bioensayo (semillas sin germinar, plántulas normales y plántulas defectuosas). En este gráfico, a su vez, se utilizaron colores cálidos y fríos para indicar las áreas con mayor y menor concentración de datos, respectivamente. De esta forma, se pudo observar que los tratamientos con propóleos se distribuyeron mayoritariamente en cercanías de los vértices correspondientes a semillas sin germinar y plántulas defectuosas, a diferencia del control (C),

que se ubicó en cercanías del vértice referido a plántulas normales. Además, se destaca que en general los tratamientos con mayor concentración de propóleos (a y b), se posicionaron en proximidad del vértice de la variable semillas sin germinar.

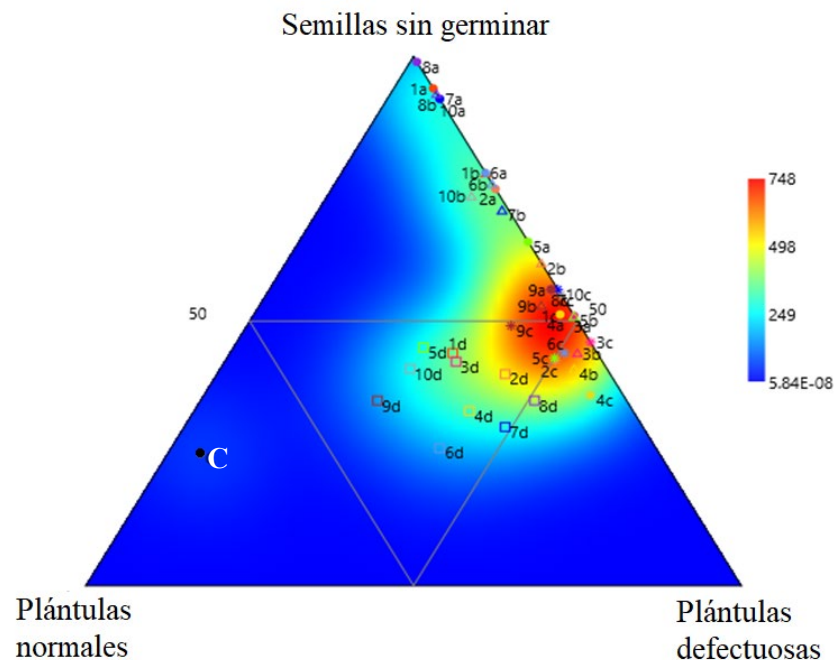


Figura 9. Diagrama ternario de los resultados del bioensayo de actividad herbicida de propóleos. Los vértices corresponden a las variables evaluadas según los criterios de la Tabla 2, los puntos representan la proporción de los resultados de cada tratamiento formulado como soluciones acuosas de propóleos (1-10), en distintas concentraciones (a-d), más el control metodológico (C). Las áreas de mayor densidad de puntos se resaltan en colores cálidos, mientras que las de menor densidad se muestran en colores fríos.

Lo anterior puede visualizarse de forma más detallada en la Figura 10. A medida que se concentró la solución de propóleos, aumentó la proporción de semillas sin germinar y de plántulas defectuosas, evidenciando su efecto herbicida. Asimismo, hubo variaciones en la proporción de estas variables según la dilución y el origen de la muestra. Por su parte, el control (C) tuvo una elevada proporción de plántulas normales (0,7).

