

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ENZIMAS DEL CONTROL
GLICÉMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS
PROVENIENTES DE LA REGIÓN METROPOLITANA, CHILE***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Ciencias Farmacéuticas por:

RUBÉN ELÍAS VEAS ALBORNOZ

**Directores de Tesis:
Dra. Carla Delporte Vergara
Dr. Claudio Olea Azar**

**Codirectora de Tesis:
Dra. M. Carolina Zúñiga López**

**Santiago-CHILE
Agosto 2022**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

RUBÉN ELÍAS VEAS ALBORNOZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias farmacéuticas, en el examen público rendido el día _____

Directores de Tesis:

Dra. Carla Delporte Vergara _____

Dr. Claudio Olea Azar _____

Codirectora de Tesis:

Dra. M. Carolina Zúñiga López _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan Bocian _____

Dra. Paz Robert Canales _____

Dr. Hernán Pessoa Mahana _____

Dr. Alexis Aspée Lamas _____



FINANCIAMIENTO

La investigación de esta tesis fue financiada por:

Beca CONICYT Doctorado Nacional año 2016

Beca CONICYT Gastos Operacionales año 2018



ÍNDICE DE CONTENIDOS

Tabla de abreviaturas.....	VII
Índice de tablas	IX
Índice de figuras.....	XI
Resumen.....	XIV
Summary.....	XVI
Introducción.....	1
1. Propóleo.....	1
1.1. Origen botánico.....	2
1.2. Composición química.....	2
1.3. Actividad biológica.....	5
2. Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).....	5
2.1. Estrés oxidativo.....	6
2.2. Hiperglicemia.....	8
2.2.1. α -glucosidasa.....	8
2.2.2. Glicógeno fosforilasa a.....	10
3. Propóleo y diabetes.....	12
Hipótesis.....	15
Objetivos	16
1. Objetivo general	16
2. Objetivos específicos.....	16
Materiales y métodos	17
1. Reactivos.....	17



2. Muestras de propóleo.....	18
3. Extracción y desecado	18
4. Caracterización química de los extractos etanólicos globales.....	19
4.1. Tamizaje fitoquímico	19
4.2. Cromatografía en capa fina.....	19
4.3. Cromatografía líquida de alta eficacia	20
4.3.1. Condición 1: análisis de vinos.....	20
4.3.2. Condición 2: análisis de propóleos.....	21
5. Estandarización de los extractos etanólicos globales.....	22
5.1. Contenido de fenoles totales.....	22
5.2. Contenido de flavonas y flavonoles.....	22
5.3. Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles	23
6. Control de calidad de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1.....	24
6.1. Análisis gravimétricos.....	24
6.1.1. Pérdida por calentamiento	24
6.1.2. Determinación de porcentajes de cenizas	25
6.1.3. Determinación de índice de oxidación	25
6.1.4. Determinación del porcentaje de sustancias extraíbles en hexano	26
6.1.5. Determinación del porcentaje de resinas.....	26
6.1.6. Impurezas mecánicas	27
6.2. Determinación de compuestos fenólicos.....	28
6.2.1. Contenido de fenoles totales.....	28
6.2.2. Determinación de flavonoides totales	29
7. Actividad inhibitoria de enzimas del control glicémico	29



7.1. Inhibición de la enzima α -glucosidasa.....	29
7.1.1. Modificación del porcentaje de DMSO.....	30
7.1.2. Modificación en el proceso de solubilización.....	30
7.2. Inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a.....	31
8. Capacidad antioxidante.....	33
8.1. Capacidad de absorción de radicales del oxígeno.....	33
8.1.1. ORAC-Fluoresceína (ORAC-FL).....	33
8.1.2. ORAC-Rojo de pirogalol (ORAC-PGR).....	34
8.1.3. ORAC-Resonancia paramagnética de electrón (ORAC-EPR).....	35
8.2. Capacidad antioxidante reductora del ion férrico (FRAP).....	35
9. Fraccionamiento por cromatografía en columna.....	36
10. Análisis de masas.....	37
10.1. Cuantificación de compuestos fenólicos.....	37
10.2. Análisis de identificación metabolómica.....	38
11. Análisis estadístico.....	39
Resultados y discusión.....	41
1. Extracción y descerado.....	41
2. Caracterización química de los EEGs.....	43
2.1. Tamizaje fitoquímico.....	43
2.2. Cromatografía en capa fina.....	44
3. Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos.....	49
4. Estandarización de los extractos etanólicos globales.....	51
4.1. Contenido de fenoles totales.....	51
4.2. Contenido de flavonas y flavonoles.....	53



4.3. Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles	55
5. Control de calidad de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1	58
5.1. Análisis gravimétricos	58
5.1.1. Pérdida por calentamiento	58
5.1.2. Determinación del porcentaje de cenizas	59
5.1.3. Determinación del índice de oxidación	59
5.1.4. Determinación del porcentaje de sustancias extraíbles en hexano	60
5.1.5. Determinación del porcentaje de resinas	60
5.1.6. Impurezas mecánicas	61
5.2. Determinación de compuestos fenólicos	63
5.2.1. Contenido de fenoles totales	63
5.2.2. Determinación de flavonoides totales	64
6. Actividad inhibitoria de la actividad de enzimas del control glicémico	65
6.1. Inhibición de la actividad de la enzima α -glucosidasa	65
6.1.1. Modificación del porcentaje de DMSO	65
6.1.2. Modificación en el proceso de solubilización	67
6.2. Inhibición de la actividad de la enzima glicógeno fosforilasa a	69
7. Capacidad antioxidante	73
7.1. Capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC)	73
7.1.1. ORAC-Fluoresceína (ORAC-FL)	73
7.1.2. ORAC-Rojo de pirogalol (ORAC-PGR)	74
7.1.3. ORAC-Resonancia paramagnética de electrón	77
7.2. Capacidad reductora del ion férrico (FRAP)	78
8. Fraccionamiento por cromatografía en columna	81



