



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES**

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DE
LA COMPOSICIÓN EN COMPUESTOS FENÓLICOS DE PROPÓLEOS
DE LA REGIÓN METROPOLITANA DE SANTIAGO, CHILE”**

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

ROMINA ALEJANDRA SALINAS SALINAS

PROFESOR PATROCINANTE
DRA. CARLA DELPORTE VERGARA

DIRECTOR DE MEMORIA
DRA. CARLA DELPORTE VERGARA

SANTIAGO – CHILE

2012

Circulación Restringida 2012-2014

“Después de escalar una montaña muy alta,
descubrimos que hay muchas otras montañas por escalar”

Nelson Mandela

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que colaboraron directa o indirectamente en el logro de mi objetivo, especialmente a mi madre María Salinas por todo lo entregado durante mis años de existencia.

Agradezco a mis tíos y tías que siempre me apoyaron durante este largo camino. En especial a mi tío Jorge quien fue un pilar fundamental para lograr mi meta y a mi tío Mario quien estaría orgulloso de mí en estos momentos.

Doy gracias también a mis abuelos César Salinas y María Hernández quienes con mucho amor me entregaron valores fundamentales en mi vida.

También agradezco a todos mis primos que siempre me dieron apoyo y animo, en el especial a Leonel Leal y Daniela Salinas quienes me ayudaron a escribir mi proyecto.

Además deseo expresar mis agradecimientos al laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en especial a la profesora Dra. Carla Delporte por el apoyo, presencia y disposición para llevar a cabo mi propósito.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Catalina Figueroa, Cristian Cáceres, Daniela Jara y Jorge Arancibia por los gratos momentos vividos. Igualmente doy un especial reconocimiento a Consuelo Castro y Gabriela Valenzuela quienes fueron mis guías para el desarrollo de este proyecto y con paciencia y dedicación me ayudaron a llevar a un buen puerto mi investigación. También doy gracias a Paola Guzmán por su disposición y ayuda tanto en lo profesional como en lo personal. Asimismo agradezco a David Aravena por su disponibilidad y paciencia entregada y a María Isabel Pino por momentos compartidos.

A mis compañeros de carrera y amigos Jennifer Scott, Fabián Godoy, Pablo López, Georgina Larraín, Jenniffer Valenzuela, Patricio García, Patricio Torres, Valeska Rojas y a todos los que estuvieron a mi lado en esta etapa de mi vida. Gracias por convertir este proceso en una experiencia tan entretenida.

Finalmente doy gracias a Claudia Ortega y Joyce Casapia quienes con su apoyo y confianza me introdujeron en el mundo laboral.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	I
TABLA DE ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Métodos de recolección de propóleo	3
1.2 Propóleo y actividad antioxidante	4
II. HIPÓTESIS	6
III. OBJETIVOS	7
3.1 Objetivos generales	7
3.2 Objetivos específicos	7
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1 Reactivos	8
4.2 Estudio químico	8
4.2.1 Material de análisis	8
4.2.2 Caracterización sensorial del propóleo en bruto	8
4.2.3 Preparación de los EEG libres de cera	9
4.2.4 Determinación de los perfiles cromatográficos de los diferentes EEG por cromatografía en capa fina (CCF)	11
4.2.5 Determinación de la cantidad de fenoles totales de los EEG mediante la reacción de Folin-Ciocalteu	12
4.2.6 Determinación de la cantidad de flavonoides totales de los EEG mediante la reacción de $AlCl_3$	12
4.3 Ensayos para determinar la actividad antioxidante de los EEG	13
4.3.1 Cinética de atrapamiento del radical DPPH	13
4.3.2 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) de los EEG	15
4.4 Análisis estadístico	15

V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
	5.1 Estudio químico	16
	5.1.1 Caracterización sensorial de los propóleos en bruto	16
	5.1.2 Preparación de EEG secos y libres de cera	18
	5.1.3 Cromatografías en capa fina de los distintos EEG de propóleos	19
	5.1.3.1 Cromatografía en capa fina revelada con Liebermann-Burchard y observada al visible	19
	5.1.3.2 Cromatografía en capa fina revelada con NP y observada al UV-365 nm	20
	5.1.3.3 Cromatografía en capa fina revelada con ρ -anisaldehído sulfúrico y observada al visible	21
	5.1.4 Determinación de la cantidad de fenoles totales de los EEG mediante la reacción de Folin-Ciocalteu	24
	5.1.5 Determinación de la cantidad de flavonoides totales de los EEG mediante la reacción de $AlCl_3$	26
	5.2 Ensayos para determinar la actividad antioxidante	30
	5.2.1 Cinética de atrapamiento del radical DPPH	30
	5.2.2 Poder reductor de Fe^{+3} (FRAP) de los EEG	37
VI.	CONCLUSIONES	41
VII.	REFERENCIAS	43
VIII.	ANEXOS	51

TABLA DE ABREVIATURAS

A_f :	Absorbancia en el estado estacionario
AH:	Antioxidante
$AlCl_3$:	Tricloruro de aluminio
A_0 :	Absorbancia en el tiempo cero
CCF:	Cromatografía en capa fina
CE_{50} :	Concentración inhibitoria 50
CLAE:	Cromatografía líquida de alta eficiencia
DPPH:	Radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo
DPPH rem:	Radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo Remanente
DS:	Desviación estándar
EA:	Eficiencia antioxidante
EEB:	Extracto etanólico global de Buin
EECM:	Extracto etanólico global de Cajón del Maipo
EECA:	Extracto etanólico global de Caleu
EECU:	Extracto etanólico global de Curacaví
EEG:	Extracto etanólico global
EELC:	Extracto etanólico global de Lo Cañas
EEP:	Extracto etanólico global de Pirque
EtOH:	Etanol
Fe^{+2} :	Ion ferroso
Fe^{+3} :	Ion férrico
$FeCl_3$:	Tricloruro férrico
FRAP:	Poder reductor del hierro
HCl:	Ácido clorhídrico
H_2SO_4 :	Ácido sulfúrico
MeOH:	Metanol
NP:	Natural product
p.a.:	Para análisis.
Rf:	Factor de retención
ROS:	Especies reactivas de oxígeno

S:	Peso de la Placa de Petri con extracto etanólico global
T:	Peso de la Placa de Petri sin extracto etanólico global
TE ₅₀ :	Tiempo Efectivo 50
TPTZ:	2, 4, 6-tri (2-piridil) triazina
X:	Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico global.
Z:	Peso inicial del propóleo
°C:	Grados Celsius
Δ ^o t:	Diferencias de temperatura

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características organolépticas de los propóleos en bruto procedentes de la Región Metropolitana de Santiago de Chile	17
Tabla 2: Rendimientos de los EEG secos de las distintas muestras de propóleos de la Región Metropolitana de Santiago de Chile	18
Tabla 3: Contenido de fenoles totales de los distintos EEG de propóleos	25
Tabla 4: Concentraciones de quercetina y sus respectivas absorbancias en el ensayo del AlCl_3	27
Tabla 5: Contenido de flavonoides totales de los EEG de propóleos	28
Tabla 6: Eficiencia antioxidante frente al radical DPPH	35
Tabla 7: Relación entre los fenoles totales, flavonoides totales y eficiencia antioxidante (EA) mediante el coeficiente de Pearson	37
Tabla 8: Concentraciones de FeSO_4 y sus respectivas absorbancias	38
Tabla 9: Valores FRAP de los EEG de propóleos	38
Tabla 10: Relación entre los fenoles totales, flavonoides totales y el poder reductor de Fe^{+3} mediante el coeficiente de Pearson	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Abeja propolizadora	1
Figura 2: Reacción de óxido-reducción del radical DPPH frente a un agente antioxidante	13
Figura 3: Muestras de propóleo en bruto de las distintas localidades de la Región Metropolitana de Santiago de Chile	16
Figura 4: Resumen del procedimiento para obtener a partir de los propóleos en bruto los EEG secos y libres de cera	18
Figura 5: CCF de los EEG revelada con el reactivo Liebermann-Burchard y observada al visible	19
Figura 6: CCF de los EEG revelada con el reactivo NP y observada a la luz UV-365 nm	20
Figura 7: CCF de los EEG revelada con el reactivo p-anisaldehído sulfúrico y observada al visible	21
Figura 8: Curva de calibración de ácido cafeico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	24
Figura 9: Contenido de fenoles totales expresados en g de ácido cafeico / g de EEG de los propóleos	25
Figura 10: Curva de calibración de quercetina para la determinación de flavonoides totales a través de la reacción de $AlCl_3$	27
Figura 11: Contenido de flavonoides totales expresados en mg de ácido cafeico / g EEG seco	28
Figura 12: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al ácido cafeico a distintas concentraciones	30
Figura 13: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EEB a distintas concentraciones	31
Figura 14: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EECA a distintas concentraciones	31
Figura 15: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EECM a distintas concentraciones	31

Figura 16: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EECU a distintas concentraciones	31
Figura 17: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EELC a distintas concentraciones	32
Figura 18: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EEP a distintas concentraciones	32
Figura 19: %DPPH*remanente vs concentración de ácido cafeico	32
Figura 20: %DPPH*remanente vs Concentración del EEB	33
Figura 21: %DPPH*remanente vs Concentración del EECA	33
Figura 22: %DPPH*remanente vs Concentración del EECM	33
Figura 23: %DPPH*remanente vs Concentración del EECU	34
Figura 24: %DPPH*remanente vs Concentración del EELC	34
Figura 25: %DPPH*remanente vs Concentración del EEP	34
Figura 26: Curva de calibración para la extrapolación de valores FRAP	37
Figura 27: Comparación de los valores FRAP de los EEG de propóleos a los 4, 30 y 60 min de incubación	39

RESUMEN

El propóleo es una sustancia resinosa de aspecto variado elaborado por las abejas *Apis mellifera* L. al que se le han atribuido diversas actividades farmacológicas, entre las que destacan principalmente la antioxidante, antiséptica, antiviral, antifúngica, antiinflamatoria, antiulcerosa, antitumoral, citotóxica e inmunoestimulante, las cuales están directamente relacionadas con su composición química que es muy compleja y variable, ya que hasta hoy se han identificado y descrito más de 300 compuestos, siendo en su gran mayoría de naturaleza fenólica. Es por ello, que el objetivo de esta memoria se enfocó en la evaluación de la actividad antioxidante de las distintas muestras de propóleos pertenecientes a la Región Metropolitana de Santiago, Chile, demostrando que la composición química de los mismos varía según la localidad y el origen botánico.

Las muestras se recolectaron durante la época de primavera del año 2011 en colmenas ubicadas en las localidades de Buin, Caleu, Cajón del Maipo, Curacaví, Lo Cañas y Pirque, manteniendo como principal factor de variación la flora circundante a las colmenas. Una vez recolectados los propóleos fueron tratados con EtOH, para obtener los extractos etanólicos globales (EEG) y así determinar la concentración de compuestos fenólicos totales y la de flavonoides mediante los ensayos de Folin-Ciocalteu y tricloruro de aluminio (AlCl_3) respectivamente. El extracto etanólico global de Curacaví (EECU) presentó el mayor contenido de fenoles totales $29,3 \pm 2,0$ % p/p y el extracto etanólico global de Buin (EEB) exhibió la mayor cantidad de flavonoides $1,43 \pm 0,02$ mg% p/p. Luego, se evaluó la actividad antioxidante de los EEG a través de las metodologías de cinética de decaimiento del radical DPPH y FRAP (Poder reductor de Fe^{+3}). En ambos ensayos EEB presentó la mayor actividad.

Los resultados obtenidos en los ensayos revelan que existe una clara relación entre el contenido de flavonoides y la capacidad del extracto de propóleo de atrapar radicales libres.

Finalmente, se puede concluir que los propóleos incluidos en este estudio presentan actividad antioxidante la cuál varía según la composición en compuestos fenólicos y el origen botánico.

ABSTRACT**Comparative study of the antioxidant activity and phenolic composition of propolis from Metropolitan Region, Chile**

Propolis is a resinous substance of varied appearance made by *Apis Mellifera* L. bees which has been attributed various pharmacological activities, among which mainly antioxidant, antiseptic, antiviral, antifungal, anti-inflammatory, antiulcer, antitumor, cytotoxic and immunostimulant. These activities are related with its chemical composition that is highly complex and variable, because until now it's been identified and described more than 300 compounds, with the vast majority of phenolic nature. That is why the objective of this report is focused on the evaluation of the antioxidant activity of different propolis samples belonging to the Metropolitan Region of Santiago, Chile, showing that the chemical composition of this varies by location and the botanical origin.

Samples were collected during the spring of 2011 in hives located in towns of Buin, Caleu, Cajón del Maipo, Curacaví, Lo Cañas and Pirque. Variety of chemical composition is related with the flora around the hive. Once the propolis were collected, they were treated with EtOH to get the global ethanolic extracts (EEG) and from this, measured concentration of total phenolics and flavonoids using Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride ($AlCl_3$) assays respectively. Global ethanolic extract from Curacaví (EECU) presented the higher total of phenolic content $29,3 \pm 2,0\%$ p/p and global ethanolic extract from Buín (EEB) showed higher flavonoids content $13,19 \pm 0,67\text{mg}\%$ p/p. Then antioxidant activity of EEG was evaluated through DPPH and FRAP (Ferric reducing ability power) methodologies. In both assays EEB presented the greatest activity.

Results obtained in this work showed that there is a relationship between the content of flavonoids and the propolis extract capability to trapping free radicals.

In summary, propolis in this investigation presented antioxidant activity which varies according phenolics compounds composition and botanic origin.

I. INTRODUCCIÓN

Las abejas han existido desde hace más de 125 millones de años (Bankova, 2005a) y la evolución ha permitido que se conviertan en especies capaces de aprovechar prácticamente todos los hábitats de la Tierra. Este éxito se debe en gran parte a su organización como especie y a la utilización de los productos específicos que fabrican, tales como: miel, cera, jalea real y propóleo (Bankova, 2005a; Bankova, 2009).

El propóleo es una sustancia resinosa de aspecto variado elaborado por las abejas *Apis mellifera* L. (Figura 1) en base a exudados de diversas especies vegetales que estos insectos recogen de forma selectiva a partir de yemas florales, brotes de hojas y cortezas de árboles para luego mezclarlos con una enzima de su saliva llamada β -glucosidasa, posteriormente adicionar cera y formar el producto final: propóleo, el cual utilizarán para sellar agujeros en la colmena, fijar los panales de miel, pulir las paredes interiores y proteger la entrada contra los intrusos (Salamanca et al., 2007; Umthong et al., 2011; Young et al., 2002).



Figura 1: Abeja Propolizadora

Desde tiempos remotos, el propóleo ha sido utilizado por el hombre, especialmente en la medicina popular para tratar o aliviar diversas enfermedades. Los egipcios lo empleaban para embalsamar a sus cadáveres, los incas lo utilizaban como antipirético, mientras que los médicos griegos y romanos lo usaban como antiséptico y cicatrizante en el tratamiento de heridas (Castaldo y Capasso., 2002).

Por estos antecedentes, durante los últimos cuarenta años el propóleo se convirtió en uno de los principales focos de interés científico, atrayendo la atención de los investigadores quienes han publicado sobre su composición química, actividad terapéutica, biológica y farmacológica, promoviendo su aplicación en medicina humana y veterinaria, además de la industria alimentaria, farmacológica y cosmética (Bankova et al., 2000; Fokt et al., 2010).