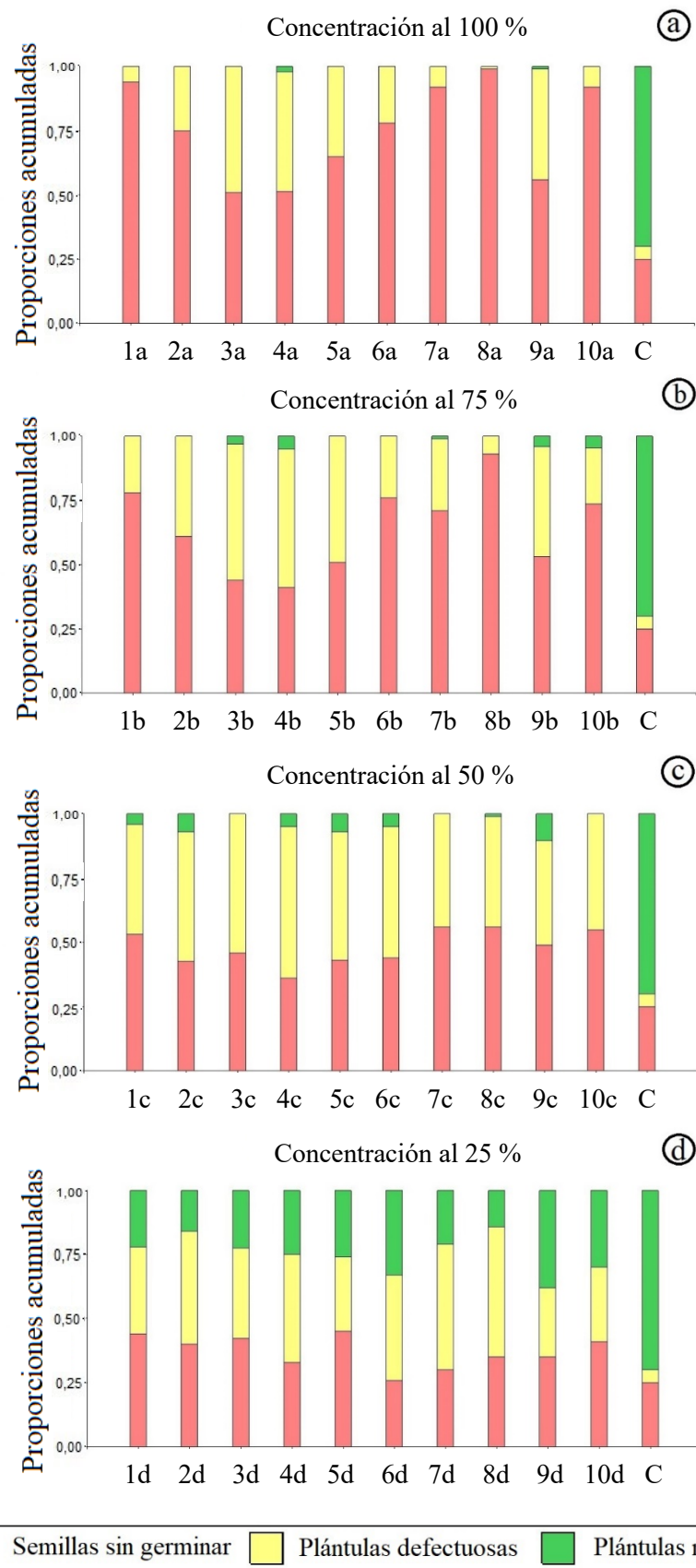


Figura 10. Proporciones acumuladas de las variables medidas en el bioensayo de acción herbicida de propóleos. En los gráficos, las barras corresponden a los tratamientos formulados como soluciones acuosas de distintos propóleos (1-10), en distintas concentraciones (a-d).

El porcentaje de semillas germinadas se analizó mediante un ANOVA simple. Este reveló que todas las soluciones acuosas de propóleos de concentraciones al 100 % y 75 % afectaron significativamente ($p < 0,05$) la germinación respecto del control. En estos tratamientos, los valores de germinación variaron desde el 1 % para el tratamiento EP 8a, hasta un 59 % para el tratamiento EP 10d. En contraste, el porcentaje de germinación promedio del control fue del 75 %. Cabe destacar que también las soluciones c y d de los EP 1, 3, 5 y 10, presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$), respecto del control por su mayor efecto inhibidor.

Los porcentajes de inhibición de la germinación de los tratamientos respecto del control se presentan en la Tabla 5. En este análisis se observó que la inhibición varió entre un máximo de 98,67 % (solución de EP 8a), hasta un mínimo de 8,67 % (solución de EP 6d). El ANOVA de dos vías de estos datos, reveló que hubo interacción entre el tipo de propóleos y la concentración. Al particionar el análisis por dosis, se encontró que en las concentraciones c y d los extractos actuaron de manera similar. Sin embargo, hubo diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos tanto al 100 % (a) como al 75 % (b) (Fig. 11). Al respecto, las soluciones al 100 % (a) de los EP 1, 7, 8 y 10, fueron más efectivas que las demás, tendencia que se mantuvo con ligeras modificaciones en la concentración de las soluciones al 75 % (b).

Tabla 5. Inhibición de la germinación (%) de las distintas soluciones acuosas de propóleos utilizadas en el bioensayo de acción herbicida respecto del control (porcentaje de germinación $75 \% \pm 15,09$). En la tabla se dispusieron los valores de cada tratamiento formulado a base de un extracto de propóleos (EP 1-10) en distinta concentración (a-d).

Tratamiento -EP-		♦ 1	♦ 2	♦ 3	♦ 4	♦ 5	♦ 6	♦ 7	♦ 8	♦ 9	♦ 10
Concentración-	a (100 %)	92	66,67	35,33	37,03	53,33	70,67	89,33	98,67	42	89,33
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	b (75 %)	12,88*	30,31	26,68	19,69	26,85	26,52	15,14	4,22	30,48	15,14
		70,67	50,67	26	24	34,67	68	63,33	90,67	38,67	64,89
	c (50 %)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		16,39	36,54	22,76	20,66	29,11	22,84	26,9	15,46	34,97	22,12
	d (25 %)	38	24,08	30	17,34	24	26,67	42	42	36	40,67
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		23,94	20,24	30,02	23,77	20,89	25,14	29,82	32,97	23,14	20,48
		25,33	21,33	27,11	13,33	29,34	8,67	10,67	21,33	15,33	21,33
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		11,24	18	30,5	13,7	22,49	11,78	13,41	24,3	13,35	20,32

*Cada dato es el promedio de diez repeticiones $\pm$ el desvío estándar.