9. Análisis de masa	89
9.1. Cuantificación de compuestos fenólicos	89
9.2. Análisis de identificación metabólica	92
Conclusiones.....	99
BIBLIOGRAFÍA	100
ANEXOS	111
Anexo 1: Curvas concentración-respuesta de inhibición de la alfa-glucosidasa y DMSO 8%.....	111
Anexo 2: Espectros UV-Visible de los EEG de propóleos y rangos lineales a 400 nm.....	112
Anexo 3: Curvas concentración-respuesta de inhibición de la alfa-glucosidasa y DMSO 1%.....	113
Anexo 4: Curvas concentración-respuesta de inhibición de glicógeno fosforilasa a (GPa)	114
Anexo 5: Curvas intensidad de fluorescencia vs tiempo y ABC vs concentración (ORAC-FI).....	115
Anexo 6: Curvas intensidad de fluorescencia vs tiempo y ABC vs concentración (ORAC-RPG)	116
Anexo 7: CCF de las fracciones del extracto etanólico global del propóleo de Peñaflor.	117
Anexo 8: Espectros UV-Vis de los 12 patrones contrastados con los EEGs y fracción seleccionados.....	118
Anexo 9: Curvas de calibración de patrones para cuantificación por LC-ESI-MS/MS.....	119



TABLA DE ABREVIATURAS

AAPH:	<i>2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride</i>
ABC:	Área bajo la curva
ACN:	Acetonitrilo
CAPE:	<i>Caffeic acid phenethyl ester</i> (Feniletíl éster del ácido cafeico)
CCF:	Cromatografía en capa fina
CFD:	Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles
CFF:	Contenido de flavonas y flavonoles
CFT:	Contenido de fenoles totales
Cl ₅₀ :	Concentración inhibitoria 50
CLAE:	Cromatografía líquida de alta eficiencia
DAD:	Detector de arreglo de diodos
DMPO:	<i>5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide</i>
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNP:	2,4-dinitrofenilhidracina
EAG:	Equivalentes de ácido gálico
EEG:	Extracto etanólico global
EGTA:	Ácido etilenglicoltetraacético
EN:	Equivalentes de naringenina
EPR:	<i>Electron paramagnetic resonance</i>
EQ:	Equivalentes de quercetina
ES:	Extracto etanólico global seco
ESI:	<i>Electro-spray ionization</i>
F-C:	Folin-Ciocalteu
FA-I:	Fracción A – Fracción I
FL:	Fluoresceína
FRAP:	<i>Ferric reducing antioxidant power</i>
GP:	Glicógeno fosforilasa



GPa:	Glicógeno fosforilasa activa
GPb:	Glicógeno fosforilasa inactiva
HAC:	Ácido acético
HEPES:	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
LB:	Liebermann-Burchard
MeOH:	Metanol
MoNA:	<i>MassBank of North America</i>
MRM:	Monitoreo de reacción múltiple
MS/MS:	Espectrometría de masa en tándem
NP/PEG:	<i>Natural Product/Poli(etilenglicol)</i>
ORAC:	<i>Oxygen radicals absorbance capacity</i>
PAAS:	p-anisaldehído sulfúrico
PC:	Propóleo crudo
PGR:	<i>Pirogalol Red</i> (Rojo pirogalol)
pNPG:	p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido
pNPP:	p-nitrofenil-pirofosfato
PLa:	Propóleo de Lampa
PMe:	Propóleo de Melipilla
PPc:	Propóleo de Pichidegua
PPi:	Propóleo de Pirque
PPe:	Propóleo de Peñaflores
PPu:	Propóleo de Pudahuel
R _i :	Factor de retardo
RM:	Región metropolitana
R _t :	Tiempo de retención
SET:	<i>Single electron transfer</i>
Spp.:	Especies
TPTZ:	<i>2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine</i>
UV-VIS:	Ultravioleta – Visible



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Sistema de gradiente binario acetonitrilo (ACN)/ácido acético 1% (HAC 1%)	21
Tabla 2: Sistema de gradiente binario ácido acético 1% (HAC)/metanol (MeOH).	21
Tabla 3: Propóleos, localidad, obtención y año de recolección	41
Tabla 4: Rendimiento de los EEGs obtenidos desde propóleos crudos	42
Tabla 5: Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos globales.	43
Tabla 6: Familia de compuestos presentes en los EEGs mediante análisis de CCF y revelador NP/PEG	47
Tabla 7: Familia de compuestos presentes en los EEGs mediante análisis de CCF y reveladores PAAS y LB	49
Tabla 8: Contenido de fenoles totales, flavonas y flavonoles y flavanonas y dihidroflavonoles	57
Tabla 9: Pruebas gravimétricas de los distintos propóleos seleccionados.	62
Tabla 10: Determinación de compuestos fenólicos en las muestras de propóleo crudo.	65
Tabla 11: Concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀) frente a las enzimas α -glucosidasa y glicógeno fosforilasa a.....	71
Tabla 12: Inhibición de AG y GP _a con distintos compuestos aislados presentes en propóleos.....	72
Tabla 13: Índice ORAC-FI y ORAC-PGR de los EEGs de los propóleos de Pirque, Pudahuel y Peñafior	77
Tabla 14: Valores ORAC-EPR de los EEGs.....	77
Tabla 15: Valor FRAP de los EEGs de los propóleos de Pirque, Pudahuel y Peñafior	79
Tabla 16: Fracciones del EEG de PPe y sus rendimientos.	82
Tabla 17: Porcentajes de inhibición de las fracciones hijas del EEG de PPe.....	85
Tabla 18: Caracterización por CCF y cuantificación relativa por CLAE-DAD de patrones.	88



Tabla 19: Compuestos identificados y cuantificados por LC-ESI-MS/MS.	91
Tabla 20: Compuestos identificados y cuantificados de forma relativa por LC-ESI-MS/MS en modo positivo.....	93
Tabla 21: Compuestos identificados y cuantificados de forma relativa por LC-ESI-MS/MS en modo negativo	95



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Propóleo crudo proveniente de la localidad de Pirque	1
Figura 2: Estructuras químicas de distintas clases de fenoles presentes frecuentemente en los propóleos.	3
Figura 3: Estructura química de las subclases de flavonoides presentes frecuentemente en propóleos.....	4
Figura 4: Resumen de tipos y fuentes de ERO y punto de acción de los antioxidantes.	8
Figura 5: α -glucosidasas humanas y porcentaje de homología.	9
Figura 6: Glicógeno fosforilasa. Control de la actividad por fosforilación e interacciones alostéricas (Agius, 2015).	11
Figura 7: Mecanismos de acción probables de polifenoles ingeridos por vía oral frente a la diabetes (Kim et al., 2016).....	13
Figura 8: Esquema de los posibles complejos formados entre las flavonas y flavonoles y el $AlCl_3$	23
Figura 9: Reacción implicada en la metodología de la 2,4-dinitrofenilhidracina	24
Figura 10: Reacción enzimática de las α -glucosidasas.....	30
Figura 11: Reacción catalizada por la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa).....	32
Figura 12: Reducción del complejo $TPTZ_2Fe^{3+}$ a $TPTZ_2Fe^{2+}$	36
Figura 13: Esquema de las etapas del estudio.....	40
Figura 14: Cromatografía en capa fina de los EEGs bajo luz UV.....	45
Figura 15: Cromatografía en capa fina de los EEGs revelados con NP/PEG a 365 nm.	47
Figura 16: Cromatografía en capa fina de los EEGs revelados con PAAS al visible y a 365 nm.	48
Figura 17: Cromatografía en capa fina de los EEGs revelados con LB al visible y a 365 nm.	48
Figura 18: Cromatogramas de los EEGs de los propóleos de las distintas localidades a 280 nm.	50