Diversas actividades farmacológicas han sido atribuidas a esta sustancia, entre las que se destacan principalmente la antioxidante, la que será analizada en este estudio; antiséptica, antiviral, antifúngica, antiinflamatoria, antiulcerosa, antitumoral, citotóxica e inmunoestimulante (Fokt et al., 2010; Viuda et al., 2008), las cuales están directamente relacionadas con su composición química, la que es muy compleja y variable, ya que hasta hoy se han identificado y descrito más de 300 compuestos, siendo en su gran mayoría de naturaleza fenólica (De Castro et al., 2001; Peña, 2008). La estructura más sencilla para estos compuestos, es la del ácido benzoico, pero con otros sustituyentes en el anillo, se forman ácidos fenólicos como el cafeico, ferúlico, cumárico y cinámico, comunes en el propóleo (Bedascarrasbure et al., 2004), en el que además podemos encontrar flavonoides, aldehídos y cetonas, lignanos, ácidos grasos y sus ésteres, terpenos, esteroides, aminoácidos, polisacáridos, hidrocarburos, alcoholes, y otros compuestos presentes en trazas (Bankova et al., 2000; De Castro et al., 2001).

No obstante, variados estudios de propóleos de diversas latitudes han demostrado que tanto su composición como su actividad biológica se encuentran directamente relacionadas con las especies vegetales, que visitan las abejas propolizadoras (Bankova, 2005b). Es por ello que el origen botánico es crucial para la caracterización de los propóleos, la que también es afectada por las características geográficas y climáticas del sitio de recolección (Bankova et al., 1998). Un ejemplo de esta variabilidad es que en las zonas templadas del mundo, la fuente de propóleo predominante es el exudado de *Populus* spp. (álamo), mientras que en las regiones tropicales las abejas necesitan buscar fuentes diferentes para fabricar propóleo debido a la escasez de esta especie (Gómez et al., 2006).

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

1.1 Métodos de recolección de propóleo

Los métodos de recolección se basan en la tendencia de las abejas a sellar grietas o fijar componentes de la colonia con propóleo. A partir de ello, se han desarrollado diversos métodos y entre los más difundidos y comúnmente utilizados se describen los siguientes (Papotti et al., 2012):

I. Método de raspado.

El procedimiento consiste en el raspado de propóleo de la superficie interior de la colmena, incluyendo tapa, bastidores y cajas (Papotti et al., 2010), desechando lo que se encuentra en el piso y piquera debido a que generalmente está muy contaminado.

II. Método de mallas matrizadas.

El sistema consiste en placas de madera o de material plástico de aproximadamente 3,5 mm de espesor en las cuales se encuentran estampadas las ranuras en donde se depositará el propóleo. Una vez que las abejas hicieron su trabajo, se procede a retirar las mallas y cosechar el propóleo (Papotti et al., 2012; Papotti et al., 2010).

III. Método de mallas de tejido mosquitero.

El método consiste en la utilización de un tejido de hilos plásticos que se termosella en los bordes antes de comenzar a utilizar. Estos deben colocarse en forma simétrica para que las obreras depositen el propóleo (Papotti et al., 2010).

En el presente estudio, durante la época de primavera del año 2011 se recolectaron por mallas matizadas propóleos de colmenas ubicadas en localidades pertenecientes a la Región Metropolitana de Santiago de Chile. Se eligió este método debido a que es el más común entre los apicultores de nuestro país y es uno de los más óptimos para la recolección, debido a que se disminuye el riesgo de contaminación.

1.2 Propóleo y actividad antioxidante

El oxígeno es un compuesto esencial en el metabolismo de todos los organismos aerobios, ya que participa en diversas reacciones de oxidación, incluyendo la respiración. Durante estos procesos el oxígeno molecular se reduce, dando origen a las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS), las que en su mayoría son radicales libres (López et al., 2007).

Los radicales libres son todas aquellas especies químicas con un electrón desapareado en su orbital más externo lo que hace que sean muy inestables y altamente reactivas. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye células pudiendo alterar estructuras biológicas fundamentales como lípidos de membrana, ácidos nucleicos, proteínas e incluso el ADN. Todo ello se traduce en un aumento del estrés oxidativo que está directamente relacionado con el envejecimiento celular y algunos procesos fisiopatológicos como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y determinadas formas de cáncer (Avello y Suwalsky, 2006; González et al., 2000; López et al., 2007).

Para contrarrestar el estrés oxidativo existen compuestos químicos denominados antioxidantes los que impiden el daño de moléculas biológicas al reaccionar más rápido con los radicales libres y los ROS. (Venereo, 2002).

El cuerpo humano posee diferentes mecanismos de defensa frente a las agresiones oxidativas. Una línea importante son los sistemas enzimáticos, que incluyen la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, a los que se añade una serie de antioxidantes plasmáticos como el glutatión, ácido úrico, albúmina, bilirrubina y ubiquinol. Otros antioxidantes presentes en el organismo son las vitaminas C y E, los carotenoides y los compuestos fenólicos que son aportados por medio de la dieta o a través de fármacos (García et al., 2002).

El propóleo es una materia prima rica en compuestos fenólicos, y como lo han reportado variados estudios posee actividad antioxidante. Es por ello, que esta investigación se enfocó en la evaluación de la actividad antioxidante de las distintas muestras de propóleos pertenecientes a las zonas de Buin, Caleu, Cajón del Maipo, Curacaví, Lo Cañas y Pirque, dentro de la Región Metropolitana de Santiago de Chile, demostrando que la composición química de los propóleos varía según la localidad y el origen botánico, aportando mayores antecedentes acerca del propóleo chileno, ya que a pesar de que en el mundo haya una vasta gama de estudios, en Chile, las investigaciones existentes sobre las características de calidad, composición química y propiedades farmacológicas son limitadas lo que hace aumentar el interés acerca de esta sustancia.

II. HIPÓTESIS

- ➔ Los propóleos de la Región Metropolitana de Santiago de Chile poseen una importante actividad antioxidante vinculada a la composición en compuestos fenólicos.
- ➔ La composición de compuestos fenólicos de los propóleos de la Región Metropolitana de Santiago de Chile varía según el origen botánico.

Nuestras hipótesis se basan en numerosos estudios (Gregoris et al., 2010; Kumazawa et al., 2004; Peña, 2008) realizados con propóleos de distintos orígenes geográficos, en los cuales se señala que las diferentes especies vegetales visitadas por las abejas para la propolización de la colmena son la principal fuente de variación que explica las distintas composiciones químicas entre los propóleos de diferentes orígenes botánicos y estas diferentes composiciones se traducen en distintas actividades farmacológicas.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales

- Efectuar un análisis comparativo del contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante de propóleos recolectados en seis localidades de la Región Metropolitana de Santiago de Chile durante la temporada primaveral.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar en forma comparativa las características organolépticas de las distintas muestras de propóleos.
- Obtener los extractos etanólicos globales (EEG) de las distintas muestras de propóleos.
- Determinar en forma comparativa los perfiles cromatográficos de los EEG de los propóleos en estudio.
- Determinar la concentración de fenoles totales de los EEG de los propóleos en estudio.
- Determinar la concentración de flavonoides de los EEG de los propóleos en estudio.
- Comparar las propiedades antioxidantes de los EEG de los distintos propóleos en estudio.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Metanol, etanol, H₂SO₄ al 98%, HCl al 37%, ácido acético glacial 100% grado de p.a. fueron adquiridos en Merck S.A (Alemania); Reactivo de Folin-Ciocalteu, 4-metoxibenzaldehído, 2-aminoetil difenilborinato fueron adquiridos en Merck S.A (Alemania); Aldehído acético adquirido en Carlo Ebra (Inglaterra); DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil), TPTZ (2,4,6-tripiridil-1,3,5 triazina), fueron adquiridos en Sigma Aldrich (Suiza); FeCl₃, AlCl₃ fueron adquiridos en Fluka Chemica (Suiza).

Sustancias patrón como ácido cafeico (C0625-25G) y quercetina (337951-25G), fueron adquiridos desde Sigma Aldrich (Suiza) y utilizados como reactivos de referencia.

4.2 Estudio químico

4.2.1 Material de análisis

Durante la época de primavera del año 2011 se recolectaron por malla propóleos de colmenas ubicadas en localidades pertenecientes a la Región Metropolitana de Santiago de Chile: Buin, Caleu, Cajón del Maipo, Curacaví, Lo Cañas y Pirque. Las muestras se almacenaron en el laboratorio de productos naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile en congeladores a una temperatura de -20°C, protegidos de la luz y la humedad.

4.2.2 Caracterización sensorial del propóleo en bruto

La determinación del color, olor, sabor, aspecto y consistencia a temperatura ambiente de cada muestra de propóleo, se realizó mediante los sentidos de tres evaluadores en forma independiente. Cada evaluador dispuso de las siguientes alternativas para cada una de las características:

- Color : Amarillo, verde, café, rojo, negro
- Olor : Inodoro, agradable, desagradable, suave, fuerte
- Sabor : Insípido, picante, amargo, dulce
- Aspecto : Homogéneo, heterogéneo
- Consistencia : Maleable o rígida

El evaluador, al describir el olor, color y sabor de las muestras de propóleos podía seleccionar más de una alternativa (Lozina et al., 2010).

Las muestras se colocaron en matraces de vidrio y a través de simple observación se determinó el color y el aspecto, mientras que el olor se estableció mediante el olfato; el sabor, por medio del gusto y finalmente la consistencia por opresión de la muestra con los dedos.

4.2.3 Preparación de los EEG libres de cera

Previo a la preparación de extractos se efectuó el proceso de descerado empleando ciclos de temperatura, según modificación de las metodologías propuestas por Alencar et al. (2007) y Kalogeropoulos et al. (2009).

El procedimiento se realizó pesando 150 g de cada muestra de propóleo en bruto en un vaso precipitado de 1500 mL para luego añadirle 500 mL de EtOH y llevar el recipiente a un baño de agua termorregulado a 70°C durante 30 minutos. Posteriormente se dejó enfriar el vaso a temperatura ambiente y se llevó al congelador a -20°C durante 12 horas.

Transcurrido el tiempo se filtró en frío con papel plegado simple y se conservó el filtrado para luego llevarlo al baño termorregulado y nuevamente repetir el ciclo. Este procedimiento se realizó tres veces para retirar toda la cera posible.

Completado el desecado de las muestras, los filtrados fueron llevados a sequedad en un evaporador rotatorio hasta la total eliminación del solvente y secados a temperatura ambiente. De esta forma se obtuvieron los EEG secos.

Los EEG secos fueron denominados de la siguiente manera:

- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Buin: EEB
- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Caleu: EECA
- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Cajón del Maipo: EECM
- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Curacaví: EECU
- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Lo Cañas: EELC
- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Pirque: EEP

A continuación, se determinó el rendimiento de cada EEG a través de la fórmula 1:

Fórmula 1:

$$\frac{[(S-T) \times 100]}{Z} = X\% \text{ p/p}$$

Donde:

S= Peso de la placa de Petri con extracto etanólico global.

T= Peso de la placa de Petri sin extracto etanólico global.

Z= Peso inicial del propóleo.

X= Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico global expresado en p/p.

4.2.4 Determinación de los perfiles cromatográficos de los diferentes EEG por cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó un análisis cualitativo mediante CCF de los seis EEG en estudio a través de distintas reacciones de coloración, con el objetivo de determinar la probable presencia de familias de compuestos frecuentemente descritos en los propóleos como fenoles, triterpenoides, esteroides, entre otros.

Las cromatografías fueron desarrolladas en cromatofolios de aluminio con Sílica gel 60 F254. Las siembras de las muestras fueron realizadas en forma semicuantitativa a partir de una solución metanólica de los EEG de 8000 ppm. Se empleó como fase móvil una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético glacial (60:40:1) para luego ser visualizados a luz ultravioleta a las longitudes de onda 254 y 365 nm y reveladas con los siguientes reactivos (Wagner y Bladt, 1996):

- Liebermann-Burchard: (5 mL de anhídrido acético, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 50 mL de etanol absoluto) La placa rociada con este reactivo fue calentada a 100°C por 2 min y observada al visible. Este revelador permitió detectar la posible presencia de triterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y esteroides.
- Natural products (NP): El cromatofolio fue rociado con la solución NP (2-aminoetil difenilborinato al 1% en metanol) y observada a luz UV a una longitud de onda de 365 nm. Este reactivo permitió detectar la posible presencia de flavonoides, ácidos fenólicos y cumarinas.
- p-anisaldehído sulfúrico: (0,5 mL de anisaldehído, 10 mL ácido de acético glacial, 85 mL de etanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado) El cromatofolio rociado con este reactivo fue calentado a 100°C por 2 min y observado al visible. Este reactivo permitió detectar la posible presencia de triterpenoides, saponinas y aceites esenciales.

4.2.5 Determinación de la cantidad de fenoles totales de los EEG mediante la reacción de Folin-Ciocalteu

Para determinar la cantidad de fenoles totales presentes en los distintos EEG de propóleo, se empleó el método de Folin-Ciocalteu según lo propuesto por Cicco et al. (2009). Este se basa en la oxidación de los fenoles, en medio alcalino, con el reactivo de Folin-Ciocalteu, el que corresponde a un polianión de fosfomolibdato y fosfotungstato. Este reactivo forma un complejo de color azul con los fenoles cuyo máximo de absorbancia se encuentra cercano a los 760nm.

Se mezclaron 100 μ L de una solución metanólica de EEG seco de 1000 ppm con 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, se esperaron 2 min y luego se agregaron 800 μ L de carbonato de sodio al 5%. Esta mezcla se calentó en un baño a 40°C por 20 min, luego se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Unicam UV-VIS. Las muestras fueron analizadas en triplicado.

El contenido de fenoles fue expresado en ácido cafeico. Con este fin se construyó una curva de calibración con este ácido fenólico utilizando las siguientes concentraciones: 2, 3, 4, 5 y 6 μ g/mL.

El promedio de las absorbancias para cada muestra fue interpolado en la curva de calibración para determinar la concentración de fenoles totales.

4.2.6 Determinación de la cantidad de flavonoides totales de los EEG mediante la reacción de $AlCl_3$

Para determinar la cantidad de flavonoides totales de cada muestra de propóleo, se utilizaron siete matraces de 10 mL. A cada uno de ellos se le agregaron 200 μ L de $AlCl_3$ y una cantidad determinada de una solución metanólica de los EEG secos de 4000 ppm para luego aforar con MeOH. En los matraces de Buin y Caleu se le añadió 0,5 mL de dicha solución etanólica, mientras que en los de Cajón del Maipo, Curacaví,

Lo Cañas y Pirque se les agregaron 1,5 mL (con el objetivo de cumplir con la ley de Beer). Al blanco se le incorporó la muestra y MeOH hasta aforar.

Posteriormente, las muestras se dejaron reposar durante 30 min en oscuridad para luego colocarlas en la cubeta de cuarzo del espectrofotómetro Unicam UV-VIS y leer la absorbancia a 465 nm. El resultado fue interpolado en una curva de calibración previamente construida con quercetina a concentraciones de 2,4; 3,2; 4,0; 4,8; 5,6; y 6,4 $\mu\text{g/mL}$ (Mendes et al., 2006). Los resultados se expresaron en mg% p/p de EEG.