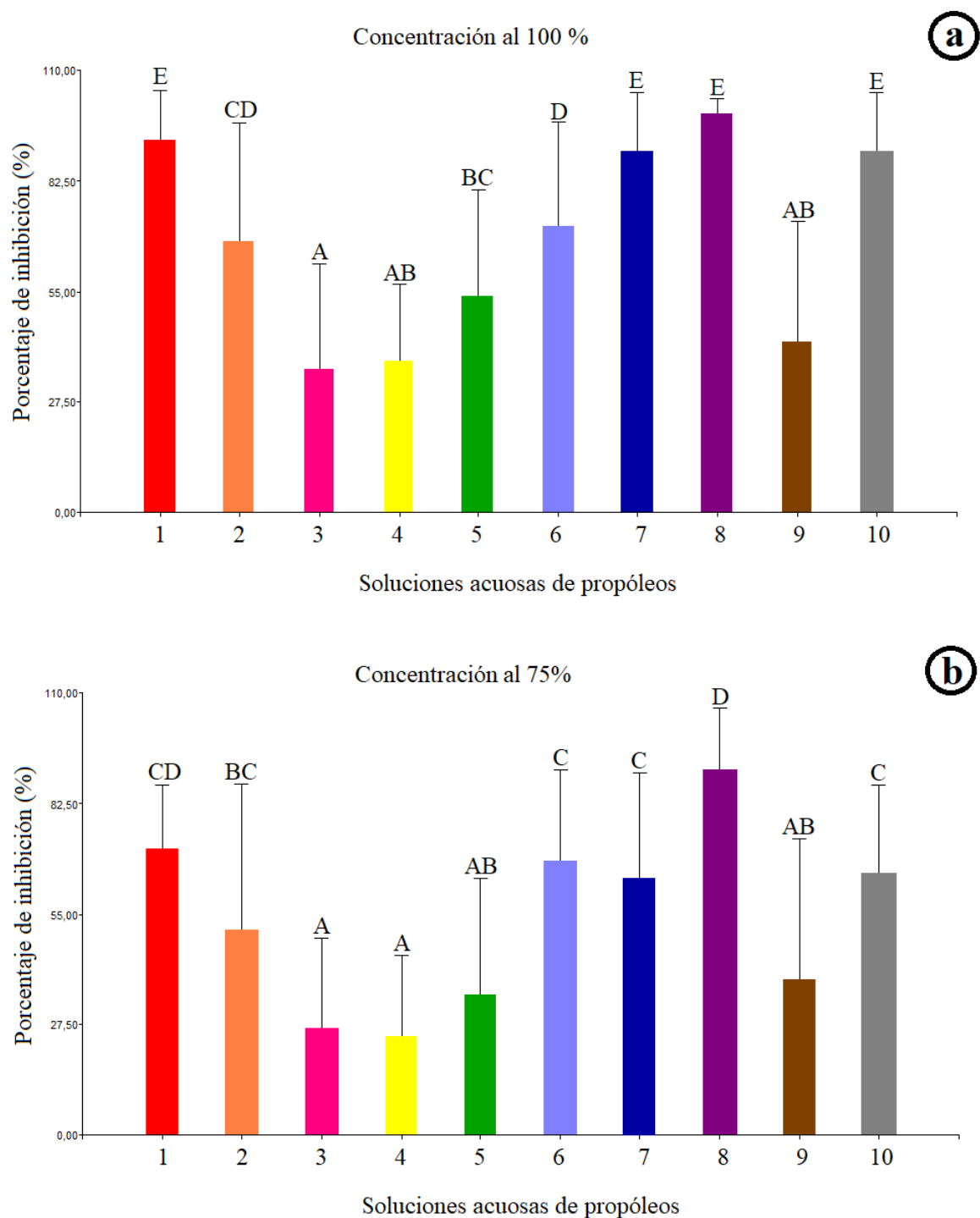


Figura 11. Porcentaje de inhibición de la germinación de lechuga en el bioensayo de acción herbicida de propóleos respecto del control metodológico en agua destilada estéril (porcentaje de germinación 75 % $\pm$ 15,09). En los gráficos, las barras corresponden a las medias $\pm$ el desvío estándar para cada tratamiento de propóleos formulado como solución acuosa (EP 1-10) en distinta concentración (a-b). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos según el test de Fisher.

El análisis estadístico del porcentaje de plántulas normales demostró que los tratamientos con soluciones acuosas de propóleos se diferenciaron del control metodológico por presentar un menor número de ejemplares en esta categoría ($p < 0,05$). Se destaca que, en los tratamientos a base de los EP 1, 2, 3, 5, 6, 8 y 10 en la concentración al 100 % (a), así como en los EP 1, 2, 5, 6, 8 y 10 al 75 % (b), y en los EP 3 y 7 al 50 % (c), el número de plántulas normales obtenidas al finalizar el ensayo fue del 0 %. Esto los diferenció estadísticamente ($p < 0,05$) del resto de las soluciones con propóleos probadas.