Figura 19: Cromatogramas de los EEGs de los propóleos de las distintas localidades a 360 nm.	51
Figura 20: Contenido de fenoles totales mediante la metodología de Folin-Ciocalteu	52
Figura 21: Contenido de flavonas y flavonoles mediante la metodología del AlCl_3	54
Figura 22: Espectro de absorción UV-Vis y curva de calibración con naringenina	55
Figura 23: Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles mediante la metodología de la DNP	56
Figura 24: Curva de calibración de ácido gálico por metodología de Folin-Ciocalteu.	63
Figura 25: Curva de calibración de quercetina obtenida por método del tricloruro de aluminio (AlCl_3).....	64
Figura 26: Porcentaje de dimetilsulfóxido e inhibición de la actividad de la enzima α -glucosidasa	66
Figura 27: Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de los EEGs frente a α -glucosidasa	68
Figura 28: Comparación de las CI_{50} por modificaciones en la metodología	69
Figura 29: Concentración inhibitoria 50 frente a glicógeno fosforilasa a.	70
Figura 30: Índice ORAC-FL para los extractos etanólicos globales (EEGs) de propóleo.	74
Figura 31: Índice ORAC-RPG para extractos etanolicos globales (EEGs) de propóleo.	76
Figura 32: curva de calibración con trolox	78
Figura 33: Valores FRAP de los EEGs.....	79
Figura 34: Cromatografía en columna del extracto etanólico global del propóleo de Peñaflor.....	82
Figura 35: Cromatografía en capa fina de las fracciones hijas del EEG de PPe...	84
Figura 36: Ensayos de inhibición enzimáticas de las fracciones hijas del EEG de PPe.....	85



Figura 37: Cromatografía en capa fina de los EEGs seleccionado y la fracción hija del EEG de PPe.	87
Figura 38: Cromatogramas de los EEGs de los propóleos, fracción hija seleccionada y patrones a 270 nm.....	88
Figura 39: Correlación entre los compuestos cuantificados y actividades evaluadas.	92
Figura 40: Análisis de componentes principales para los datos obtenidos por análisis metabólico en modo positivo y modo negativo.	97
Figura 41: Localidades de Pirque, Pudahuel y Peñaflores.....	98



RESUMEN

El propóleo es una sustancia resinosa generada por abejas *Apis mellifera* mediante la mezcla de exudados de plantas mezcladas con sus secreciones salivales, cera y polen. El propóleo cumple una finalidad protección a la colmena de factores ambientales, insectos depredadores y patógenos.

Se han investigado propóleos de todo el mundo debido a su compleja y variada composición química y los resultados muestran que los propóleos son una fuente importante de productos naturales con distintas actividades biológicas como: antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios y cicatrizantes, además de actividades antiproliferativas y efectos antihiperglicemiantes, hipoglicemiantes y moduladores de la resistencia a la insulina. Estas últimas actividades se vuelven relevantes cuando la Federación Internacional de Diabetes (IDF, *International Diabetes Federation*) indica que la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en el año 2021 daba cuenta de que uno de cada nueve adultos en el mundo tenía diabetes y que para el año 2045 uno de cada ocho adultos en el mundo padecerá esta enfermedad.

En Chile la prevalencia de diabetes bordea el 11% y solo entre un 17,6% a 19,7% de los diagnosticados están bien controlados, según datos del MINSAL del año 2010. Además, en Chile los propóleos tienen pocos estudios y una amplia producción por lo que se ha planteado como objetivo general determinar en forma comparativa los perfiles fenólicos y la actividad inhibitoria de la actividad de enzimas del control glicémico como la α -glucosidasa y glicógeno fosforilasa a, además de la capacidad antioxidante de extractos ricos en fenoles de propóleos de distintas localidades de la Región Metropolitana de Chile.

Los extractos etanólicos globales (EEG) de seis propóleos distintos de las localidades de Pichidegua, Pirque, Melipilla, Lampa, Pudahuel y Peñaflo presentaron similar contenido de fenoles totales destacando el EEG del propóleo de Melipilla con $20,6 \pm 1,2$ g EAG/100 g ES. Sin embargo, el EEG del propóleo de



Peñaflor presentó el mayor contenido de flavonas y flavonoles, mientras que fue el que presentó menor contenido de flavanonas y dihidroflavonoles (flavanonoles) con $6,2 \pm 0,8$ g EQ/100g ES y $17,5 \pm 1,6$ g EN/100 g ES, respectivamente.

Se seleccionaron los propóleos de la localidad de Pirque, Pudahuel y Peñaflor en base a las características del manejo postcosecha e información de flora circundante de las colmenas y se evaluó la calidad de los propóleos recolectados según la norma argentina IRAM-INTA 15935-1 del 2008. El propóleo de la localidad de Peñaflor fue el único que cumplió con todos los criterios de calidad.

Al evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* frente a las enzimas del control glicémico el EEG del propóleo de Peñaflor resultó ser el más activo con una CI_{50} de $7,5 \pm 2,4$ $\mu\text{g/mL}$, unas 35 veces más potente que el control positivo acarbosa ($259,1 \pm 33,4$ $\mu\text{g/mL}$), en el caso de la enzima α -glucosidasa y de $11,2 \pm 0,6$ $\mu\text{g/mL}$, unas dos veces menos potente que el control positivo, cafeína ($5,3 \pm 0,7$ $\mu\text{g/mL}$), en el caso de la enzima glicógeno fosforilasa a.

Todos los EEGs mostraron buena capacidad antioxidante, aunque por metodologías distintas, destacando el EEG del propóleo de Peñaflor en el ensayo ORAC-FL con un valor de $22,0 \pm 1,5$ $\mu\text{mol eq trolox/mg ES}$ y en el ensayo FRAP a los 4 y 60 minutos con $1,30 \pm 0,05$ y $2,3 \pm 0,1$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg ES}$.