4.3 Ensayos para determinar la actividad antioxidante de los EEG

4.3.1 Cinética de atrapamiento del radical DPPH

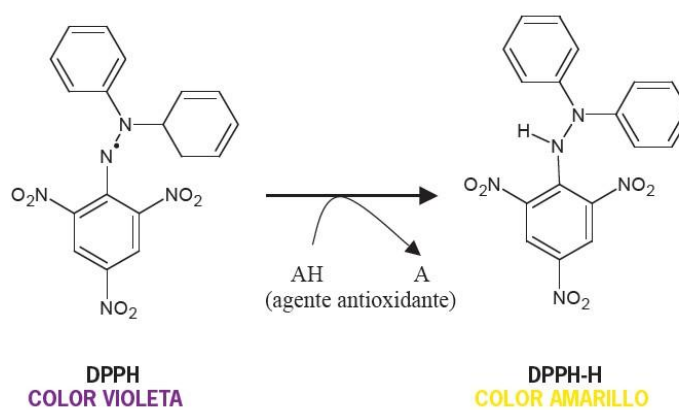
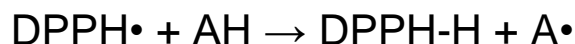


Figura 2: Reacción de óxido-reducción del radical DPPH frente un agente antioxidante

El DPPH es un radical estable de color violeta que en presencia de un agente antioxidante se reduce (Ecuación 1) cambiando su color a amarillo (Figura 2) (López et al., 2007; Restrepo et al., 2010):

Ecuación 1:



El radical estable 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo, se encuentra disponible en el mercado y posee un espectro al UV con un máximo de absorbancia a 517 nm. La adición de un antioxidante resulta en una disminución de absorbancia proporcional a la concentración y actividad del mismo (Villaño et al., 2007). Un volumen de 25 μL de cada muestra en solución fue agregada a 975 μL de solución de DPPH (62 μM) y se determinó la cinética de decaimiento por atrapamiento del radical. La absorbancia fue registrada hasta alcanzar el estado estacionario. Los resultados fueron expresados como eficiencia antioxidante (EA) según la siguiente fórmula:

Ecuación 2:

$$\text{EA} = 1/(\text{CE}_{50} \times \text{TE}_{50}) \text{ en donde;}$$

CE_{50} corresponde a la concentración de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% la concentración del radical DPPH; ésta será calculada desde una curva % DPPH remanente vs concentración de la muestra; el % DPPH remanente (% DPPH rem) será determinado de la siguiente forma:

Ecuación 3:

$$\% \text{DPPH rem} = (A_f/A_0) \times 100 \text{ en donde;}$$

A_0 es la absorbancia a tiempo cero y A_f la absorbancia en el estado estacionario.

Por último, TE_{50} se define como el tiempo en que el antioxidante a una concentración igual a su CE_{50} alcanza el estado estacionario.

El compuesto de referencia utilizado fue el ácido cafeico. Las muestras a evaluar fueron las soluciones metanólicas de los EEG secos. Las de Buin, Caleu y Curacaví se prepararon a 1000 ppm, en cambio las de Cajón del Maipo, Lo Cañas y Pirque fueron

preparadas a 2000 ppm. Dichas concentraciones fueron determinadas con el fin de que el rango de absorbancias cumpliera con la ley de Beer.

4.3.2 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) de los EEG

Este ensayo consiste en la formación de un complejo férrico con el reactivo TPTZ, el cual en presencia de antioxidantes forma un complejo azul de máxima absorción a 593 nm por reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} (Restrepo et al., 2009). En este estudio los datos se expresaron en mmol Fe^{+2} /g de EEG seco. Las muestras a evaluar fueron las soluciones metanólicas de los EEG secos de 2000 ppm.

Para medir las muestras en el ensayo se utilizó el protocolo experimental descrito por Benzie y Strain (1996), pero modificado en términos de lapso de tiempo. La reacción se evaluó a los 4, 30 y 60 min y los reactivos utilizados fueron: 1020 μl de buffer acetato de sodio, 300 mM a pH 3,6; 100 μl de TPTZ, 10 mM y 100 μl de AlCl_3 , 20 mM; los cuales fueron mezclados con una alícuota de 10 μl de la muestra de 2000 ppm. A continuación, la mezcla se incubó a 37 °C durante 4, 30 y 60 min y luego se leyó la absorbancia a 593 nm usando un espectrofotómetro Unicam UV-VIS. El valor FRAP fue determinado interpolando la absorbancia de la muestra en la curva de calibración previamente construida con sulfato ferroso a 13,7; 18,3; 22,9; 27,5; y 32,1 $\mu\text{g/mL}$.

4.4 Análisis Estadístico

Todas las muestras fueron analizadas en triplicado en cada uno de los ensayos. Los resultados al evaluar la capacidad antioxidante de las muestras fueron sometidos a análisis de varianza de una vía ANOVA y test de Tukey considerándose estadísticamente significativos para $p \leq 0,05$; utilizando el programa Origin Pro 8.6. Para establecer la linealidad de las diferentes curvas se llevaron a cabo análisis de regresión lineal y pruebas de carencia de ajuste.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio Químico

5.1.1 Caracterización sensorial de los propóleos en bruto

Los resultados de los distintos atributos sensoriales de los propóleos estudiados en este trabajo se muestran en la Figura 3 y Tabla 1.

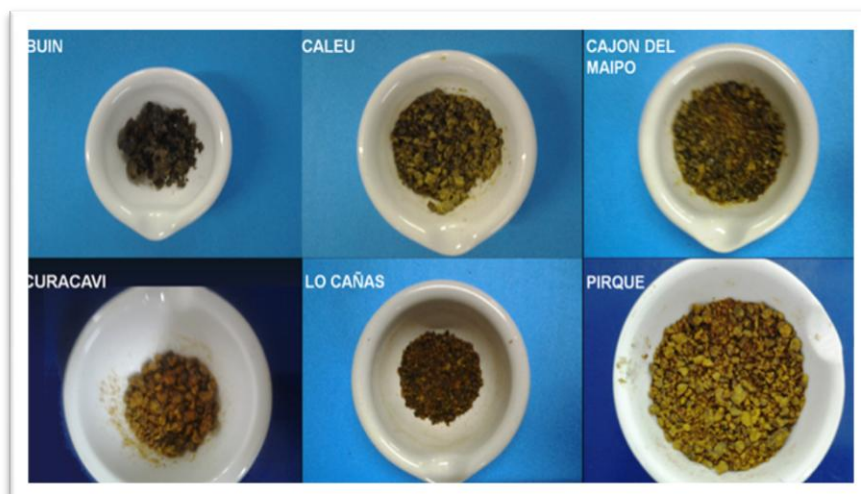


Figura 3: Muestras de propóleo en bruto de las distintas localidades de la Región Metropolitana de Santiago de Chile

Como primera característica para clasificar los propóleos provenientes de diversas localidades se analizó el color. Las muestras presentaron tonalidades cafés, verdes y/o amarillas como se describe en la Tabla 1 y se aprecia en la Figura 3.

El olor que presentaron las muestras fue intenso y agradable para el 50%, y suave y agradable para el otro 50%.

En relación al atributo sabor, la alternativa “insípido” fue seleccionada para el 66% de las muestras, amargo para el 17% y picante para el 17% tal como se aprecia en la Tabla 1.

Tabla 1: Características organolépticas de los propóleos en bruto procedentes de la Región Metropolitana de Santiago de Chile

MUESTRA	PROCEDENCIA		CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS				
	PROVINCIA	LOCALIDAD	COLOR	OLOR	SABOR	ASPECTO	CONSISTENCIA
EEB	Maipo	Buin	Verde Oscuro	Intenso y Agradable	Insípido	Homogéneo	Rígida y Pegajosa
EECM	Cordillera	Cajón del Maipo	Café Claro	Suave y Agradable	Picante	Homogéneo	Maleable
EECA	Chacabuco	Caleu	Amarillo y Verde	Suave y Agradable	Insípido	Heterogéneo	Rígida
EECU	Melipilla	Curacaví	Café Claro y Oscuro	Intenso y Agradable	Insípido	Heterogéneo	Rígida y Pegajosa
EELC	Maipo	Lo Cañas	Amarillo y Café	Intenso y Agradable	Amargo	Heterogéneo	Rígida
EEP	Cordillera	Pirque	Amarillo	Suave y Agradable	Insípido	Homogéneo	Rígida

Por otra parte, un 50% de las muestras presentaron apariencia homogénea, mientras que el mismo porcentaje exhibió una heterogénea.

Finalmente, los ensayos de consistencia realizados a temperatura ambiente mostraron que el 50% de las muestras son rígidas, el 33% rígidas y pegajosas y el 17% maleables.

Montenegro et al. (2001) menciona el predominio del polen de *Baccharis dracunculifolia* DC. en Brasil y de *Baccharis linearis* (Ruiz & Pav.) Pers. en Chile central. Por otra parte, Cuesta et al. (1999) afirma que en Cuba existe predominancia de las especies de *Clusia* spp. Estos estudios avalan que las diferencias de las características organolépticas entre los distintos tipos de propóleo se deben a que estas propiedades dependen del tipo de flora que utilice la abeja propolizadora, del lugar de recolección y del clima del mismo. Además, previo a esta investigación, se realizaron ensayos fisicoquímicos regidos por la norma IRAM, del instituto argentino de normalización-subcomité de productos agroalimentarios del NOA-2008 en donde se determinó la pérdida por calentamiento, cenizas, sustancias extraíbles con n-hexano, resinas solubles en etanol, impurezas mecánicas e índice de oxidación; descritos en el Anexo 1, cuyos resultados muestran diferencias significativas respaldando aun más la afirmación descrita anteriormente.

5.1.2 Preparación de EEG secos y libres de cera

La preparación de los EEG se resume en la Figura 4.

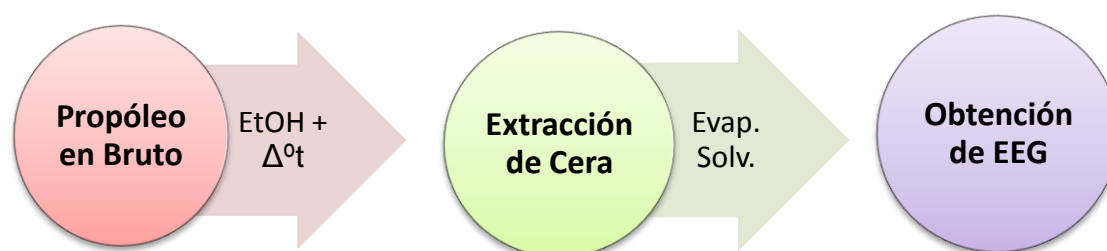


Figura 4: Resumen del procedimiento para obtener a partir de los propóleos en bruto los EEG secos y libres de cera. EtOH: Etanol; $\Delta^{\circ}t$: Diferencias de temperatura; Evap. Solv.: Evaporación del solvente.

Siendo:

- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Buin: EEB
- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Caleu: EECA
- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Cajón del Maipo: EECM
- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Curacaví: EECU
- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Lo Cañas: EELC
- Extracto etanólico global obtenido desde el propóleo de Pirque: EEP

El rendimiento de la obtención de los EEG secos se detalla en la Tabla 2

Tabla 2: Rendimientos de los EEG secos de las distintas muestras de propóleos de la Región Metropolitana de Santiago de Chile

MUESTRA	% RENDIMIENTO EEG
EEB	27,4
EECM	12,3
EECA	17,9
EECU	36,5
EELC	24,3
EEP	31,5

En la Tabla 2 se pueden apreciar las diferencias en el rendimiento respecto de la obtención de los diferentes EEG secos. EECU obtuvo el mayor porcentaje con un 36,5% mientras que EECM obtuvo el menor con un 12,3%.

Estas diferencias se deben principalmente a un mayor o menor contenido de metabolitos secundarios provenientes de las especies vegetales circundantes a las colmenas.

5.1.3 Cromatografías en capa fina de los distintos EEG de propóleos

En las Figuras 5, 6 y 7, podemos observar los cromatogramas de los distintos EEG de los propóleos en estudio, revelados con distintos reactivos reveladores. Cada extracto presentó un perfil cromatográfico diferente lo que se evidenció en el número, color e intensidad de las manchas y las polaridades de los compuestos presentes (en la sílica gel los compuestos polares quedan retenidos en la fase estacionaria, por lo tanto sus R_f o factor de retención son menores).

5.1.3.1 Cromatografía en capa fina revelada con Liebermann-Burchard y observada al visible

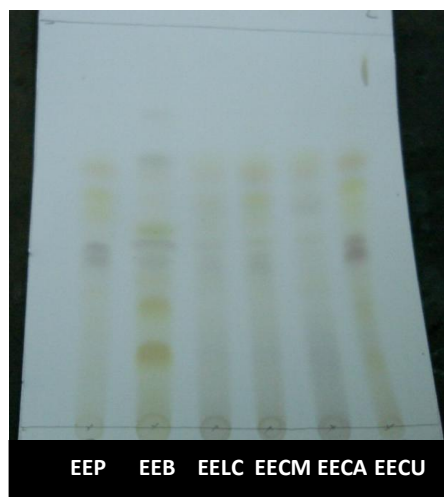


Figura 5: CCF de los EEG revelada con el reactivo Liebermann-Burchard y observada al visible.

Algunos compuestos como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y esteroides se colorean de café oscuro y gris claro con este revelador (Wagner & Bladt, 1996). En la CCF realizada los colores más observados son café, rojos y amarillos, pudiendo existir compuestos que son parte de algunas de las familias arriba mencionadas.

Como se puede observar en la Figura 5, los perfiles cromatográficos con mayores similitudes son los de EELC y el EECA, mientras que los demás EEG presentan diferencias. El EEB es el que muestra las manchas más intensas.

5.1.3.2 Cromatografía en capa fina revelada con NP y observada al UV-365 nm

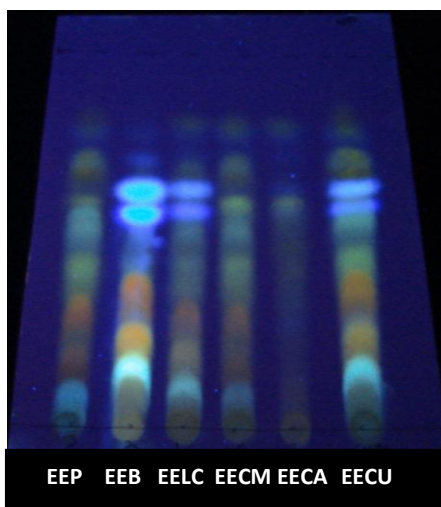


Figura 6: CCF de los EEG reveladas con el reactivo NP y observada a la luz UV-365 nm.

En la CCF realizada, encontramos marcadas fluorescencias verdes, celestes, azules y anaranjadas.

Según la literatura (Wagner & Bladt, 1996), los siguientes compuestos presentan fluorescencias al UV- 365 tras la revelación con NP, pudiendo estar presentes en los EEG evaluados:

➤ Antronas y antranoles	:	Amarillos fluorescentes intensos
➤ Glicósidos flavónicos	:	Naranja, verde y azules
➤ Cumarinas	:	Azules intensos, azules verdosos
➤ Ácidos fenólicos (ácido cafeico)	:	Azules
➤ Flavonoles (quercetina, miricetina)	:	Amarillo anaranjado, amarillo verdoso
➤ Flavonas (apigenina, luteolina)	:	Naranja, amarillo verdoso

Como se aprecia en la Figura 6, existe cierta similitud en los perfiles cromatográficos entre el EECU y el EELC, además existe algún grado de semejanza entre el EEP y el EECM. El EECA presentó un perfil cromatográfico con un menor número de manchas con baja intensidad, en contraste con el EEB cuyo perfil cromatográfico muestra un mayor número de manchas muy intensas.