La evaluación cualitativa de las plántulas defectuosas obtenidas en los tratamientos a base de propóleos evidenció desde deformaciones leves hasta severas, respecto del control (en su mayoría normales), dependiendo de la concentración de propóleos aplicada (Fig. 12). En este sentido, en los tratamientos al 100 % y 75 %, la mayoría de las plántulas germinadas mostraron deformaciones severas, como hipocótilos cortos, gruesos y retorcidos, radículas muy cortas y oscurecidas, cotiledones pálidos, cerrados y curvados hacia abajo. Más aún, en estos casos fue común observar la emergencia de los cotiledones previa emergencia de la radícula. Las diluciones al 50 % y 25 % presentaron mayormente deformaciones leves, que si bien denotaban alteraciones en la morfología de las estructuras esenciales, lograron un crecimiento ligeramente superior en comparación a las anteriores. En general, las concentraciones más bajas fueron las menos perjudiciales. Solo unos pocos tratamientos, en su mayoría al 25 %, presentaron plántulas normales de apariencia similar a lo observado en el control. Por otro lado, en los tratamientos al 100 % se observaron semillas no germinadas con un aumento evidente de su tamaño, de coloración más oscura que las semillas secas y de consistencia firme al aplicarles presión mecánica con una pinza de disección.



Figura 12. Plántulas obtenidas al finalizar el bioensayo de acción herbicida de propóleos; **a.** Plántulas obtenidas en el control metodológico, consideradas normales; **b.** Plántulas defectuosas y semillas sin germinar bajo tratamientos a base de propóleos; **c.** Gradiente de plántulas normales (hacia la izquierda), plántulas defectuosas (medio) y semillas no germinadas (derecha).

4. Discusión

El control de malezas es un desafío crucial en la agricultura actual, especialmente dentro del nuevo paradigma que plantea priorizar la sostenibilidad minimizando el impacto ambiental. A pesar de los beneficios agronómicos que brindan los herbicidas tradicionales, su uso ha sido asociado a efectos negativos (Aragão *et al.*, 2015). Por este motivo, la exploración de productos naturales bioactivos con propiedades herbicidas, como el propóleo, ha adquirido especial relevancia.

A pesar de los múltiples estudios sobre sus propiedades, hay pocas investigaciones sobre los efectos de este producto sobre la germinación de semillas, más aún utilizando muestras de Argentina. El presente trabajo buscó contribuir en tal sentido, evaluando el efecto herbicida de soluciones acuosas de propóleo sobre semillas de lechuga.

4.1. Caracterización de extractos de propóleo

Los extractos de propóleo elaborados con hidroalcohol (70 % etanol 96° y 30 % agua destilada) son ampliamente utilizados en la industria, ya que este solvente permite una eficiente solubilización de fenoles y otros compuestos bioactivos utilizando menor cantidad de etanol, como han demostrado los estudios de Woisky y Salatino (1998) y Da Silva Frozza *et al.* (2013). La caracterización de este tipo de productos resulta esencial para conocer sus propiedades, dado que su composición química puede variar según el origen de las muestras y, en consecuencia, su eficacia (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

En este estudio, los diez extractos hidroalcohólicos de propóleo (EP) mostraron características consistentes con la bibliografía y, tal como era esperable, se observaron variaciones entre las muestras. Esto se debió, muy probablemente al origen botánico, la forma de obtención y las condiciones de postcosecha (Bedascarrasbure *et al.*, 2004; Cibanal *et al.*, 2019; Salas *et al.*, 2020).

Los valores de extracto seco oscilaron entre 4,57 % y 16,34 %. Estas cifras son cercanas a las reportadas por otros autores que utilizaron el mismo solvente. Las diferencias observadas entre las muestras pueden ser atribuidas a la proporción de resinas, ceras y otros compuestos presentes en los propóleos en bruto, que presentan distinta solubilidad en hidroalcohol (Bastos *et al.*, 2011; Talero *et al.*, 2012).

Según la Norma Argentina IRAM-INTA 15935-2, los extractos de propóleo deben contener al menos un 10 % de materia seca. En este estudio, la mayoría de las muestras analizadas presentaron valores inferiores (Tabla 3), lo cual podría atribuirse al uso de hidroalcohol en su preparación. De acuerdo a Talero *et al.* (2012), las extracciones con este solvente muestran en promedio extractos secos más bajos que los obtenidos con etanol al 96 %, para el cual está indicada la Norma.

En el EP 3, si bien el valor de ES fue elevado (16,34 %), la gran cantidad de ceras observadas se atribuyó al método de cosecha utilizado (raspado), y/o a una baja disponibilidad de resinas en la flora

cercana al apiario. Es importante señalar que las ceras no contienen fenoles ni otras moléculas bioactivas (Figueiredo *et al.*, 2015), lo que contribuye a explicar los resultados del bioensayo que se discuten a continuación.

El análisis de los espectros UV-VIS ofreció información relevante sobre la composición química de los EP. En concordancia con lo planteado por Bedascarrasbure *et al.* (2004), se pudo inferir que los distintos perfiles de absorción correspondieron a distintos perfiles químicos. Vale recordar que aunque la composición del propóleo varía según su origen botánico y puede verse afectada por la forma de recolección y las condiciones de postcosecha, igualmente permanece invariable que los fenoles y flavonoides suelen ser los principales compuestos bioactivos de las muestras. Estos compuestos, derivados del metabolismo secundario vegetal, tienen diversas propiedades biológicas, y su presencia puede determinarse fácil y rápidamente mediante métodos espectrofotométricos. Sin embargo, estas técnicas no determinan la identidad de los mismos, lo que reviste una limitación ya que algunos fenoles son altamente activos, mientras que otros apenas presentan propiedades biológicas (Bankova y Marcucci, 2015).