Se fraccionó el EEG del propóleo de Peñaflor con la intención de purificar compuestos y la fracción D fue la que presentó la mayor actividad inhibitoria *in vitro* frente a las enzimas α -glucosidasa ($52,6 \pm 13,6$ %) y glicógeno fosforilasa a ($22,1 \pm 6,5$ %).

Finalmente, el análisis de masas da cuenta de diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición de los EEGs de los distintos propóleos que pueden asociarse a las diferencias de origen geográfico y botánico en la Región Metropolitana, destacando la presencia de isorhamnetina y canferol en las muestras como componentes mayoritarios respecto a los cuantificados en este estudio.



SUMMARY

Propolis is a resinous substance generated by honeybees *Apis mellifera* by mixing plant exudates with their salivary secretions, wax, and pollen. Propolis serves a purpose of protecting the hive from environmental factors, predatory insects, and pathogens.

Propolis from all over the world has been investigated due to its complex and varied chemical composition and the results show that propolis is an important source of natural products with different biological activities such as: antioxidants, antimicrobials, anti-inflammatories, and healing, as well as antiproliferative activities and antihyperglycemic, hypoglycemic and modulating effects of insulin resistance. These last activities become relevant when the International Diabetes Federation (IDF) indicates that the prevalence of type 2 diabetes mellitus in 2021 realized that one in nine adults in the world had diabetes and that by 2045 one in eight adults in the world will suffer from this disease.

In Chile, the prevalence of diabetes is around 11% and only between 17.6% and 19.7% of those diagnosed is well controlled, according to MINSAL data from 2010. In addition, in Chile propolis have few studies and a wide production so it has been proposed as a general objective to determine in a comparative way the phenolic profiles and the inhibitory activity of glycemic control enzymes such as α -glucosidase and glycogen phosphorylase a, in addition to the antioxidant capacity of extracts rich in phenols of propolis from different localities of the Región Metropolitana of Chile.

The global ethanolic extracts (GEE) of six different propolis from the localities of Pichidegua, Pirque, Melipilla, Lampa, Pudahuel and Peñaflores presented similar content of total phenols highlighting the GEE of Melipilla propolis with 20.6 ± 1.2 g GAE/100 g DE. However, the GEE of Peñaflores propolis had the highest content of flavones and flavonols, while it was the one with the lowest content of flavanones and dihydroflavonols (flavanonols) with 6.2 ± 0.8 g QE/100g DE and 17.5 ± 1.6 g NE/100 g DE, respectively.



The propolis of the locality of Pirque, Pudahuel and Peñaflores were selected based on the characteristics of post-harvest management and information on the surrounding flora of the hives. The quality of the propolis collected was evaluated according to the Argentine standard IRAM-INTA 15935-1 of 2008. Propolis from the town of Peñaflores was the only one that met all the quality criteria.

When evaluating the inhibitory activity *in vitro* against the enzymes of glycemic control, the EEG of Peñaflores propolis turned out to be the most active with an IC_{50} of $7.5 \pm 2.4 \mu\text{g/mL}$, about 35 times more powerful than the positive control, acarbose ($259.1 \pm 33.4 \mu\text{g/mL}$), in the case of the enzyme α -glucosidase and $11.2 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$, about twice as potent as the positive control, caffeine ($5.3 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$), in the case of the enzyme glycogen phosphorylase a.

All the GEEs showed good antioxidant capacity, although by different methodologies, highlighting the GEE of Peñaflores propolis in the ORAC-FL trial with a value of $22.0 \pm 1.5 \mu\text{mol Trolox eq/mg DE}$ and in the FRAP trial at 4 and 60 minutes with 1.30 ± 0.05 and $2.3 \pm 0.1 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg DE}$.

The GEE of Peñaflores propolis was fractionated with the intention of purifying compounds and the D fraction presented the greatest inhibitory activity *in vitro* against the enzymes α -glucosidase ($52.6 \pm 13.6 \%$) and glycogen phosphorylase a ($22.1 \pm 6.5 \%$).

Finally, the mass analysis accounts for qualitative and quantitative differences in the composition of the GEEs of the different propolis that can be associated with the differences of geographical and botanical origin in the Región Metropolitana, highlighting the presence of isorhamnetin and kaempferol in the samples as majority components respect to those quantified in this study.

INTRODUCCIÓN

1. Propóleo

El propóleo (Figura 1) es una sustancia resinosa producida por las abejas, principalmente las abejas melíferas, *Apis mellifera*. La abeja recolectora se encarga de buscar y recolectar la resina a partir de exudados de algunos órganos de las especies vegetales que visitan, como yemas, flores, hojas, cortezas, entre otras y las mezcla con sus secreciones salivales y polen para posteriormente cargarla en sus corbículas. Una vez en la colmena, la abeja constructora toma la resina masticada de las corbículas y la mezcla con sus ceras y la dispone en lugares donde se requiera, como en la construcción y reforzamiento de las celdas de la colmena; para dar protección a las colmenas ya sea de factores ambientales como el frío, la humedad y el viento; para embalsamar insectos invasores o abejas muertas, y así, protegerse de patógenos producidos por la descomposición; y para mantener saludable a la colmena, dada su actividad antimicrobiana (Isidorov et al., 2016; Simone-Finstrom & Spivak, 2010).



Figura 1: Propóleo crudo proveniente de la localidad de Pirque

1.1. Origen botánico

La composición del propóleo es variable y depende en mayor medida de las especies vegetales que visitan las abejas (Ristibojevik et al., 2015), de esta forma se pueden encontrar estudios que determinan el origen botánico de propóleos originarios de distintos países y zonas climáticas diferenciadas. Cabe destacar el propóleo verde de Brasil cuya fuente de resina son las especies del género *Baccharis* (*Baccharis* spp.), propóleos Rojos de Cuba, Brasil y México, siendo las *Dalbergia* spp. la fuente de resina y en zonas templadas de Europa y América, la principal fuente de resina son las especies de álamo (*Poplar* spp.). Se ha determinado en el propóleo tipo álamo que en promedio el 50% corresponde a resina, el 30% a cera, un 10% a aceites esenciales, un 5% a pólenes y un 5% a otras materias orgánicas (Bogdanov, 2016; Castaldo & Capasso, 2002).

El análisis del material polínico presente en las muestras de propóleo es fundamental para estimar el origen botánico, dado que el grano de polen es específico tanto en su forma como su estructura para determinados taxones de plantas. En Chile, ha habido interés por establecer el origen botánico de algunos propóleos provenientes del centro y sur del país, entre los grupos de investigación, destaca el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (Alvear et al., 2021; Bridi et al., 2015; Valenzuela-Barra et al., 2015; Castro, 2014, Barrientos et al., 2013; Montenegro et al., 2004).