5.1.3.3 Cromatografía en capa fina revelada con p -anisaldehído sulfúrico y observada al visible

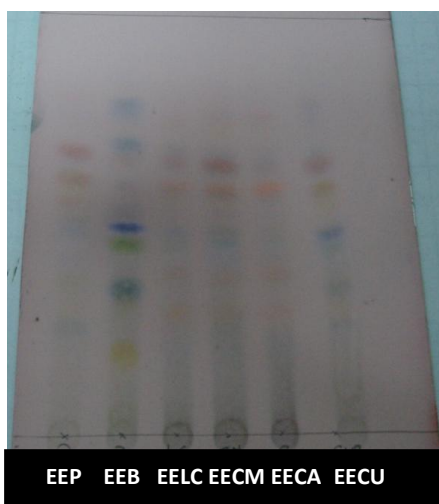


Figura 7: CCF de los EEG reveladas con el reactivo p -anisaldehído sulfúrico y observada al visible.

En la CCF realizadas, destacan principalmente las coloraciones amarillas, naranjas, verdes, rojas y azules.

Según la literatura (Wagner & Bladt, 1996) los siguientes compuestos presentan coloración tras la revelación con p-anisaldehído sulfúrico, pudiendo estar presentes en los extractos evaluados:

- Terpenos : Rojos violetas, café rojizo, azul verdoso, azul y grises
- Aceites esenciales : Azul intenso, verde, rojos y café.
- Saponinas : Azules, azules violetas, rojas, pardos amarillentos
- Triterpenos : Azul violeta, rojo violeta

En la Figura 7 se aprecian con claridad las diferencias entre los perfiles cromatográficos de los EEG. El EEB presentó la mayor cantidad de colores con gran intensidad, mientras que el EELC mostró menor intensidad entre sus manchas en comparación con los demás EEG.

Las diferencias en los perfiles cromatográficos demuestran la diversidad en la composición química de cada uno de los propóleos lo que puede ser explicado en gran parte a la flora circundante. Es importante mencionar que a pesar de que los propóleos analizados corresponden a un área geográfica relativamente pequeña, la composición química del propóleos es diversa. Este hecho refleja la diversidad florística presente en la zona de donde se recolectaron los propóleos.

Como se ha mencionado anteriormente, las muestras de propóleo utilizadas en este estudio pertenecen a distintas localidades de la Región Metropolitana de Santiago de Chile. Esta región posee una flora característica en donde predominan especies tales como: *Quillaja saponaria* Mol., Rosaceae n.v. quillay; *Populus Nigra* L., Salicaceae n.v. álamo negro; *Acacia caven* mol., Fabaceae n.v. espino; *Persea americana* Mill, Lauraceae n.v. palto; *Cryptocarya alba* (Mol.) Looser, Lauraceae, n.v. peumo; *Lithraea caustica* (Mol.) Hook. & Arn, Anacardiaceae n.v. litre; *Eucalyptus globulus* Deane & Maiden, Myrtaceae n.v. eucaliptus; *Rubus ulmifolius* Schott, Rosaceae n.v. zarzamora, *Lotus pedunculatus* Cav., Fabaceae n.v. lotera (Montenegro et al. 2008; Tapia, 2005). Sin embargo, éstas no muestran una distribución uniforme en la región, sino que en cada localidad predominan unas más que otras, lo que conlleva a afirmar que Buin,

Caleu, Cajón del Maipo, Curacaví, Lo Cañas y Pirque presentan distinta abundancia en cada especie vegetal, lo que afectaría en la probabilidad de que la abeja propolizadora visite una especie u otra, repercutiendo directamente en la composición de cada propóleo.

La formación vegetal típica de Buin corresponde principalmente a especies herbáceas y arbustivas, donde la especie predominante es el *Acacia caven* Mol. (Casanova et al, 2010). Se ha reportado que los miembros del género *Acacia* contienen aminas simples, alcaloides, glucósidos cianogénicos, ciclitoles, aceites esenciales, diterpenos, ácidos grasos, fluoroacetato, gomas, triterpenos, fitosteroles, flavonoides, saponinas, y taninos hidrolizables y condensados (Seigler, 2003).

La especie predominante en la zona de Caleu es la *Quillaja saponaria* Mol. Dentro de los principales compuestos aislados se encuentra el ácido quillaico y sus saponinas. También existe la presencia de polifenoles como los ácidos orgánicos: ácidos p-cumárico, cafeico, gentísico, y ferúlico; flavonoides y sus compuestos relacionados: canferol, y quercetina; las antocianinas: cianidina y delfinidina y derivados del benzofurano (Gupta, 2008).

En la zona de Cajón del Maipo, predominan las especies *Cryptocarya alba* (Mol.) Looser, y *Eucalyptus globulus* Labill. La primera, presenta taninos y esencias constituidas por el p-cimol, α -pineno, linalol y limoneno; mientras que la segunda se compone de taninos, azuleno, resina, eucaliptina (flavona) y esencias como el eucaliptol (Artreche et al., 1992).

En Curacaví predomina principalmente la especie *Populus Nigra* L. que presenta terpenoides, flavonoides y sus geninas, chalconas y ácidos fenólicos y sus esteres (Park et al., 2002). Además la caracterización química de su exudado ha permitido la identificación de flavonoides como flavanonas tales como pinocebrina y pinostrobrina, algunos flavonoles tales como galangina, quercetina y canferol, flavonas tales como crisina y apigenina (Dudonn et al., 2011) y ésteres de ácidos fenólicos (Bankova et al., 1988).

La especie *Persea americana* corresponde a la predominante en la zona circundante a las colmenas de Lo Cañas. En esta especie se han identificado peptona, β -galactósido, ácido abscísico glicosilado, alcaloides y aceites volátiles (Mohammad et al., 2010).

Arukwe et al. (2012) describieron la composición química general de las hojas de *P. americana* encontrando que los compuestos tipo flavonoides correspondían a los mayoritarios. También describieron la presencia de saponinas, taninos, alcaloides y esteroides. Vitaminas como retinol, riboflavina, tiamina, niacina, ácido ascórbico y tocoferol también han sido descritas en las hojas de esta especie (Agomuo et al., 2012).

Finalmente, en Pirque existe la predominancia de *Populus Nigra* L. y *Acacia caven* Mol.

5.1.4 Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu

Para determinar la cantidad de fenoles totales en los EEG se obtuvo una curva de calibración de ácido cafeico en un rango de concentración entre 2 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 8) y a partir de la misma se obtuvieron los resultados descritos en la Tabla 3, los cuales se expresaron en g de ácido cafeico en 100 g de EEG seco \pm D.S.

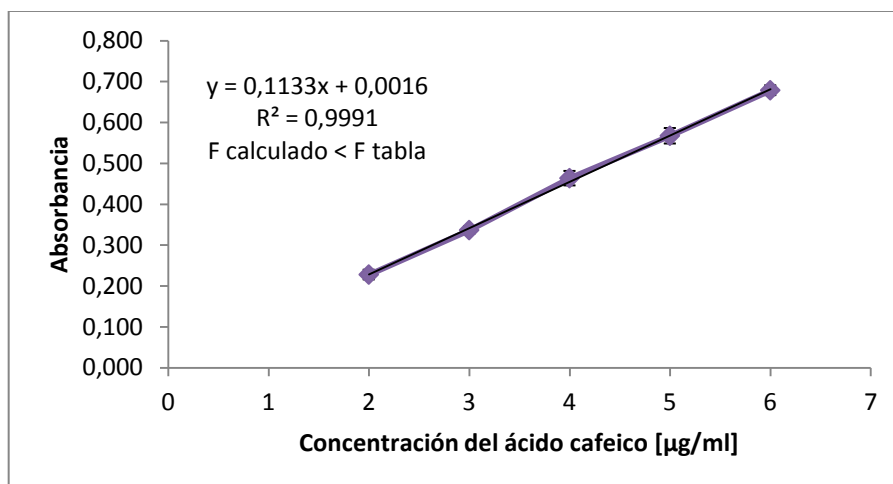


Figura 8: Curva de calibración de ácido cafeico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu

Tabla 3: Contenido de fenoles totales de los distintos EEG de propóleos

Extracto	Fenoles Totales (% p/p)
EECU	29,3 ± 2,0
EELC	27,0 ± 1,7
EEB	25,3 ± 1,5
EECA	23,0 ± 3,4
EECM	23,0 ± 1,0
EEP	28,3 ± 1,3

Al analizar los datos obtenidos a través de ANOVA de una vía y por el ensayo de Tukey, se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) para la mayoría de los propóleos, excepto para el EECA y el EECM que no las exhibieron. Lo mismo se pudo apreciar entre el EELC y el EEP. Estos resultados se pueden verificar en el Anexo 2 y observar gráficamente en la Figura 9.

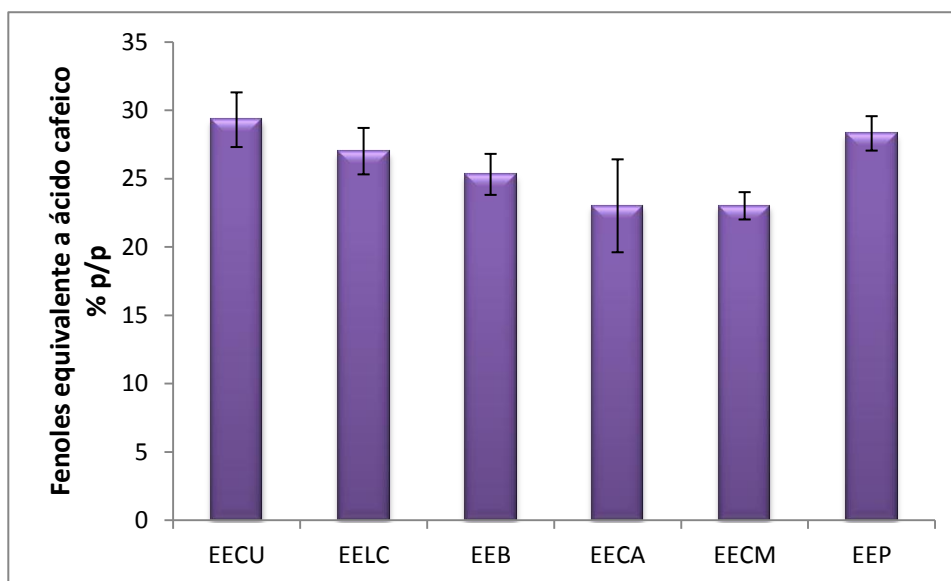


Figura 9: Contenido de fenoles totales expresados en g de ácido cafeico / g de EEG de los propóleos

Además, en la Figura 9 se puede observar que el EECU es el que posee mayor contenido de compuestos fenólicos con un 29,3%; le sigue el EEP con un 28,3%;

posteriormente EELC con un 27,0%; a continuación EEB con un 23,5% y finalmente, en el último lugar EECA y EECM con un 23,0%.

Los porcentajes de compuestos fenólicos determinados en los EEG son mayores a los estimados por Mohammadzadeh et al. (2007) quienes estudiaron propóleos de zonas de Irán encontrando porcentajes que van desde 3 a 8% equivalentes en ácido cafeico.

Esta diferencia probablemente se debe a que las abejas no visitan la misma flora para fabricar el propóleo, ya que a pesar de que las localidades en estudio no presentan gran lejanía, estas si muestran diferencias en la flora circundante a la colmena lo que hace que la concentración de compuestos fenólicos en los diferentes EEG no sea la misma.

Por otra parte, se sabe que el reactivo Folin-Ciocalteu no reacciona sólo con los fenoles, sino que también con una variedad de otros tipos de compuestos reductores. En consecuencia, el reactivo no sólo mide la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra, sino que la capacidad reductora total de la misma (Ikawa et al., 2003)

5.1.5 Determinación de la cantidad de flavonoides totales de los EEG mediante la reacción de $AlCl_3$

Para determinar la cantidad de flavonoides totales en los EEG de propóleos se obtuvo una curva de calibración (Figura 10) de quercetina (sustancias patrón) vs absorbancia en un rango de concentración de 2,4 y 6,4 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 4).

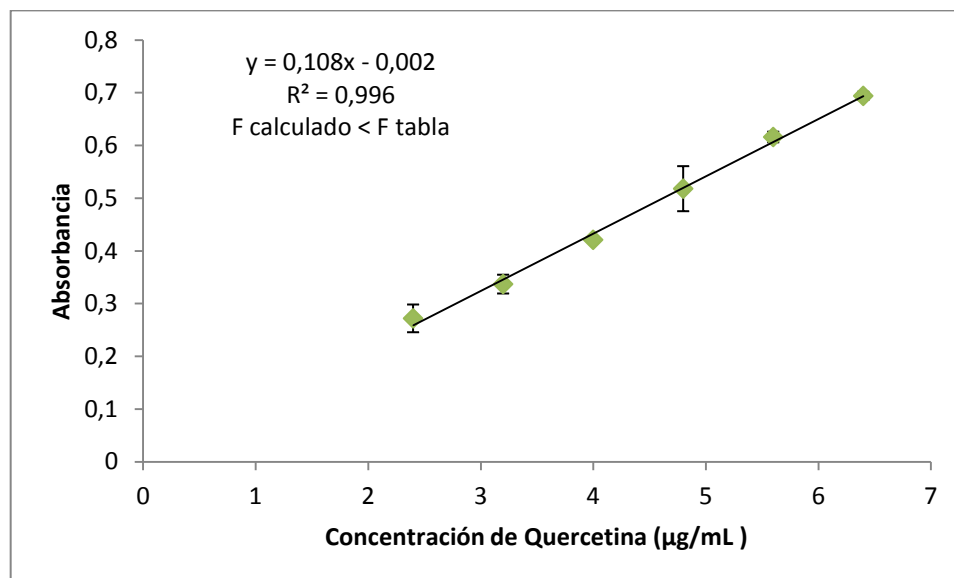


Figura 10: Curva de calibración de quercetina para la determinación de flavonoides totales a través de la reacción de AlCl_3

Tabla 4: Concentraciones de quercetina y sus respectivas absorbancias en el ensayo del AlCl_3

Concentración (µg/mL)	Absorbancia PROM ± D.S
2,4	0,272 ± 0,026
3,2	0,337 ± 0,018
4	0,421 ± 0,001
4,8	0,518 ± 0,043
5,6	0,616 ± 0,010
6,4	0,694 ± 0,008

En base a dicha curva de calibración se obtuvieron los resultados de flavonoides totales descritos en la Tabla 5, los cuales se expresaron en mg% equivalentes a quercetina en 100 g de EEG seco de propóleo ± D.S.

Tabla 5: Contenido de flavonoides totales de los EEG de propóleos

Extracto	Flavonoides Totales (mg% p/p)
EECA	3,63 ± 0,08
EECM	4,58 ± 0,08
EEP	4,01 ± 0,05
EECU	4,73 ± 0,12
EELC	4,80 ± 0,05
EEB	13,19 ± 0,67

Al analizar los datos obtenidos a través de ANOVA de una vía y el ensayo de comparaciones de Tukey, se observó que las diferencias entre las muestras de propóleos fue significativa ($p < 0,05$). Esto se puede verificar en el Anexo 3 y observar gráficamente en la Figura 11.