En Argentina, país en el que encuentran ecosistemas tan diversos como la región patagónica, mesopotámica, de cuyo, etc., los extractos de propóleos poseen una marcada variabilidad en el contenido y tipo de compuestos bioactivos. Por ejemplo, en muestras de Mendoza se han identificado flavonoides como la galangina, la pinocembrina y la crisina, junto con ácidos fenólicos como el ácido cafeico y el ácido ferúlico (Salas *et al.*, 2020). En propóleos provenientes de Tucumán, Salta y Catamarca, se detectaron componentes fenólicos que incluyen ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinámico, pinobanksina, quercetina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, ácido dimetilalilcafeico, crisina, galangina, kaempferida y tectocrisina (Isla *et al.*, 2013). Los resultados de la caracterización fueron acordes con la Norma Argentina IRAM-INTA 15935-2, que determina que los extractos de propóleos deben presentar picos máximos de absorción entre 270 nm y 315 nm.

4.2. Caracterización de los tratamientos utilizados en el bioensayo sobre actividad herbicida del propóleo

La presión osmótica del medio de germinación de las semillas es un factor crucial durante dicho proceso, ya que regula la absorción de agua, principalmente durante la imbibición, lo que resulta indispensable para que el metabolismo de éstas se reactive, y las plántulas comiencen su crecimiento y desarrollo. El valor de presión osmótica ideal para la germinación de las semillas puede variar según la especie, pero normalmente se considera óptimo que las soluciones de riego tengan valores superiores a -0,5 MPa (Cordero y Stéfano, 1991). Valores más negativos de este parámetro pueden inducir estrés, limitando la activación enzimática, la rehidratación celular, la movilización de nutrientes y la activación de mecanismos de reparación (de membranas, proteínas y ADN). Además, restringe la elongación celular y retrasa la aparición de la radícula, lo que afecta negativamente la germinación y el desarrollo

inicial de la plántula (Natera *et al.*, 2010). Más aún, valores muy bajos (es decir, más negativos) de este parámetro influyen en las plántulas afectando su capacidad de absorber agua y nutrientes esenciales para su desarrollo, ralentizando el crecimiento (Álvarez-Holguín *et al.*, 2017).

En este estudio, las soluciones acuosas de propóleos carecieron de efecto osmótico sobre la germinación, el crecimiento y/o el desarrollo de plántulas de lechuga, dado que los valores medidos estuvieron cercanos al valor del tratamiento control con agua destilada, y fueron superiores a la referencia mencionada anteriormente (-0,5 MPa). Esto sugiere que, aunque los fenoles y otros compuestos bioactivos presentes influyeron muy levemente en la presión osmótica de las soluciones, los efectos observados en el bioensayo se debieron a otros factores.

4.3. Bioensayo de la actividad herbicida de propóleos sobre la germinación, el crecimiento y desarrollo de plántulas

Los resultados del bioensayo demostraron que todos los tratamientos a base de propóleos, en al menos una de las dosis probadas, tuvieron efecto inhibitorio significativo ($p < 0,05$) sobre la germinación de semillas de lechuga. Estas observaciones son consistentes con lo reportado por Dadgostar y Nozari (2020) y Gonnet (1968), quienes indicaron que este producto posee acción herbicida sobre distintas especies vegetales. Esta propiedad se ha relacionado con la presencia de fenoles y flavonoides en el propóleos, los cuales poseen la capacidad de afectar la germinación y el crecimiento y desarrollo de las plantas (Da Silva Frozza *et al.*, 2013; Fernandes-Silva *et al.*, 2015).

En el bioensayo, se observó que en los tratamientos con propóleos las semillas que no germinaron presentaron un aumento de volumen. Esto indicaría que las mismas se embebieron, pero sufrieron una alteración fisiológica que les impidió continuar con la síntesis y activación de los sistemas enzimáticos del proceso de germinación, y con el alargamiento de la radícula o el crecimiento de la plúmula. Esto podría deberse a la acción de los compuestos fenólicos presentes en los propóleos, que, de acuerdo a la bibliografía, pueden interferir con la acción de ciertas hormonas que participan en la germinación como las auxinas y las giberelinas (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Carranza *et al.*, 2016).

Por otro lado, también se encontró que las soluciones acuosas de propóleos afectaron la morfología de las plántulas que lograron germinar. Estos efectos concuerdan con los observados por otros autores que trabajaron de forma similar con compuestos alelopáticos (Sampietro, 2001). De acuerdo a Sobrero y Ronco (2004), la germinación de plántulas defectuosas debe considerarse parte de la acción herbicida de este tipo de productos y/o compuestos, ya que sus efectos negativos, como la coloración oscura en la radícula y deformaciones severas en el hipocótilo, suelen ser letales.

En términos generales, el modo de acción de los fenoles consiste en alterar el balance hormonal en las plantas al reducir o sinergizar la concentración de auxinas (como el Ácido Indol Acético, AIA),

lo que a su vez interfiere con la regulación del crecimiento celular. Algunos de estos compuestos inhiben la acción de las giberelinas, ya sea porque afectan su síntesis o procesos mediados por las mismas. Además, pueden inducir un aumento de hormonas relacionadas al estrés en las plantas, como el ácido abscísico, que limitan el crecimiento. Los flavonoides, por su parte, pueden afectar la actividad enzimática, estimulando o inhibiendo enzimas claves de la fisiología vegetal según la concentración, lo que impacta en la síntesis de proteínas y en el metabolismo de la germinación (Sampietro, 2001).