Además del origen botánico, la composición del propóleo dependerá de la variabilidad estacional, geográfica y del sistema de recolección, lo que se traduce en que los propóleos presentan diferencias en su composición química y por lo tanto en las propiedades biológicas (Bankova, 2005; da Silva Frozza et al., 2013).

1.2. Composición química

El componente más importante del propóleo corresponde a la resina, la cual está constituida principalmente por metabolitos secundarios provenientes de los

exudados de las especies vegetales que las abejas visitan y a los cuales se le han atribuido las propiedades biológicas del propóleo. Los compuestos presentes en la resina corresponden principalmente a polifenoles (Figura 2) del tipo flavonoides, observándose una mayor proporción de geninas que de heterósidos, ácidos fenólicos y sus derivados éster, pudiendo observarse también la presencia de algunos lignanos y estilbenoides. Se han determinado más de 300 compuestos distintos en el propóleo y al menos 150 tipos distintos de flavonoides (Giampieri, 2021). Muchos autores clasifican al propóleo como un bálsamo o resina balsámica, esto se debe a su alto contenido en ácidos fenólicos (Bruneton J. 2001).

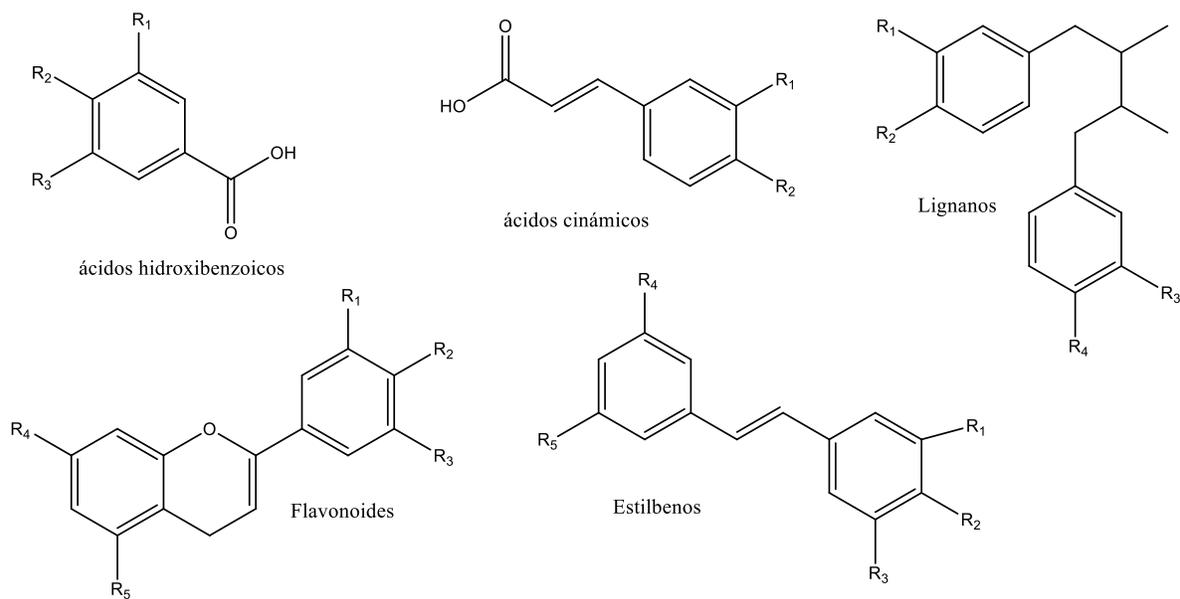


Figura 2: Estructuras químicas de distintas clases de fenoles presentes frecuentemente en los propóleos.

Entre los fenoles, los flavonoides (Figura 3) son los polifenoles más estudiados, éstos pueden ser divididos en seis subclases dependiendo de características estructurales como: saturación del enlace que comprende a los carbonos 2 y 3, ausencia o presencia del carbonilo en la posición 4, posición del grupo fenil en el anillo C, presencia o ausencia del hidroxilo en la posición 3 y/o carga del oxígeno en el anillo C.

En el último tiempo, un gran número de estudios han determinado ciertas propiedades biológicas de estos metabolitos secundarios, destacando los efectos antitumorales, sobre enfermedades vasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas, ya que actúan sobre blancos farmacológicos específicos o por sus propiedades antioxidantes (Pandey & Rizvi, 2009).

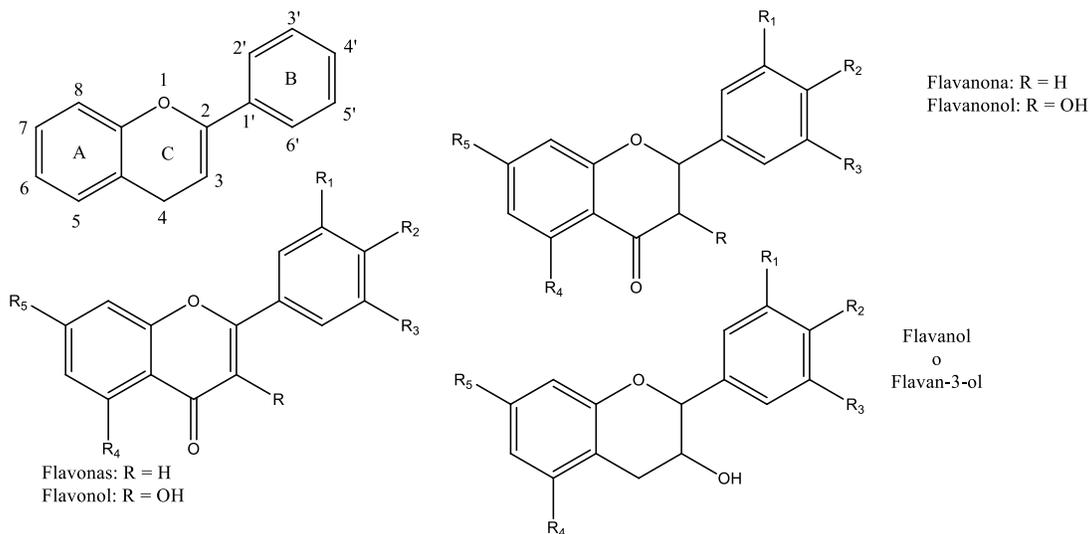


Figura 3: Estructura química de las subclases de flavonoides presentes frecuentemente en propóleos