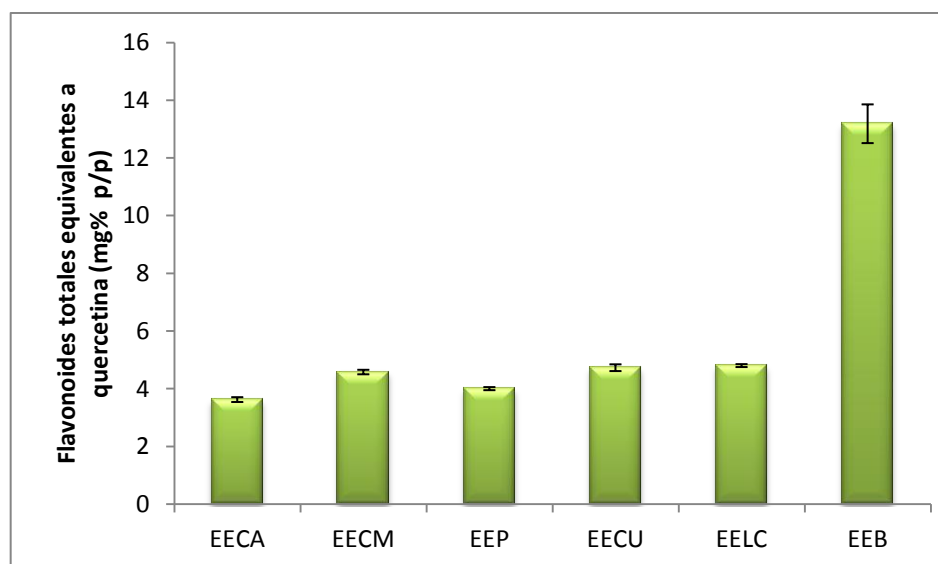


Figura 11: Contenido de flavonoides totales expresados en mg de ácido cafeico / g EEG seco

El gráfico muestra que el EEG con mayor contenido de flavonoides fue el EEB con un 1,43 mg%, seguido por el EEP con un 0,83 mg%, al cual le sigue el EECA con un 0,80 mg%. A continuación, con un menor porcentaje aparecen el EECU con un 0,68 mg%, seguido por el EELC con un 0,64 mg% y finalmente el EECM con un 0,52 mg%.

Como se puede apreciar, el contenido de flavonoides es menor que el de fenoles totales, sin embargo, el resultado de los primeros obtenidos por el método del AlCl_3 no reflejan exactamente la cantidad de flavonoides totales, ya que sólo las flavonas y flavonoles, forman complejos estables con el AlCl_3 a diferencia de las flavanonas e Isoflavonas que reaccionan mejor con otros reactivos, como por ejemplo, la 2,4-dinitrofenilhidrazina (Chang et al., 2002; Salamanca et al., 2007).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el EEB es el que posee mayor contenido de flavonoides y exhibe una marcada diferencia frente a los demás EEG, presentando casi el doble de contenido de flavonoides que el EEP que es el que le sigue. Este resultado podría ser explicado por la formación vegetal típica de Buin que corresponde principalmente a especies herbáceas y arbustivas, donde la especie dominante es la *Acacia caven* Mol. (n.v. espino chileno) (Casanova et al, 2010) lo que puede llevar a la diferencia entre las demás localidades en donde otras especies vegetales, como por ejemplo el *Populus nigra* L. (n.v. álamo negro), es predominante (Hoffmann, 1998).

Nuestros resultados son similares a los de Woisky y Salatino (1998) quienes al analizar muestras de propóleos de diferentes zonas de Brasil encontraron que el contenido de flavonoides varió entre un 0,77 mg% a 2,69 mg%. Los propóleos recolectados desde diferentes zonas de Argentina fueron estandarizados respecto a su contenido de flavonoides expresados en equivalentes de quercetina, utilizando la misma metodología del presente trabajo, éstos registraron resultados mayores a los de nuestros propóleos: 3,7 mg% para el propóleo del Parque Chaqueño, 5,9 mg% el de Patagonia norte, 7,87 mg% para el de la estepa pampeana, 9,44 mg% para el propóleo de Cuyo, y 12,3 mg% para del Valle Calchaquí (Bedascarrasbure et al., 2004).

Por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), han sido identificados diferentes flavonoides en distintos propóleos del mundo. Muestras recolectadas desde regiones de Argentina, Italia y España presentaron una gran cantidad de pinocembrina, 49%, 48% y 39%, en base al contenido total de flavonoides, respectivamente. También pudieron ser detectadas en estas muestras cantidades de genisteína, canferol,

apigenina, crisina y acacetina. La muestra de propóleo procedente de China, presentó una gran cantidad de pinocembrina, 63% respecto al total de flavonoides, sin embargo esta carecía de genisteína, canferol, apigenina y crisina (Volpi y Bergonzini; 2006).

5.2 Ensayos para determinar la actividad antioxidante

5.2.1 Cinética de atrapamiento del radical DPPH

La cinética de reacción de atrapamiento del radical DPPH, describe una curva de decaimiento hasta llegar al estado estacionario. Este comportamiento se describe en la Figura 12 para el ácido cafeico utilizado como la sustancia patrón, y desde la Figura 11 y hasta la 16 para los EEG de cada propóleo en estudio.

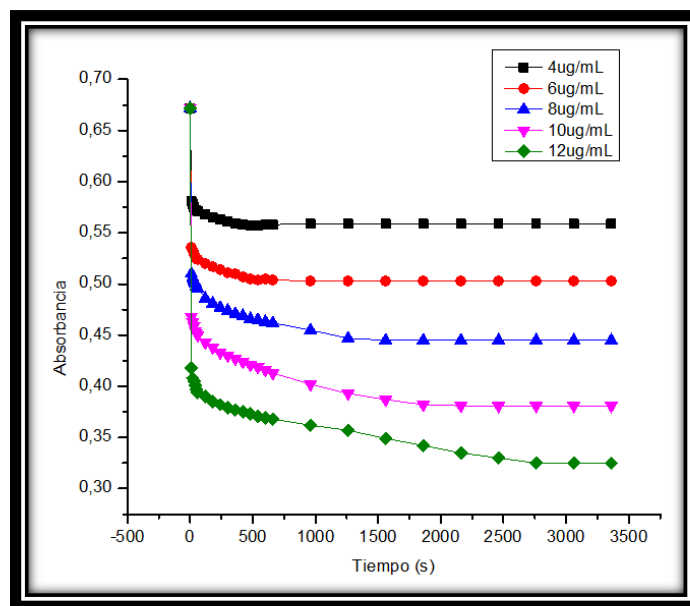


Figura 12: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al ácido cafeico a distintas concentraciones

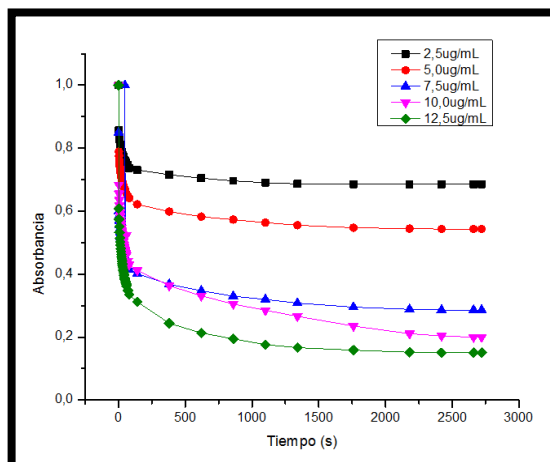


Figura 13: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EEB a distintas concentraciones

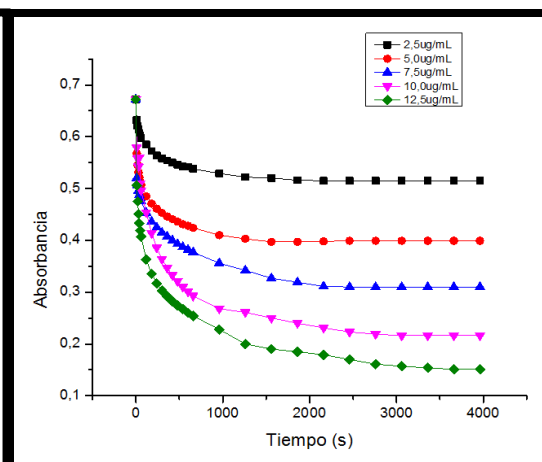


Figura 14: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EECA a distintas concentraciones

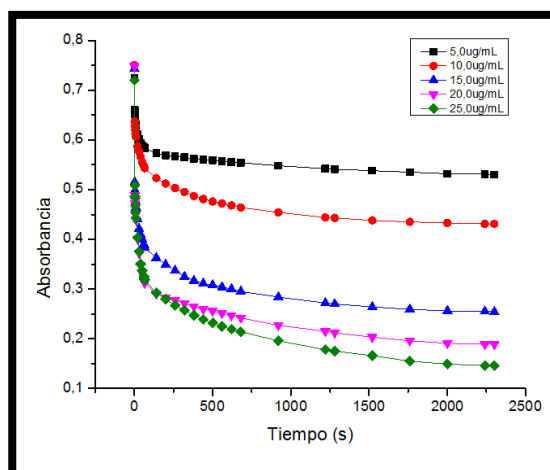


Figura 15: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EECM a distintas concentraciones

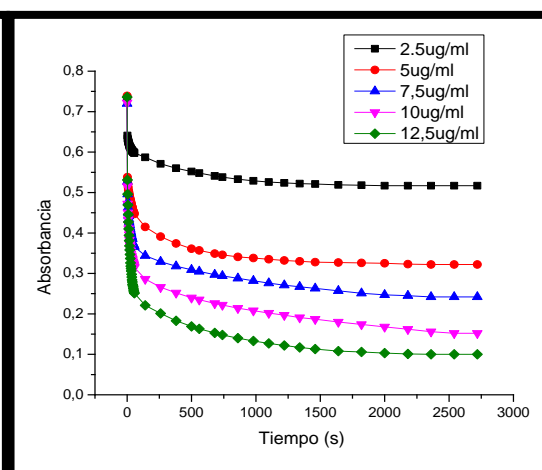


Figura 16: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EECU a distintas concentraciones

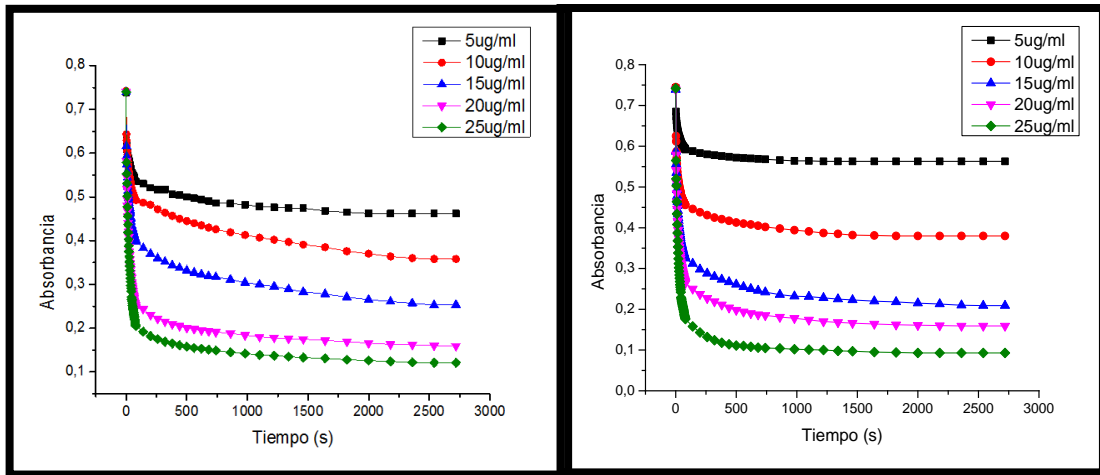


Figura 17: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EELC a distintas concentraciones

Figura 18: Curvas de cinética de decaimiento del radical DPPH frente al EEP a distintas concentraciones

En el estado estacionario, se calculó el porcentaje de DPPH remanente (%DPPH rem) de cada concentración (del ácido cafeico y los EEG). A continuación se graficó el %DPPH rem vs la concentración utilizada (Figuras 19 a la 25). Finalmente, a través de la interpolación en dichos gráficos, se calcularon las respectivas concentraciones efectivas 50 (CE_{50}) para todos los EEG y el patrón, tal como fue señalado anteriormente en la metodología.