Continuando con el análisis estadístico de los resultados de este trabajo, se encontró una interacción entre el tipo de propóleos y las concentraciones utilizadas. Estos hallazgos coinciden con los de Khakimov *et al.* (2020) y Khuat *et al.* (2023), quienes indicaron que la acción herbicida de soluciones de propóleos depende de varios factores, incluidos el tipo de extracto, la dosis aplicada y la especie vegetal utilizada en el experimento.

En el bioensayo, se destacaron los EP 1, 7, 8 y 10 en la concentración del 100 % (a) ya que lograron una inhibición significativa ($p < 0,05$) de la germinación respecto del resto de los extractos. Esto probablemente se debió a que sus compuestos bioactivos podrían ser más solubles y/o efectivos que los presentes en otros extractos.

De acuerdo a lo reportado por los apicultores que donaron las muestras, en cercanías de los apiarios de las muestras 1 y 8, había una amplia y variada flora que en ambos casos incluyó *Baccharis latifolia*. La diversidad en la composición botánica podría haber tenido un efecto sinérgico que potenció la actividad de los diferentes compuestos presentes en el propóleos (Murcia Alonso, 2023). A su vez, propóleos recolectados en áreas con presencia del género *Baccharis* presentan un perfil químico notablemente rico en flavonoides como quercetina, apigenina y naringenina, y diterpenos y triterpenos, con amplios efectos biológicos (Prada *et al.*, 2016). Dias *et al.* (2017) encontraron que extractos acuosos y etanólicos de tres especies de *Baccharis*, que contenían diversos fenoles y flavonoides, inhibieron fuertemente la germinación de lechuga y de la maleza llamada “romerillo” (*Bidens pilosa*), ambas especies perteneciente a la familia Asteraceae, demostrando su poder herbicida, que fue relacionado a las propiedades alelopáticas de dicho género.

En cuanto a los EP 7 y 10 al 100 % (a), el género *Salix* fue una de las fuentes botánicas en común para ambas muestras. Estudios previos realizados en propóleos provenientes de zonas con presencia de árboles del mencionado género, revelaron un perfil de flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles y flavanonas que convierten a estos propóleos en candidatos interesantes para aplicaciones farmacéuticas y agrícolas (Salamanca Grosso *et al.*, 2007). Un metabolito secundario típico de estas plantas es el ácido salicílico (de Ugaz, 1987). Este último es parte de mecanismos de defensa contra patógenos, estrés ambiental, e incluso en procesos de regulación del crecimiento, y ha demostrado tener efecto alelopático sobre la germinación de semillas de hortalizas (Dzib-Ek *et al.*, 2021).

En cuanto a los valores intermedios de inhibición de la germinación, que oscilaron entre el 53 % y el 70 %, se encuentran, en orden creciente, las soluciones 5, 2 y 6, con una elevada proporción de semillas no germinadas y un considerable número de plántulas defectuosas. Estas muestras presentaron los valores de ES más bajos, lo que podría indicar que el contenido de compuestos fenólicos presentes en las soluciones influyó en su bioactividad (Talero *et al.*, 2012).

Por último, los tratamientos con los EP 3, 4 y 9 presentaron los menores porcentajes de inhibición de la germinación, incluso en sus concentraciones al 100 % (a). No obstante, en estos tratamientos, al igual que en el caso anterior, se encontró una alta proporción de plántulas defectuosas, por lo que podrían tener potencial como herbicidas. Cabe mencionar que el EP3, si bien tuvo el valor de ES (16,34 %) más elevado, la presencia de pupas y larvas de insectos que degradan (“apolillan”) a los productos apícolas en la muestra bruta, indicó que la misma no fue bien almacenada durante la postcosecha. Debido a esto, los fenoles presentes podrían haberse degradado y haber perdido eficacia (Jeliński, 2002).

4.4. Potencial del propóleo en la agricultura

Las muestras de propóleo evaluadas en este ensayo demostraron su potencial como bioherbicidas. Dado que la especie vegetal utilizada como modelo en este ensayo, *Lactuca sativa*, pertenece a la familia Asteraceae, a la cual pertenecen la mayoría de especies de malezas, los resultados obtenidos son de gran interés. Esto sugiere que el propóleo podría contribuir al control de especies vegetales problemáticas en los sistemas agrícolas de Argentina (Busso *et al.*, 2013). En base a lo expuesto anteriormente, será importante determinar las concentraciones óptimas necesarias de cada muestra, para cada especie de maleza a combatir y/o contexto agrícola.

Por otro lado, además de su actividad herbicida, otras investigaciones sugieren que el propóleo podría ser un agente multifuncional en la agricultura, presentando propiedades antifúngicas y nematocidas (Cibanal *et al.*, 2021 y 2022; Bankova y Popova, 2023). La aplicación de propóleo en el suelo, antes de la siembra, no solo contribuiría a prevenir la germinación de malezas, sino que, podría reducir el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos disminuyendo así el riesgo de enfermedades en los cultivos (Huaytalla Alemán *et al.*, 2018).