A nivel nacional, un bajo porcentaje de los propóleos de distintas localidades y regiones han sido estudiados, tanto en su composición como en sus efectos biológicos. De los estudios que han sido publicados respecto de su composición se ha determinado la presencia mayoritaria de fenoles como quercetina, quercetina-3-metil-eter, canferol, pinobanksina, quercetina-dimetil-eter, luteolina-metil-eter, drupanina, CABE (bencil éster del ácido cafeico), pinocembrina, galangina, pinocembrina-3-O-acetato, crisina y CAPE (feniletíl éster del ácido cafeico) en propóleos provenientes de las localidades de Buin y Caleu de la Región Metropolitana de Chile. Además de ácido cafeico-O-glucósido, 7,8-dihidroxi-metoxi-6-cumarina, quercetina-O-glucósido, apigenina-O-rutinósido, pinobanksina-3-O-pentanoato de propóleos provenientes del centro de Chile (Valenzuela-Barra et al., 2015; Castro et al., 2014; Herrera et al., 2010; Muñoz, et al., 2000; Muñoz et al., 2001).

1.3. Actividad biológica

Muchos estudios se han enfocado en demostrar distintas actividades biológicas debido a la variada y compleja composición química del propóleo. Los resultados han demostrado que los propóleos son una fuente importante de productos naturales con distintas actividades biológicas, destacando la actividad antioxidante dado el alto contenido de fenoles en extractos etanólicos e hidroalcohólicos de propóleo. La actividad antimicrobiana también es una de las actividades demostradas para un alto porcentaje de propóleos y está relacionada con el uso por parte de las abejas para mantener el ambiente estéril de las colmenas y la salud de las abejas. Por otra parte, se ha establecido para algunos propóleos su actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora, antitumoral y cicatrizante, así como actividades antiproliferativas, antihipertensivas y antidiabéticas, que se correlacionan directamente con los compuestos fenólicos que los constituyen (Bongadov, 2016; Freires et al., 2016; Sforcin, 2016; Castaldo & Capasso, 2002), siendo esta última, la actividad antidiabética por sus efectos antihiperlicemiante, hipoglicemiante y atenuadora de la resistencia a la insulina, de interés para este estudio.

2. Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

La DMT2 es una enfermedad heterogénea, compleja, interrelacionada que involucra etiologías multigénicas y que se caracteriza por una elevación crónica de la glicemia.

Las alteraciones clásicas en esta condición son caracterizadas por la combinación de:

- I. Resistencia a la insulina (RI),
- II. Deterioro progresivo de las células β pancreáticas, que resulta en una secreción y liberación de insulina alterada y

- III. Aumento en la producción de glucosa hepática como resultado del aumento de la glucogenólisis, gluconeogénesis y consecuentemente, un aumento de la glicemia.

La elevación temprana de la glucosa postprandial en el desarrollo de la DMT2, asociado con la RI progresiva, resulta en una hipertrofia compensatoria de las células beta en los islotes de Langerhans, lo que lleva a una disminución en la producción de insulina (Al-Dallenet al., 2004; Codario, 2011; Giacco & Brownlee, 2010).

Según datos de la Federación Internacional de Diabetes (IDF, *International Diabetes Federation*) la prevalencia de DMT2 en el año 2021 daba cuenta de que uno de cada nueve adultos en el mundo tenía diabetes y que para el año 2045 uno de cada ocho adultos en el mundo padecerá esta enfermedad. En nuestro país la prevalencia de diabetes bordea el 11%, además, sobre el 85% de las personas que tiene diabetes conoce su condición; el problema radica en que un bajo porcentaje de las personas afectadas (entre un 17,6 y 19,7%) está bien controlado, es decir, en un estado de euglicemia, según datos del Ministerio de Salud (MINSAL) del año 2010.

2.1. Estrés oxidativo

Producto del estado de hiperglicemia crónica, diferentes alteraciones en las vías de señalización y daño a nivel celular pueden ser activados, como:

- I. Formación de productos finales de glicación avanzada (AGE, *advance glycation end-products*) por oxidación intracelular de glucosa,
- II. Aumento de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ERO/ERN),
- III. Activación de las isoformas de la proteína quinasa C (PKC, *protein kinase C*), grupo de proteínas dependientes de fosfolípidos,
- IV. Aumento de la actividad de la aldosa reductasa, lo que acumula sorbitol y disminuye los niveles de taurina y mioinositol,
- V. Aumento del flujo a través de la vía de la hexosamina

Estas cinco vías convergen a una vía común, la cual se cree es el mecanismo subyacente y responsable de las complicaciones micro- y macroangiopáticas de la DMT2, la sobreproducción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) inducido por la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Todo esto finalmente lleva a un estado de estrés oxidativo, que se entiende por un desbalance entre los mecanismos anti- y prooxidantes en el organismo (Al-Dallen et al., 2004; Codario, 2011; Giacco & Brownlee, 2010).

Los polifenoles pueden ser moléculas antioxidantes que pueden neutralizar radicales libres por aceptación, donación de electrones y/o donación de un átomo de hidrógeno para eliminar la condición desapareada del radical (Figura 4). Otra importante función de los antioxidantes es regular enzimas relacionadas a las ERO, disminuyendo el nivel celular de radicales libres ya sea por inhibición de la actividad o expresión de enzimas generadoras de radicales libres como NADH/NADPH oxidasa y xantina oxidasa (XO) o por aumento de la actividad y expresión de enzimas antioxidantes como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX). Por otra parte, los metales de transición como el cobre y el hierro en su estado reducido (Fe^{2+} y Cu^+) reaccionan con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) para producir el altamente reactivo radical hidroxilo ($\cdot OH$). El Fe^{2+} y Cu^+ son oxidados a Fe^{3+} y Cu^{2+} , respectivamente, que en presencia de agentes reductores son reducidos y permiten ser reciclados para reaccionar con otras moléculas de H_2O_2 para generar nuevo radical hidroxilo. Quelar los iones metálicos puede disminuir su actividad, por lo tanto reducir la formación de ERO (Lü et al., 2010).