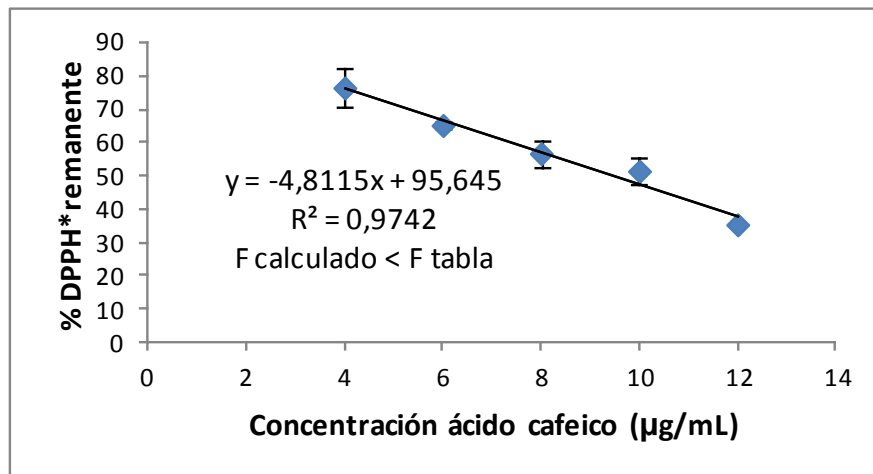


Figura 19: %DPPH*remanente vs concentración de ácido cafeico

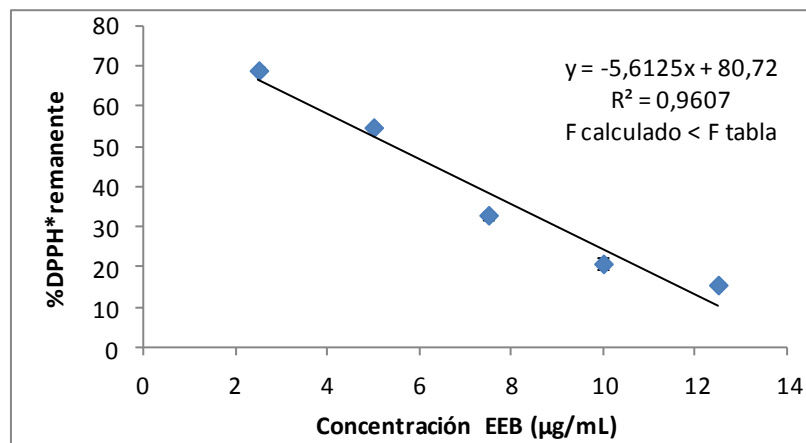


Figura 20: %DPPH*remanente vs Concentración del EEB

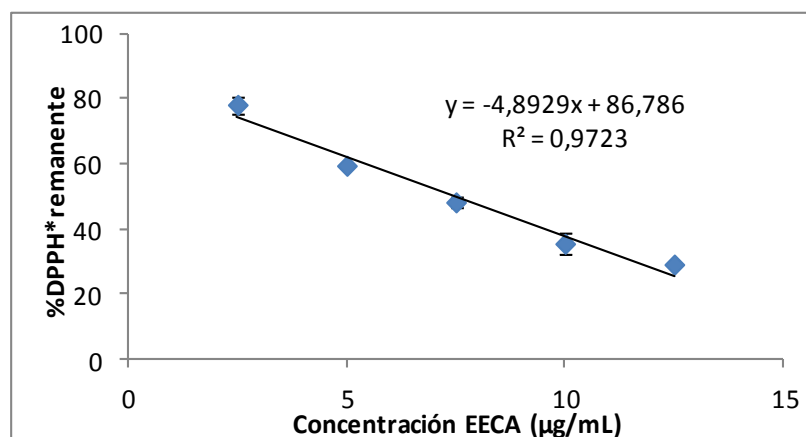


Figura 21: %DPPH*remanente vs Concentración del EECA

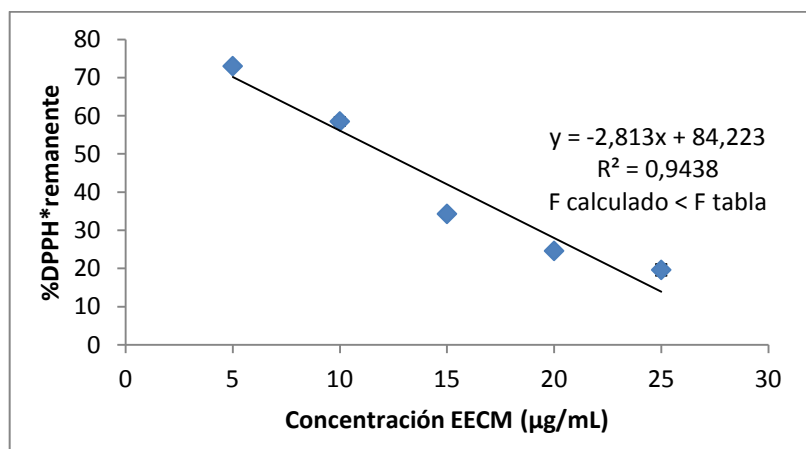


Figura 22: %DPPH*remanente vs Concentración del EECM

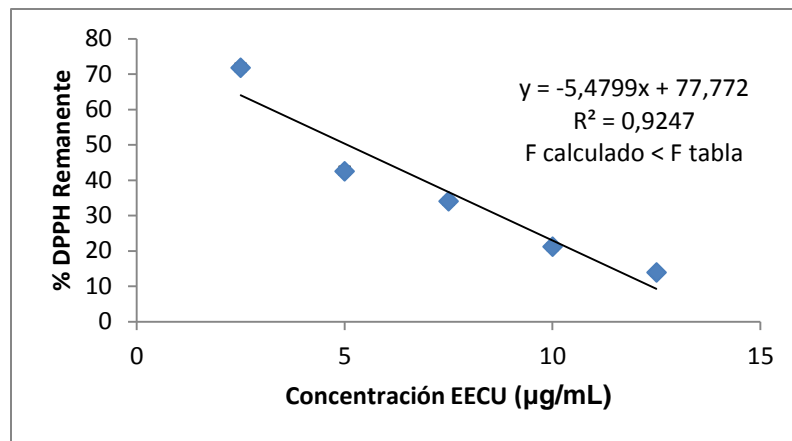


Figura 23: %DPPH*remanente vs Concentración del EECU

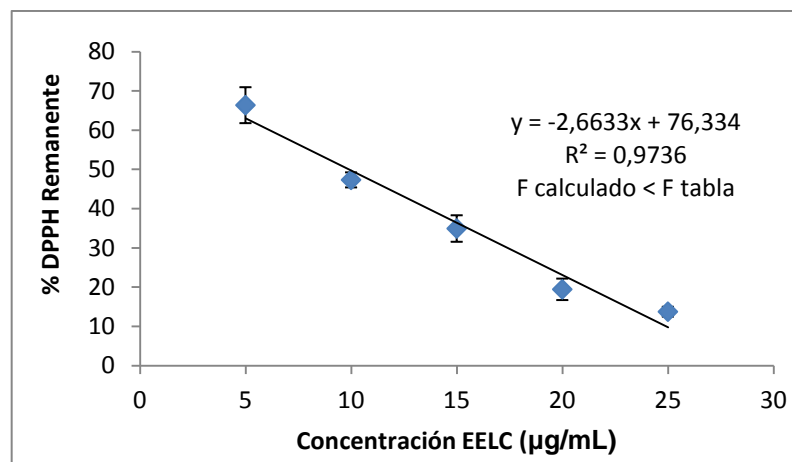


Figura 24: %DPPH*remanente vs Concentración del EELC

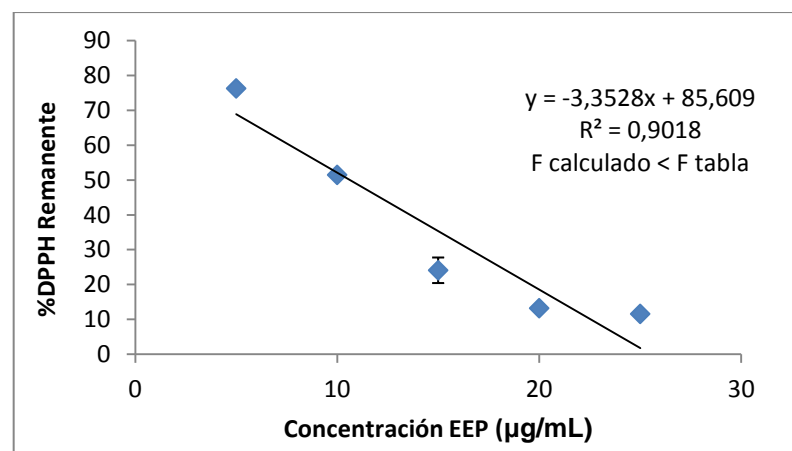


Figura 25: %DPPH*remanente vs Concentración del EEP

Posteriormente, con los datos de CE_{50} obtenidos, se determinó el tiempo efectivo 50 (TE_{50}) del ácido cafeico y de los distintos EEG, para luego determinar la eficiencia antioxidante (EA) de cada muestra de propóleo (Tabla 6) de la forma señala en la metodología.

La eficiencia antioxidante es un parámetro que permite evaluar cada EEG considerando su CE_{50} y TE_{50} , lo que es de gran importancia, debido a que un buen antioxidante es aquel que actúa a baja concentración y en el menor tiempo posible (Villaño et al., 2007), lo que nos dice que si un extracto posee una menor CE_{50} y un TE_{50} pequeño, dará una lucha mas efectiva frente a los radicales libres y como consecuencia, evitará y prevendrá el daño ocasionado por el estrés oxidativo.

En la Tabla 6 se expresan las CE_{50} , TE_{50} y EA de cada extracto junto con el patrón de ácido cafeico.

Tabla 6: Eficiencia antioxidante frente al radical DPPH

EEG	CE_{50} (ppm \pm DS)	TE_{50} (min \pm DS)	EA ($\times 10^{-3} \pm$ DS) (ppm \times min) ⁻¹
EEB	5,47 \pm 0,04	29,33 \pm 1,00	6,24 \pm 0,21
EECM	12,17 \pm 0,04	35,67 \pm 1,53	2,31 \pm 0,10
EECA	7,52 \pm 0,12	22,33 \pm 1,00	5,96 \pm 0,27
EECU	5,07 \pm 0,13	35,67 \pm 2,08	5,43 \pm 0,15
EELC	9,89 \pm 1,18	34,33 \pm 1,00	2,95 \pm 0,09
EEP	10,62 \pm 0,26	36,33 \pm 1,00	2,62 \pm 0,04
ÁCIDO CAFEICO	9,47 \pm 0,28	39,30 \pm 5,77	2,70 \pm 0,00

CE_{50} = concentración efectiva 50; TE_{50} = tiempo efectivo 50; EA= eficiencia antioxidante.
Cada resultado se presenta como el promedio y su respectiva desviación estándar (n=3)

Nuestros resultados (Tabla 6) muestran que no hubo correlación directa entre la cantidad de compuestos fenólicos totales (Tabla 3) y la eficiencia antioxidante como lo exhibe el valor del coeficiente de correlación de Pearson (= -0,076844805).

Por ejemplo el EEB fue el que mostró la mayor EA (casi tres veces mayor que la sustancia patrón), sin embargo, su cantidad de fenoles totales fue similar a los otros EEG, lo que significa que los compuestos fenólicos que presenta tienen una mejor

capacidad para atrapar el radical DPPH, por lo que en este ensayo EEB cumple todas las condiciones necesarias para ser un buen antioxidante con una CE_{50} de 5,47 y un TE_{50} de 29,33 lo que se traduce en una alta EA de $6,24 \pm 0,21$; a diferencia de EECM que posee menor EA con un valor de $2,31 \pm 0,10$.

El ácido cafeico es considerado un compuesto con alta actividad antioxidante, no obstante nuestros resultados indican que algunas muestras de propóleos fueron más activas para atrapar el radical DPPH en comparación con esta sustancia patrón. Nuestros resultados coinciden con los de Villaño et al. (2007) quienes evaluaron la eficiencia antioxidante de diferentes compuestos fenólicos, entre ellos el ácido cafeico obteniendo valores de eficiencia antioxidante similar a este trabajo ($2,4 \pm 0,4$).

Por otra parte, si existe correlación significativa entre la cantidad de flavonoides totales determinados mediante el ensayo de $AlCl_3$ (Tabla 4) y los resultados de la eficiencia antioxidante (coeficiente de correlación de Pearson = 0,601139316) (Tabla 7).

Diversas investigaciones han demostrado que el contenido de flavonoides totales como quercetina, flavonas, isoflavonas, flavanonas y sus compuestos relacionados como: antocianinas, catequinas y epicatequinas contribuyen de manera significativa a la actividad antioxidante (Nagai, et al., 2001; Li, et al., 2003).

Aunque nuestros resultados sugieren que la eficiencia antioxidante de nuestras muestras de propóleos no se encuentra relacionada con la cantidad de fenoles totales y si se explica en un 60 % por la cantidad de flavonoides por lo que debemos tomar en cuenta que las correlaciones no son completamente lineales y que la actividad antioxidante en una matriz tan compleja como el propóleo puede estar en parte potenciada por compuestos no fenólicos (Mc-Donalds et al., 2006; Asami et al., 2003). Además es posible que se presenten interacciones antagonistas o de sinergia entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos que pueden afectar la actividad (Odabasoglu et al., 2005; Palomino et al., 2009).

Tabla 7: Relación entre los fenoles totales, flavonoides totales y eficiencia antioxidante (EA) mediante el coeficiente de Pearson

	Coeficiente de correlación de Pearson	p-value
<i>Flavonoides / EA</i>	0,601139316	0,206907
<i>Fenoles / EA</i>	-0,076844805	0,884960

* $p < 0,05$

5.2.2 Poder reductor de Fe^{+3} (FRAP) de los EEG

Dentro de los ensayos en los que se valora la capacidad reductora de una muestra uno de los más utilizados es el método de FRAP que consiste en medir el incremento en la absorbancia a 593 nm que se desarrolla cuando el complejo TPTZ- Fe^{+3} se reduce a TPTZ- Fe^{+2} (Benzie y Strain, 1996). La aparición del color indicará la capacidad reductora de la muestra, que será proporcional a la concentración de antioxidantes de la misma.

Para determinar la capacidad antioxidante total de los EEG de las distintas muestras de propóleos, previamente se elaboró la siguiente curva de calibración a partir de los datos descritos en la Tabla 8:

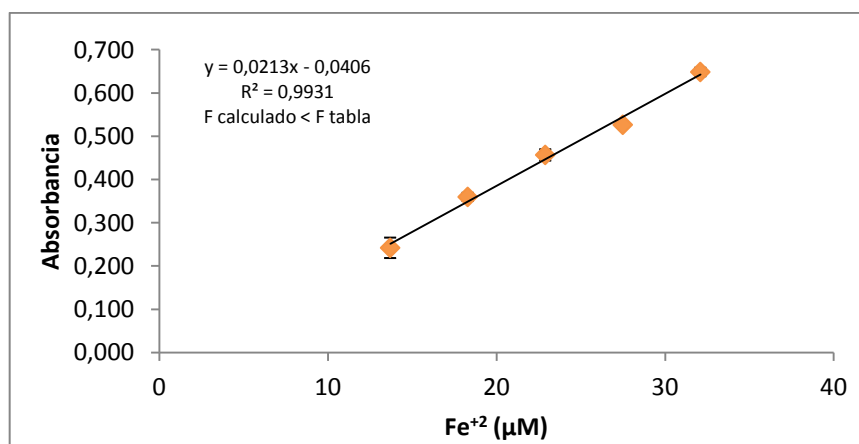


Figura 26: Curva de calibración para la extrapolación de valores FRAP. Concentración de Fe^{+2} (μM) vs absorbancia

La curva se confeccionó a partir de concentraciones definidas de sulfato ferroso (FeSO_4) entre 13,7 y 32,1 $\mu\text{g/mL}$, vs la absorbancia obtenida de los mismos, utilizando un espectrofotómetro Unicam UV-VIS (Figura 27).

Tabla 8: Concentraciones de FeSO_4 y sus respectivas absorbancias

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia PROM \pm D.S
13,7	0,242 \pm 0,02
18,3	0,360 \pm 0,01
22,9	0,457 \pm 0,01
27,5	0,527 \pm 0,01
32,1	0,649 \pm 0,01

La capacidad antioxidante total de los EEG es expresada mediante el valor FRAP (mmol Fe^{+2} /g de EEG seco) a los 4, 30 y 60 min (Tabla 9).

Tabla 9: Valores FRAP de los extractos etanólicos de propóleos

MUESTRA	Valores FRAP. PROM \pm D.S (mmol Fe^{+2} /g muestra)		
	4min	30min	60min
EEB	5,7 \pm 0,2	10,1 \pm 0,3	12,3 \pm 0,3
EECM	2,8 \pm 0,2	5,1 \pm 0,4	7,3 \pm 0,3
EELC	2,8 \pm 0,1	5,8 \pm 0,1	6,9 \pm 0,4
EECU	3,3 \pm 0,1	5,4 \pm 0,1	7,7 \pm 0,4
EECA	3,4 \pm 0,1	5,8 \pm 0,1	7,2 \pm 0,2
EEP	3,4 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1	10,4 \pm 0,3

Valores expresados como el promedio \pm la D.S de n=3

Los valores FRAP fueron expresados en mmol Fe^{+2} /g de EEG y graficados como se muestra en la Figura 27.