5. Conclusión

Los hallazgos del estudio validan la hipótesis planteada inicialmente, dado que todas las soluciones acuosas de propóleos mostraron efectos herbicidas sobre la germinación de semillas de lechuga. A su vez, existieron variaciones según la procedencia de las muestras y las dosis, confirmando que tanto el origen del propóleos como la concentración del extracto influyen en su efectividad.

Se concluye, por lo tanto, que el uso de propóleos como bioherbicida en la agricultura podría ser una alternativa viable para el control de malezas, abriendo una puerta interesante hacia la formulación de herbicidas orgánicos. Será fundamental realizar estudios adicionales para caracterizar y mejorar su eficacia; realizar nuevos estudios que permitan determinar su vida media en el caldo de aspersión, así como su comportamiento en el suelo y su respuesta al ambiente. Esto incluye evaluar su volatilidad, reacción a la luz, residualidad y otros factores clave que influirían en su desempeño como bioherbicida.

6. Bibliografía

- Almuhayawi, M. S. (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 3079-3086.
- Álvarez-Holguín, A., Morales-Nieto, C. R., Melgoza-Castillo, A., & Méndez-Zamora, G. (2017). Germinación de genotipos de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*) bajo diferentes presiones osmóticas. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 4(10), 161-168.
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., ... & Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1695-1703.
- Aragão, F. B., Palmieri, M. J., Ferreira, A., Costa, A. V., Queiroz, V. T., Pinheiro, P. F., & Andrade-Vieira, L. F. (2015). Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy Journal*, 35(1), 259-272.
- Azcón-Bieto, J., y Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Bankova, V., & Marcucci, M. C. (2015). Standardization of propolis: present status and perspectives. *Bee World*, 81(4), 182-188.
- Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: A review. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 734-743.
- Bankova, V., & Popova, M. (2023). Propolis: Harnessing Nature's Hidden Treasure for Sustainable Agriculture. *Agrochemicals*, 2(4), 581-597.
- Bastos, E. M. A. F., Galbiati, C., Loureiro, E. M., & Scoaris, D. O. (2011). Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63, 1255-1259.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., y Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propóleo argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23, 369-372.
- Bucio-Villalobos, C. M., & Martínez-Jaime, O. A. (2017). Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleos del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 223-227.
- Busso, C. A., Bentivegna, D. J., & Fernandez, O. A. (2013). A review on invasive plants in rangelands of Argentina. *Interciencia*, 38(2), 95-103.

- Carranza, C., Castellanos, G., Deaza, D., & Miranda, D. (2016). Efecto de la aplicación de reguladores de crecimiento sobre la germinación de semillas de badea (*Passiflora quadrangularis* L.) en condiciones de invernadero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 284-291.
- Castelo, K. (2018). *Estudo químico dos extratos ativos de bacuri (Platonia insignis)*. 126 f. Dissertação [Mestrado em Química]. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- Cibanal, I. L., Krepper, G., Fernández, L. A., & Gallez, L. M. (2017). Caracterización físico-química de propóleos argentinos para su uso como biofungicida agrícola. In *IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico-CONCYT 2017*.
- Cibanal, I., Fernández, L., Krepper, G., Pellegrini, C., & Gallez, L. (2019). Avances en el desarrollo de un biofungicida: caracterización físico-química y actividad antifúngica de propóleos. *Agrociencia (Uruguay)*, 23(2), 99-108.
- Cibanal, I. L., Fernandez, L. A., Murray, A. P., Pellegrini, C. N., y Gallez, L. M. (2021). Propolis extract and oregano essential oil as biofungicides for garlic seed cloves: in vitro assays and synergistic interaction against *Penicillium allii*. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1909-1918.
- Cibanal, I. L. (2022). *Estudio del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano para el control de fitopatógenos de importancia en la producción hortícola* [Tesis de Doctorado en Agronomía]. Universidad Nacional del Sur.
- Cibanal, I. L., Fernández, L. A., Rodriguez, S. A., Pellegrini, C. N., & Gallez, L. M. (2022). Propolis extract combined with oregano essential oil applied to lima bean seeds against *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 164(1), 33-43.
- Cordero, R. A., & Stéfano, J. F. (1991). Efecto del estrés osmótico sobre la germinación de semillas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae). *Revista de biología tropical*, 39(1), 107-110.
- Dadgostar, S., y Nozari, J. (2020). Evaluation of propolis extract in preventing weed seed germination. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 10(4), 125-130.
- Da Silva Frozza, C. O., Garcia, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., ... & Roesch-Ely, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 137-142.
- Dias, M. P., Nozari, R. M., & Santarém, E. R. (2017). Herbicidal activity of natural compounds from *Baccharis* spp. on the germination and seedlings growth of *Lactuca sativa* and *Bidens pilosa*. *Allelopathy Journal*, 42(1), 21-36.