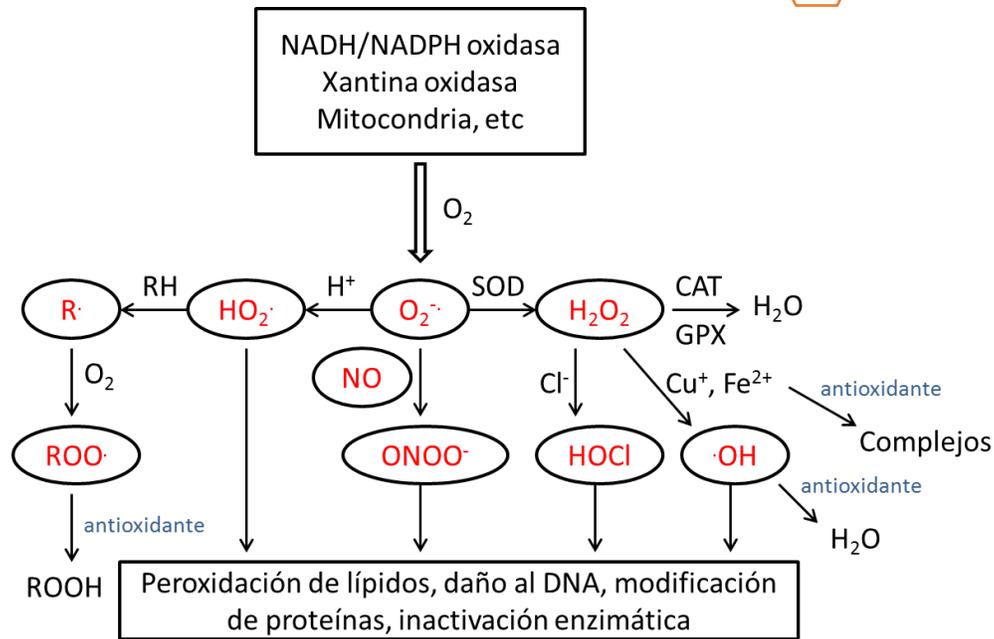


Figura 4: Resumen de tipos y fuentes de ERO y punto de acción de los antioxidantes.

O_2 , oxígeno; $O_2\cdot^-$, anión superóxido; $HO_2\cdot$, radical perhidroxilo; $\cdot OH$, radical hidroxilo; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; $HOCl$, ácido hipocloroso; $ONOO^-$, peroxinitrito; $R\cdot$, radical alquilo; RH , lípido; $ROO\cdot$, radical peroxilo; $ROOH$, hidroperóxido; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa y GPX, glutatión peroxidasa (Lü et al., 2010).

2.2. Hiperglicemia

2.2.1. α -glucosidasa

Las glucosidasas son una clase importante de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos en oligosacáridos y glucoconjugados. Están involucradas en diferentes actividades biológicas relacionadas a desordenes metabólicos y enfermedades como la diabetes, obesidad, enfermedad de depósito lisosomal de glucoesfingolípidos, infección asociada al VIH y tumores (Chandran et al., 2015).

La α -glucosidasa intestinal (Figura 5) es una enzima exocarbohidrasa, que se encuentra localizada en la membrana superficial de las microvellosidades de las células intestinales (enterocitos), cataliza la última etapa del metabolismo de glúcidos mediante la hidrólisis de carbohidratos complejos y disacáridos, de la porción terminal no reductora, a monosacáridos absorbibles provocando así un

aumento en los niveles de glucosa en sangre (Lordan et al., 2013; Zhang et al., 2015).

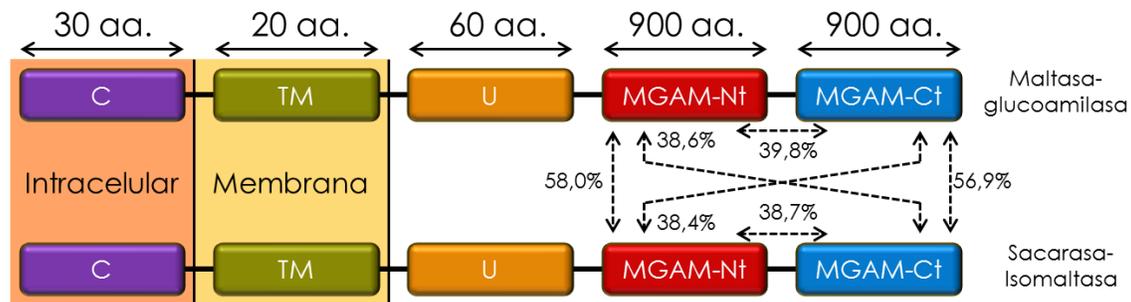


Figura 5: α -glucosidasas humanas y porcentaje de homología. MGMA (maltasa-glucoamilasa) y SI (sacarasa-isomaltasa), los porcentajes muestran la homología de aminoácidos en los distintos sitios catalíticos (Nakamura et al., 2012). C: dominio citosólico, TM: dominio transmembrana; U: dominio de unión, Nt: Nitrógeno terminal, Ct: Carbono terminal.

La inhibición de la actividad de estas enzimas hidrolíticas disminuye el influjo de glucosa desde el tracto intestinal a los vasos sanguíneos resultando en una disminución de la glicemia postprandial. Comercialmente se encuentran disponibles inhibidores de la actividad de la α -amilasa y α -glucosidasa: acarbosa, miglitol y voglibosa, fármacos efectivos en atenuar la hiperglicemia postprandial (Codario, 2011), sin embargo en Chile no se encuentran disponibles. Hasta hace algunos años, sólo se encontraba disponible acarbosa, que presenta efectos no deseados que interfieren en la adherencia al tratamiento, lo que ha motivado la búsqueda de nuevos compuestos capaces de inhibir esta enzima. Algunos estudios dan cuenta de la inhibición de α -glucosidasa por compuestos triterpénicos pentacíclicos (Alejandro-Espinosa et al., 2013; Hou et al., 2009), así como también se han estudiado los efectos en la inhibición de α -glucosidasa de distintos compuestos fenólicos obtenidos de extractos de propóleos, maqui y murta (Rubilar et al., 2011; Zhang et al., 2015) y de compuestos fenólicos aislados como miricetina, rutina y quercetina (Hyun et al., 2014; Li et al., 2009) entre otros muchos compuestos (Nurul Islam et al., 2013; Yin et al., 2014; Zhao et al., 2009).

2.2.2. Glicógeno fosforilasa a

Se estima que la degradación de glicógeno aporta desde un 40 a un 80% de la glucosa plasmática en estado de ayuno. Este proceso lo lleva a cabo la enzima glicógeno fosforilasa (GP) (Bollen et al., 1998). Esta enzima es una hidrolasa homodimérica encargada de liberar glucosa-1-fosfato (G1P) a partir de glicógeno, posee siete sitios alostéricos por los cuales responde a diversos factores tanto intra- como extracelulares por lo que se ha considerado un blanco importante para el tratamiento de la DMT2 (Nagy et al., 2018). Posee 3 isoformas que llevan el nombre del tejido donde se expresan preferentemente: GP hepática, GP muscular y GP cerebral, sin embargo todas tienen el mismo peso molecular de 194 kDa (97 kDa por monómero) y una homología de un 80% aproximadamente (Treadway et al., 2001).