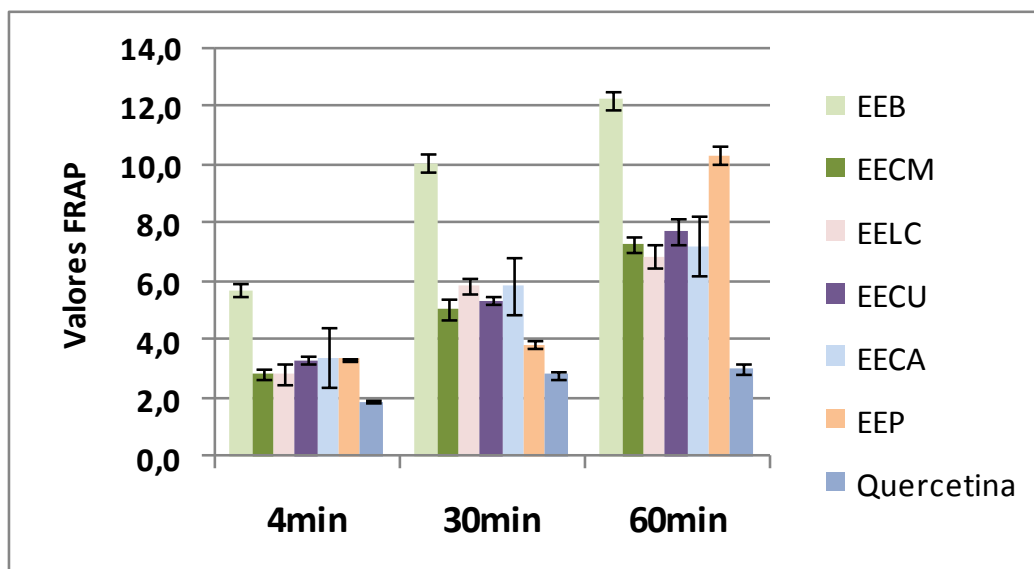


Figura 27: Comparación de los valores FRAP de los EEG de propóleos a los 4, 30 y 60 min de incubación

Al analizar los datos obtenidos a través de ANOVA de una vía y mediante el test de Tukey, se observó que las diferencias entre las muestras de propóleos eran significativas ($p < 0,05$) (Anexo 5). En la Figura 25 se puede apreciar que el EEB presentó la mayor actividad antioxidante a los tres tiempos de incubación, con valores FRAP de $5,7 \pm 0,2$ mmoles de Fe^{+2}/g de muestra a los 4 min, $10,1 \pm 0,3$ mmoles de Fe^{+2}/g de muestra a los 30 min y $12,3 \pm 0,3$ mmoles de Fe^{+2}/g de muestra a los 60 min de incubación. Cabe destacar que todos los EEG estudiados resultaron más activos que la quercetina, un compuesto del tipo flavonol con reconocida capacidad antioxidante (Maestro, 1993).

Los valores de la actividad antioxidante obtenidos en este ensayo se correlacionan de manera significativa con el contenido de flavonoides, no así con el contenido de fenoles totales tal como se señala en la Tabla 10:

Tabla 10: Relación entre los fenoles totales, flavonoides totales y el poder reductor de Fe⁺³ mediante el coeficiente de Pearson

	4min		30min		60min	
	Coeficiente de Correlación (R)	<i>p</i> -value	Coeficiente de Correlación (R)	<i>p</i> -value	Coeficiente de Correlación (R)	<i>p</i> -value
Flavonoides / FRAP	0,935404854	0,006124037*	0,944953947	0,004461705*	0,783265856	0,065370133
Fenoles / FRAP	-0,05006053	0,924971932	-0,232374805	0,657711686	0,16936116	0,74838717

* $p < 0.05$

Kalogeropoulos et al. (2009) estudiaron propóleos recolectados en primavera de diferentes zonas de Grecia, sus islas y Chipre y prepararon extractos etanólicos siguiendo el mismo procedimiento que utilizamos en este estudio. Luego llevaron a cabo el ensayo FRAP para determinar y comparar las actividades antioxidantes de sus muestras obteniendo importantes diferencias entre ellas. También establecieron una alta correlación entre el poder reductor de Fe⁺³ y su contenido de ácido ferúlico (coeficiente de correlación R = 0,811), crisina (R = 0,802), apigenina (R = 0,804) y antraquinonas (R = 0,750–0,886) y demostraron que el ácido cinámico, ácido vainillínico, canferol, pinocembrina y ácido ursólico también contribuían al poder reductor de las muestras.

De diversos compuestos fenólicos aislados desde propóleos chinos, el fenil etil cafeato (CAPE) es uno de los que presentó mayor actividad antioxidante evaluada mediante FRAP y por el contrario, la galangina se correlacionó con un bajo poder reductor de Fe⁺³ pero con buenos resultados en los ensayos DPPH* y ABTS* (Yang et al., 2011).

La diferencia en la capacidad antioxidante, como lo respaldan los ensayos descritos anteriormente, podría deberse a la diferencia en la composición química de las muestras de propóleos, la que según literatura varía de un propóleo a otro según el origen botánico (Bankova et al., 2000).

VI. CONCLUSIONES

- Los rendimientos fueron muy distintos entre las diferentes muestras de propóleo. Esto estaría relacionado con el contenido de metabolitos secundarios.
- Los propóleos de la Región Metropolitana de Santiago incluidos en este estudio presentaron diferencias respecto del contenido en compuestos fenólicos. El EECU fue el que mostró mayor contenido de compuestos fenólicos con un 29,3%; mientras que el EECA y el EECM fueron los que presentaron la menor cantidad de compuestos fenólicos.
- Las diferencias en las características organolépticas y en los perfiles cromatográficos demuestran la diversidad en la composición química de cada uno de los propóleos lo que puede ser explicado en gran parte a la flora circundante de las colmenas.
- Los EEG de los propóleos evaluados poseen una importante actividad atrapadora del radical DPPH, superando al ácido cafeico utilizado como compuesto de referencia.
- La mayor eficiencia antioxidante fue presentada por el EEB, al mismo tiempo este extracto mostró el mayor poder reductor en el ensayo del FRAP, lo que se relacionó con su contenido de flavonoides.
- La actividad antioxidante evaluada a través de los métodos FRAP y DPPH no se correlacionó con el contenido de fenoles totales presentes en las muestras de propóleos, este hecho es indicativo de que la capacidad antioxidante de una muestra se debe al efecto combinado de diversos factores, como puede ser la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes.

- Los resultados obtenidos en esta memoria permitieron demostrar que la variabilidad entre los distintos propóleos puede deberse en parte a los diferentes orígenes botánicos de este producto apícola.
- Esta memoria contribuyó a demostrar las propiedades antioxidantes *in vitro* de propóleos de la Región Metropolitana de Santiago lo que nos da pie para realizar nuevos estudios *in vitro* e *in vivo* y así demostrar las propiedades benéficas de esta sustancia.

VII. REFERENCIAS

AGOMUO E., Amadi B., Duru M., Some biochemical studies on the leaves and fruits of *Persea americana*, *Ijrras*, 11(3): 556-560, 2012.

ALENCAR S., Oldoni T., Castro M., Cabral I., Costa-Neto C, Cury J., Rosalen P., Ikegaki M., Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol*, 113(2):278-83, 2007.

ARTRECHE A., Fernández J., Güenechea J., Vanaclocha B., Fitoterapia: Vademecum de prescripción, 1ª Ed., CITA, 156-157, 1992.

ARUKWE U., Amadi B., Duru M., Agomuo E., Adindu E., Odika P., Lele, K., Egejuru L., Anudike J., Chemical composition of *Persea americana* leaf, fruit and seed, *Ijrras*, 11(2): 346-349, 2012.

ASAMI D., Hong Y., Barrett D., Mitchell A., Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marion-berry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric Food Chem.*; 51 (5): 1237-1241, 2003.

AVELLO M. y Suwalsky M., Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494: 161-172, 2006.

BANKOVA V., Popov S., Marekov N., Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. *Phytochemistry*, 28: 871–873, 1988.

BANKOVA V., Baoudourova-Krasteva G., Paopov S., Sforcin J., Cunha S., Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis, *Apidologie*, 29: 361-367, 1998.

BANKOVA V., Castro S., Marcucci M., Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, 31: 3-15, 2000.

BANKOVA V., Recent trends and important developments in propolis research, *eCAM*, 2(1): 29-32, 2005a.

BANKOVA V., Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, *J. of Ethnopharmacology*, 100: 114–117, 2005b.

BANKOVA V., Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds, *J. of Api Product and Api Med. Sci.*, 1(2): 23-28, 2009.

BEDASCARRASBURE E., Maldonado L., Alvarez A., Rodríguez E., Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propoleos Argentino, *Acta Farm. Bonaerense*, 23(3): 369-372, 2004.

BENZIE I. y Strain J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, 239: 70–76, 1996.

DUDONN S., Pascal P., Coutière P., Woillez M., Richard T., Merillon J-M., Vitrac X., Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Poplar Bud (*Populus nigra*) Extract: Individual Antioxidant Contribution of Phenolics and Transcriptional Effect on Skin Aging, *J. Agric. Food Chem.*, 59: 4527–4536, 2011.

CASANOVA M., Salazar O., Ruiz G., Congreso de la organización internacional de conservación de suelo, (16º, 2010, Santiago, Chile), La tierra que queremos para el futuro la debemos construir hoy, 37p., 2010.

CASTALDO S. y Capasso F., Propolis, an old remedy used in modern medicine, *Fitoterapia*, 73(Suppl. 1):S1–S6. 2002.

CHANG C., YANG M., WEN H., CHERN J., Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *J. of Food and Drug Analysis*, 10 (3):178-182, 2002.

CICCO N., Lanorte MT., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V., A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts, *J. Microchem*, 91: 107-110. 2009.

CUESTA O., Cuellar A., Rojas N., Velez H., Rastrelli L., Aquino R., A polyisoprenylated benzophenone from Cuban Propolis, *Journal Natural Product*, 62:1013-1015, 1999.

DE CASTRO S., Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product, *Rev. Biomed Sci.*, 3:49-83, 2001.

FOKT H., Pereira A., Ferreira A., Cunha A., Aguiar C., How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis, In Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 1(1) 481-493, 2010.

GARCÍA A., Periago M., Vidal M., Cantos E., Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de uva y frutas rojas, *An. Vet. Murcia*, 18: 103-114, 2002.

GONZÁLEZ M., Betancourt M., Ortiz R., Daño oxidativo y antioxidantes, *Bioquímica*, 25(1): 3-9, 2000.

GÓMEZ A., Gómez M., Arráez D., Segura A., Fernández A., Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees, *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220–1234, 2006.

GREGORIS E., Stevanato R., Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis, *Food and Chem.* 48: 76-82, 2010.

GUPTA M., Plantas medicinales iberoamericanas, 1ª Ed. Bogotá, Andrés Bello, p875, 2008.

HOFFMANN A, Flora silvestre de Chile: Zona Central, 4ª Ed. Fundación Claudio Gay, 18-19, 1998.

IKAWA M., Schaper T., Dollard C., Sasner J., Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 51: 1811-1815, 2003.

KALOGEROPOULOS N., Konteles S., Troullidoua E., Mourtzinosa I., Karathanosa V., Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116: 452-461, 2009.

KUMAZAWA S., Hamasaka T, Nakayama T., Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, *Food Chemistry*, 84: 329-339, 2004.

LI L., Yue C., Cheng C., Antibacterial and DPPH Free Radical-scavenging Activities of the Ethanol Extract of Propolis Collected in Taiwan., *J. of Food and Drug Analysis*, 11(4): 277-282, 2003

LOPEZ V., Akerreta S., Cavero R., Calvo M., Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional en Navarra, *Fitoterapia*, 7(1): 43-47, 2007.

LOZINA L., Peichoto M., Acosta O., Granero G. Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos, *Lat. American J. of Pharmacy*, 29:102-110, 2010.

Mc-DONALD L., Wood L., Garg M., Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci Food Agric.*, 86(13): 2046-2056, 2006.

- MAESTRO R. y Borja R. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, *Rev. Csic*, 44 (2): 101-106, 1993.
- MOHAMMADZADEH S., Sharriatpanahi M., Hamedi Y., Amanzadeh S. Ebrahimi S., Ostad S., Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem.* 103:729-733. 2007.
- MENDES J., De Souza M., Ramalho S., Ribeiro M., Nova F., Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 99:431-435, 2006.
- MOHAMMAD Y., Sattwik D., Kharya M., The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill., *Rev. Pharmacogn*, 4(7): 77–84, 2010.
- MONTENEGRO G., Avila G., Peña R., Botanical origin and seasonal production of propolis in hives of Central Chile. *Bol. Bot. Univ. Sao Paulo*, 19:1-6. 2001.
- MONTENEGRO G., Fredes C., Relación entre el origen floral y el perfil de elementos minerales en mieles chilenas, *Gayana Bot.*, 65(1): 123-126, 2008.
- NAGAI T., Sakai M., Inoue R., Inoue H., Suzuki N., Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chem.*, 75: 237- 240, 2001.
- NORMA IRAM-INTA 15935-1, Productos del Noreste Argentino. Parte I: Propóleos en bruto. Primera edición. 2008.
- ODABASOGLU F., Aslan A., Cakir A., Suleyman H., Karagoz Y., Bayir Y., Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 76 (2): 216-219, 2005.

PALOMINO L., García C., Gil J., Rojano B., Durango D., Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia), *Vitae*, 16 (3): 388-395, 2009.

PAPOTTI G., Bertelli D., Plessi M., Rossi M., Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods, *J. of Food Sci. and Technology*, 45: 1610-1618, 2010.

PAPOTTI G., Bertelli D., Bortolotti L., Plessi M., Chemical and Functional Characterization of Italian Propolis Obtained by Different Harvesting Methods, *J. Agric. Food Chem.*, 60: 2852-2862, 2012.

PARK Y., Alencar S., Aguiar C., Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 2502-2506. 2002.

PEÑA R. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos, *Ciencia e Investigación Agraria*, 35:17-26, 2008.

RESTREPO A., Cortés M., Rojano B., Potenciación de la capacidad antioxidante de fresa (*Fragaria Ananassa Duch.*) por incorporación de vitamina E utilizando la técnica de impregnación a vacío, *Vitae*, 17(2): 135-140, 2010.

RESTREPO D., Narváez C., Restrepo L., Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia, *Quim. Nova*, 32(6):1517-1522, 2009.

SALAMANCA G., Correa I., Principal J., Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos, *Zootecnia Trop.*, 25(2): 95-102, 2007.

SEIGLER D., Phytochemistry of *Acacia-sensu lato*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 845-873, 2003.

TAPIA, Daniel, Propuesta de intervenciones silviculturales con fines de rehabilitación en la quebrada de la plata, Región Metropolitana de Santiago, Tesis para optar por el título de de Ingeniero Forestal, Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de ciencias forestales, 2005, 94h.

UMTHONG S., Phuwapraisirisan P., Puthong S., Chanpen C., In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11:1-8, 2011.

VALCIC S., Montenegro G., Timmermann B., Lignans from Chilean Propolis, *J. Nat. Prod.*, 61: 771-775, 1998.

VENEREO. R., Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes, *Rev Cubana Med Militar*, 31(2):126-133, 2002.

VILLAÑO D., Fernández M., Moyá M., Troncoso A., García M., Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta*, 71:230-235, 2007.

VIUDA M., Ruiz Y., Fernández J., Pérez J., Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly, *J. of Food Sci.*, 17(9): 117-124, 2008.

VOLPI N., Bergonzini G., Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC electro spray mass spectrometry. *J. Pharm. and Biomedical Analysis*, 42:354-3671, 2006.

WAGNER H., Bladt S., Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas, 2^a ed. Berlin, Springer, 359-364, 1996.

WOISKY R., Salatino A., Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. of Apicultural Research*, 37(2): 99-105, 1998.