- Dunan, L., Malanga, T., Benhamou, S., Papaiconomou, N., Desneux, N., Lavoit, A. V., & Michel, T. (2023). Effects of essential oil-based formulation on biopesticide activity. *Industrial Crops and Products*, 202, 117006.
- Dzib-Ek, G., Villanueva-Couoh, E., Garruña-Hernández, R., Vergara Yoisura, S., & Larqué-Saavedra, A. (2021). Efecto del ácido salicílico en la germinación y crecimiento radicular del tomate. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(4), 735-740.
- Esposito, C., Garzarella, E. U., Bocchino, B., D'Avino, M., Caruso, G., Buonomo, A. R., ... & Daglia, M. (2021). A standardized polyphenol mixture extracted from poplar-type propolis for remission of symptoms of uncomplicated upper respiratory tract infection (URTI): A monocentric, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine*, 80, 153368.
- Fernandes-Silva, C. C., Lima, C. A., Negri, G., Salatino, M. L., Salatino, A., y Mayworm, M. A. (2015). Composition of the volatile fraction of a sample of Brazilian green propolic and its phytotoxic activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(15), 3091-3095.
- Figueiredo, F. J. B., Dias-Souza, M. V., Nascimento, E. A., & Lima, L. D. (2015). Physicochemical characterization and flavonoid contents of artisanal Brazilian green propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 64-8.
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee World*, 60(2), 59-84.
- Gonnet, M. (1968). Propriétés phytoinhibitrices de quelques substances extraites de la colonie d'abeilles (*Apis mellifica* L.). I. Action sur la croissance de "*Lactuca sativa*". *Les Annales de l'Abeille*, 11(1), 41-47.
- Huaytalla Alemán, R. M., Gálvez Ramírez, C. M., Carhuapoma-Yance, M., Alvarez-Paucar, M. A., & López Guerra, S. (2018). Efecto inhibitor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15 % y 30 % frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. *Revista Estomatológica Herediana*, 28(1), 36-43.
- Isla, M. I., Nieva Moreno, M. I., Zampini, C., Solórzano, E., Danert, C., Salas, A., ... & Ordóñez, R. (2013). Argentine propolis: flavonoid and chalcone content and its relation with the functional properties. *Beneficial Effects of Propolis on Human Health and Chronic Diseases*, 161-170.
- Jeliński, W. (2002). Acaro-entomological contaminations of propolis. *Journal of Apicultural Science*, 46, 17-23.
- Khakimov, A. A., Omonlikov, A. U., & Utaganov, S. B. U. (2020). Current status and prospects of the use of biofungicides against plant diseases. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 119-126.

- Khuat, Q. V., Kalashnikova, E. A., Nguyen, H. T., Trukhachev, V. I., & Kirakosyan, R. N. (2023). In Vitro Effect of Purple Amomum (*Amomum longiligulare* TL Wu) Extracts on Seed Germination and Seedling Growth of Different Crop Species. *Horticulturae*, 9(5), 554.
- Lima, I. J. C. D. (2018). *Propriedades de agregação do composto bioativo Artepilina C e interações com agregados anfífilos de interesse biológico* [Doctoral dissertation]. Universidade de São Paulo.
- Murcia Alonso, B. (2023). *Revisión bibliográfica sobre la capacidad antimicrobiana del extracto de propóleo*. [Tesis de Grado en Farmacia]. Universidad Europea.
- Natera, J. R. M., Pérez, F. T. Y., & Pinto, J. F. M. (2010). Germinación y Desarrollo de Plántulas de Tres Híbridos de Maíz bajo Soluciones Osmóticas. IV. Manitol. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 23(1).
- Peixoto, M., Freitas, A. S., Cunha, A., Oliveira, R., & Almeida-Aguiar, C. (2022). Mixing propolis from different apiaries and harvesting years: towards propolis standardization. *Antibiotics*, 11(9), 1181.
- Prada, J., Ordúz-Díaz, L. L., & Coy-Barrera, E. (2016). *Baccharis latifolia*: Una Asteraceae poco valorada con potencialidad Química y Biológica en el Neotrópico. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(1), 92-105.
- Salamanca Grosso, G., Correa Carvajal, I. L., & Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootechnia Tropical*, 25(2), 95-102.
- Salas, A. L., Correa Uriburu, F. M., Zampini, I. C., Arias, M., Nieva Moreno, M. I., Santillán Deiú, A., ... Isla, M. I. (2020). Hydroalcoholic gel with Argentine propolis: the potential for antimicrobial and antioxidant activities, stability evaluation, and *in vitro* phenolic release. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 735–743.
- Sampietro, D. A. (2001). Alelopatía Concepto, características, metodología de estudio e importancia. *Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes*.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 206439.
- Simone-Finstrom, M., & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41(3), 295-311.
- Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización*,

intercalibración, resultados y aplicaciones. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 63-70.

- Talero, C., Hernández, D., & Figueroa, J. (2012). Calidad microbiológica de propóleo crudo y sólidos solubles de extractos de propóleos de *Apis mellifera* en Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 59(2), 109-118.
- Tolosa, L., & Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 43(1-2), 187-204.
- de Ugaz, O. L. (1987). Productos naturales: importancia y perspectivas. *Revista de Química*, 1(1), 49-54.
- Wagh, V. D. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2013(1), 308249.
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105.