YANG Y. y Guixing R., Effect of thermal treatment on phenolic composition and antioxidant activities of two celery cultivars, *Food Sci. Technol.*, 44 (1): 181–185, 2011.

YONG P., Alencar S., Aguiar C., Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian propolis, *J. Agric. Food Chem.*, 50: 2502-2506, 2002.

VIII. ANEXOS

Anexo 1

Control de calidad: Ensayos fisicoquímicos

Debido a la creciente demanda del propóleo en el mundo, diferentes países se han preocupado de legislar sobre este ámbito. Rusia posee la Norma Ramal Rusa RST 317-77, Bulgaria la Norma Ramal Búlgara ON 25 72 483-84, Cuba la Norma Ramal Cubana 932-88, Argentina la Norma IRAM-INTA--15935-1:2008 y Brasil, según la Instrucción Normativa N° 3/01, establece las inspecciones fisicoquímicas y la metodología de análisis para el propóleo en bruto y sus extractos.

En esta investigación se seleccionó la norma argentina IRAM, del instituto argentino de normalización-subcomité de productos agroalimentarios del NOA-2008, para efectuar el control de calidad de los propóleos de la región Metropolitana de Santiago de Chile.

Se llevaron a cabo las determinaciones de pérdida por calentamiento, cenizas, sustancias extraíbles en n-hexano, resinas solubles en etanol, impurezas mecánicas e índice de oxidación. Los resultados aceptados para la aprobación del control de calidad son los que se muestran en la Tabla A.

Tabla A: Requisitos norma IRAM-INTA-15935-1:2008

Requisito	Unidad	Mínimo	Máximo
Pérdida por calentamiento ¹⁾	g/100 g	-	10,0
Cenizas		-	5,0
Sustancias extraíbles en n-hexano ²⁾		-	35,0
Resinas solubles en etanol		35,0	-
Impurezas mecánicas		-	25,0
Índice de oxidación	s	-	22

¹⁾ Si bien otras normativas denominan este requisito como humedad, el método aplicado (pérdida por calentamiento) determina no sólo humedad sino también otras sustancias volátiles en las condiciones de ensayo.

²⁾ Si bien otras normativas denominan este requisito como ceras, el método aplicado determina otras sustancias extraíbles en n-hexano distintas de las ceras.

i. Perdida por calentamiento (humedad)

Con el objetivo de evaluar la humedad se realizó el ensayo de pérdida por calentamiento utilizando cápsulas de porcelana previamente secadas en una estufa a $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y taradas. Se pesaron aproximadamente 4 g de propóleo en bruto y se colocó en las cápsulas secas para luego calentarlo en la estufa a $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas. Posteriormente se retiraron y se colocaron en un desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente y se pesaron (IRAM-INTA-15935-1:2008). Los resultados se muestran en la Tabla B.

Tabla B: Porcentaje de humedad de los distintos propóleos en estudio

Propóleos	% Prom \pm D.S.
Buin	$3,0 \pm 0,4$
Caleu	$2,1 \pm 0,2$
Cajón del Maipo	$2,9 \pm 0,1$
Curacaví	$2,0 \pm 0,1$
Lo Cañas	$2,1 \pm 0,5$
Pirque	$0,8 \pm 0,1$

Los valores para cada propóleo se encuentran dentro del rango permitido por la norma IRAM-INTA-15935-1:2008, ya que esta exige un valor máximo de 10 g/ 100 g para este ensayo (Tabla A).

ii. Cenizas

Las cápsulas provenientes del ensayo de pérdida por calentamiento se quemaron bajo campana con un mechero durante 48 horas, con el objetivo de eliminar la materia orgánica. Posteriormente las cápsulas se incineraron en un horno mufla a $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$, hasta que se obtuviesen cenizas sin residuos carbonosos. A continuación se retiraron cuidadosamente del horno mufla y se dejaron enfriar en un desecador hasta que se logró la temperatura ambiente. Se pesaron hasta que se alcanzó peso constante, lo cual se verificó cuando dos

pesadas sucesivas no difirieron entre si en más de 5 mg (IRAM-INTA-15935-1:2008). Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla C.

Tabla C: Porcentaje de cenizas de los distintos propóleos en estudio

Propóleos	% Prom \pm D.S.
Buín	3,2 \pm 0,0
Caleu	1,8 \pm 0,1
Cajón del Maipo	1,5 \pm 0,0
Curacaví	1,4 \pm 0,2
Lo Cañas	1,3 \pm 0,1
Pirque	1,1 \pm 0,0

La norma para propóleos en bruto de Argentina (IRAM-INTA-15935-1:2008), indica que en este parámetro no se puede superar los 5 g/100 g (Tabla A). En esta determinación los propóleos también cumplieron con las exigencias.

iii. Sustancias extraíbles con n-hexano

Se pesaron aproximadamente 2 g de propóleo en bruto y se colocaron en cartuchos de papel filtro secos previamente tarados. Los balones del extractor soxlhet debieron ser secados previamente en una estufa a 80°C, para posteriormente adicionar volúmenes adecuados de n-hexano (aproximadamente una vez y media el volumen del sifón) y conectarlos al extractor para luego comenzar a calentar hasta que el solvente alcanzó la ebullición (se debió mantener el sistema en estas condiciones durante 6 horas). Al finalizar el proceso se secaron los papeles y se guardaron para emplearlos en las determinaciones de resinas solubles en alcohol e impurezas mecánicas.

En los balones se encontraba la cera y otros compuestos que se disuelven en n-hexano. Se procedió a evaporar el solvente hasta sequedad y se adicionaron 3 mL de n-hexano para disolver los compuestos del balón. Posteriormente estos 3 mL de n-hexano se trasladaron a una placa de petri y se secaron. Cuando se evaporó todo el solvente las placas se introducen en una estufa a 80° C por 30

minutos. Finalmente se colocaron en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesaron hasta lograr peso constante (IRAM-INTA-15935-1:2008). Los resultados se muestran en la Tabla D.

Tabla D: Porcentaje de sustancias extraíbles con n-hexano de los distintos propóleos en estudio

Propóleos	% Prom \pm D.S.
Buin	24,5 \pm 1,4
Caleu	26,7 \pm 1,0
Cajón del Maipo	27,4 \pm 2,5
Curacaví	20,4 \pm 1,2
Lo Cañas	11,0 \pm 2,2
Pirque	23,2 \pm 1,6

El contenido de ceras, así como de otras sustancias que se disuelven en n-hexano fue menor a lo exigido por la norma (Tabla A). Por lo tanto esta determinación cumple con las exigencias de la norma argentina.

iv. Resinas solubles en etanol

Se colocaron los remanentes de cada una de las muestras resultantes de la extracción de sustancias extraíbles con n-hexano en el cuerpo del extractor soxhlet. Posteriormente se adicionó en el balón del extractor soxhlet un volumen adecuado de etanol, se armó el sistema y se comenzó a calentar. La extracción se llevó a cabo hasta que el líquido en contacto con la muestra se puso incoloro (esto ocurrió al trascender 7 horas del inicio del ensayo). El punto final de la extracción se controló agregando una solución de FeCl_3 de 10 g/100 mL. Si el color de la solución cambiaba de amarillento a verdoso, indicaba la presencia de sustancias fenólicas y por lo tanto era necesario continuar con la extracción. En este caso no hubo cambio de coloración y se dio por finalizado la extracción. Luego, se transfirió cuantitativamente el contenido del balón a un matraz aforado de 100 mL y se aforó con etanol. A continuación se tomaron 50 mL y se

colocaron en un balón de destilación. Se eliminó completamente el etanol mediante un equipo de destilación.

Las resinas quedaron en el balón de destilación, el cual se colocó en una estufa a 80 °C para evaporar los restos de etanol. Después de evaporado el etanol, se retiró de la estufa, se colocó en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesó. Se repitió este último procedimiento hasta lograr constancia de masa, lo cual se verificó cuando dos pesadas sucesivas no difirieron entre sí en más de 5 mg (IRAM-INTA-15935-1:2008). Los resultados se muestran en la Tabla E.

Tabla E: Porcentaje de resina de los distintos propóleos en estudio

Propóleos	% Prom ± D.S.
Buín	72,0 ± 1,7
Caleu	68,1 ± 4,4
Cajón del Maipo	56,7 ± 1,6
Curacaví	82,3 ± 0,0
Lo Cañas	70,0 ± 2,8
Pirque	78,7 ± 4,9

El contenido de resinas de cada uno de los propóleos cumple con lo exigido por la norma argentina (IRAM-INTA-15935-1:2008), ya que el promedio obtenido para esta determinación fue mayor al exigido como contenido mínimo de resinas solubles en etanol (Tabla A).

v. *Impurezas mecánicas*

Se secaron en la estufa a 80°C los papeles filtros provenientes de la determinación de resinas. Posteriormente se retiraron de ella, se colocaron en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesaron hasta lograr peso constante (IRAM-INTA-15935-1:2008). Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla F.

Tabla F: Porcentaje de impurezas de los distintos propóleos en estudio

Propóleos	% Prom ± D.S.
Buin	14,5 ± 0,7
Caleu	14,6 ± 0,1
Cajón del Maipo	8,9 ± 0,5
Curacaví	4,6 ± 0,0
Lo Cañas	3,9 ± 0,8
Pirque	2,8 ± 0,3

Los propóleos estudiados presentan un promedio de impurezas mecánicas menor al exigido por la norma argentina (Tabla A), por ende cumple con las exigencias establecidas por la norma en relación a este parámetro.

vi. Índice de oxidación

Se pesaron aproximadamente 0,2 g de la muestra de propóleo en bruto y se colocaron en un matraz erlenmeyer de 125 ml. Luego se añadieron 5 mL de etanol 96 % y se dejó en reposo durante 1 hora. Posteriormente se agregaron 100 mL de agua destilada, se agitó, se filtró a través de un papel filtro y se recogió el filtrado en un vaso precipitado. A continuación se colocaron 2 ml del filtrado en un tubo de ensayo, se añadió 1 mL de solución de ácido sulfúrico 20% v/v y se agitó durante 1 minuto. Finalmente, se agregaron en el tubo 0,05 ml (1 gota) de la solución de permanganato de potasio 0,1 N y se controló con cronometro el preciso momento en que la gota se puso en contacto con la solución acidulada de propóleos, agitando constantemente. La gota cayó directamente sobre la solución y no sobre las paredes del tubo. Se registró el tiempo, en segundos (s), que la solución tardó en decolorarse (IRAM-INTA-15935-1:2008). Los resultados se expresaron en segundos y se muestran en la Tabla G.

Tabla G: Tiempo de decoloración de los distintos propóleos en estudio

Propóleos	Segundos ± D.S.
Buin	8,6 ± 0,6
Caleu	14,5 ± 3,7
Cajón del Maipo	3,8 ± 0,8
Curacaví	2,4 ± 0,7
Lo Cañas	4,5 ± 0,5
Pirque	3,4 ± 0,9

Los propóleos estudiados cumplen con la Norma argentina ya que presentan un tiempo menor al exigido por la misma (Tabla A).

Anexo 2

Análisis estadístico para la determinación de fenoles totales.

Tabla: Test de Tukey. Significancia de las diferencias en la cantidad de fenoles totales, evaluada mediante Folin-Ciocalteu, entre los extractos etanólicos de propóleos

	p-value
EEB EELC	0,78925
EECM EELC	0,12958
EECM EEB	0,67346
EECU EELC	0,78925
EECU EEB	0,18045
EECU EECM	0,01536*
EECA EELC	0,09197
EECA EEB	0,55113
EECA EECM	0,99992
EECA EECU	0,01073*
EEP EELC	0,98529
EEP EEB	0,43461
EEP EECM	0,04531*
EEP EECU	0,98529
EEP EECA	0,03161*

* $p < 0,05$

$\alpha = 0,05$

$\rho < 0,05$; indica que la diferencia de promedios es significativa

$\rho > 0,05$; indica que la diferencia de promedios no es significativa

Anexo 3

Análisis estadístico para la determinación de flavonoides totales.

Tabla: Test de Tukey. Significancia de las diferencias en la cantidad de flavonoides totales, evaluada mediante reacción de $AlCl_3$, entre los extractos etanólicos de propóleos

	p-value
EECA EECU	0,00196*
EECM EECU	0,03426*
EECM EECA	0,53909
EEB EECU	0*
EEB EECA	0*
EEB EECM	0*
EELC EECU	0,81739
EELC EECA	0,01458*
EELC EECM	0,24394
EELC EEB	0*
EEP EECU	0,99824
EEP EECA	0,00374*
EEP EECM	0,06741
EEP EEB	0*

* $p < 0,05$

$\alpha = 0,05$

$p < 0,05$; indica que la diferencia de promedios es significativa

$p > 0,05$; indica que la diferencia de promedios no es significativa

Anexo 4

Análisis estadístico para la cinética de atrapamiento del radical DPPH

Tabla: Test de Tukey. Significancia de las diferencias en la cinética de atrapamiento, evaluada mediante el radical DPPH, entre los extractos etanólicos de propóleos

	p-value
EECU EECM	0*
EEB EECM	0*
EEB EECU	0,02316*
EECA EECM	0*
EECA EECU	$2,63 \times 10^{-5}$ *
EECA EEB	0,0064*
EELC EECM	0*
EELC EECU	0*
EELC EEB	0*
EELC EECA	0*
EEP EECM	0*
EEP EECU	0*
EEP EEB	0*
EEP EECA	0*
EEP EELC	0,07666

* $p < 0,05$

$\alpha = 0,05$

$p < 0,05$; indica que la diferencia de promedios es significativa

$p > 0,05$; indica que la diferencia de promedios no es significativa

Anexo 5

Análisis estadístico del poder reductor de Fe^{+3} (FRAP)

Tabla: Test de Tukey. Significancia de las diferencias de actividad antioxidante, evaluada mediante FRAP, entre los extractos etanólicos de propóleos

	p-value		
	4 min	30 min	60 min
EECM EEB	$4,02 \times 10^{-8*}$	0*	$4,06 \times 10^{-8*}$
EELC EEB	$4,13 \times 10^{-8}$	0*	0*
EELC EECM	0,96814	0,00412*	0,6043
EECU EEB	$3,99 \times 10^{-8}$	0*	$4,26 \times 10^{-8*}$
EECU EECM	0,99999	0,46673	0,63177
EECU EELC	0,91519	0,14059	0,04866*
EECA EEB	$8,89 \times 10^{-7*}$	0*	$4,02 \times 10^{-8*}$
EECA EECM	$1,79 \times 10^{-6*}$	0,00362*	0,99991
EECA EELC	$5,77 \times 10^{-6*}$	1	0,7765
EECA EECU	$1,36 \times 10^{-6*}$	0,12493	0,457
EEP EEB	0*	0*	$3,62 \times 10^{-5*}$
EEP EECM	0,00413*	$5,70 \times 10^{-5*}$	$9,73 \times 10^{-8*}$
EEP EELC	$8,63 \times 10^{-4*}$	$1,10 \times 10^{-7*}$	$1,17 \times 10^{-7*}$
EEP EECU	0,00611*	$3,52 \times 10^{-6*}$	$7,07 \times 10^{-7*}$
EEP EECA	$1,23 \times 10^{-7*}$	$1,03 \times 10^{-7*}$	$7,40 \times 10^{-8*}$

* $p < 0,05$

$\alpha = 0,05$

$p < 0,05$; indica que la diferencia de promedios es significativa

$p > 0,05$; indica que la diferencia de promedios no es significativa