La GP (Figura 6) es regulada en un sitio alostérico por fosforilación en la serina de la posición 14 por parte de la quinasa de la fosfatasa (Phk), lo que confiere a la GP su estado activo (GP_a), también es regulada por la proteína fosfatasa 1c (PP1c) quien desfosforila la GP_a para dar lugar al estado inactivo de la enzima (GP_b). Además, la GP existe en un equilibrio de estados conformacionales entre un estado activo relajado (R) con mayor afinidad por el AMP (adenosina mono-fosfato) y la cola C-terminal de la proteína fosfatasa 1 reguladora de la subunidad 3C (PPP1R3C) también conocida como proteína que une glucógeno (PTG), que además la estabilizan; y un estado inactivo tenso (T) con mayor afinidad por la glucosa, glucosa-6-P, cafeína y ácido úrico, los que estabilizan la forma T de la enzima y deja expuesta la serina fosforilada para su posterior desfosforilación. Se postula que los inhibidores de la GP pueden estabilizar alguno de los estados conformacionales que regulan a la enzima (Agius, 2015).

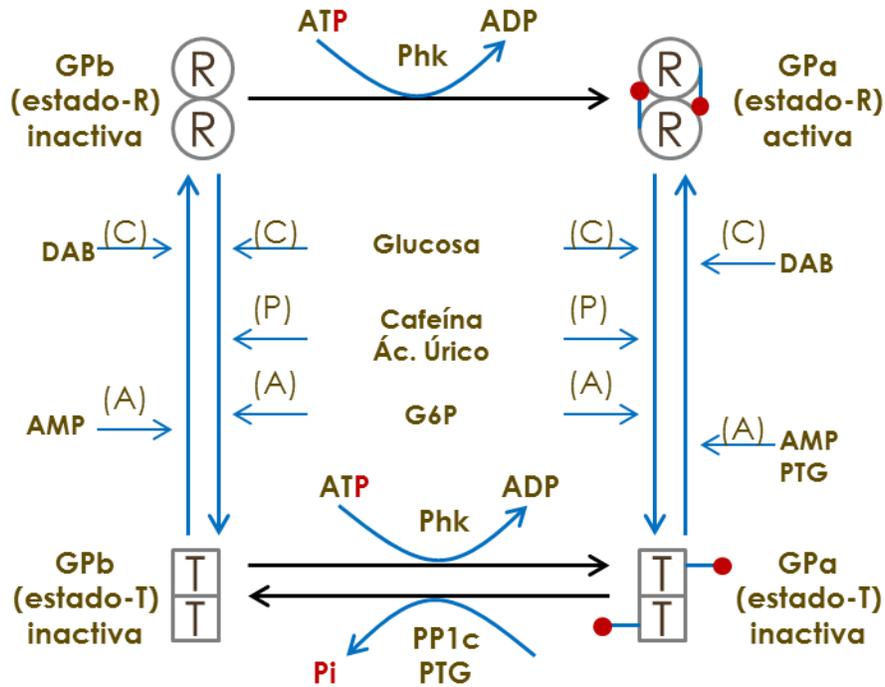


Figura 6: Glicógeno fosforilasa. Control de la actividad por fosforilación e interacciones alostéricas (Agius, 2015).

A: sitio del AMP, ATP: adenosina trifosfato, ADP: adenosina difosfato, AMP: adenosina monofosfato, C: sitio activo, DAB: 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol, G6P: glucosa-6-fosfato, GPa: glicógeno fosforilasa activa, GPb: glicógeno fosforilasa inactiva, P: sitio de unión de purina, Phk: proteína quinasa de la fosforilasa, PP1c: Proteína fosfatasa 1c, PTG: Proteína que une glicógeno, R: estado relajado y T: estado activo.

Al igual que para la α -glucosidasa, diferentes investigaciones se han llevado a cabo en la búsqueda de nuevos compuestos inhibidores de la actividad de la GP en sus distintos estados y conformaciones. Se ha reportado su inhibición por parte de flavonoides como quercetina, crisina, naringenina, apigenina, luteolina, epigallocatequina galato entre otros flavonoides, así como ácido elágico y antocianidinas como cianidina, delphinidina, malvidina y peonidina (Jakobs et al., 2006).

3. Propóleo y diabetes

Dado que el propóleo es una fuente rica principalmente en compuestos fenólicos, y un porcentaje importante de estos compuestos intervienen en alguna vía por la cual el organismo regula los niveles de glucosa sanguínea, se ha determinado las propiedades antihiperlipemiantes e hipoglicemiantes, así como la reducción de resistencia a la insulina de propóleos de distintas localidades del mundo.

Diversos estudios de propóleos brasileros, han establecido que éste es capaz de disminuir la RI en ratas OLETF por vía oral, disminuyendo los niveles de glucosa sanguínea, presión arterial sistólica y los niveles de insulina (Aoi et al., 2013), así como disminuir los niveles de glucosa sanguínea y colesterol y aumentar la sensibilidad a insulina pesquisada mediante la prueba de tolerancia oral de glucosa (TTOG) y de tolerancia a la insulina (TTI) en ratones ob/ob por administración intraperitoneal (i.p.) de extractos etanólicos de propóleos (Kitamura et al., 2013). Por otra parte, se ha determinado que la administración por vía oral de extractos etanólicos de propóleos en ratones machos ICR (Institute of Cancer Research) y SD (Sprague Dawley), aumentan la captación de glucosa en células L6, por aumento en la translocación de transportadores de glucosa GLUT4 vía PI3K y AMPK así como inhibición de α -glucosidasa (Ueda et al., 2013). Resultados similares se obtuvo en un estudio realizado con propóleos de Nigeria en un modelo de ratas con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) inducido por aloxano, éstos disminuyeron los niveles de glucosa sanguínea y hemoglobina glicosilada (HbA1c) y aumentaron los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) plasmática (Oladayo, 2016).

Los efectos sobre uno o más blancos terapéuticos relacionados a la regulación de la glicemia por algunos propóleos (Figura 7), pueden ser explicados porque contienen diferentes compuestos. Algunos de estos compuestos, que además son los más representativos por encontrarse en la mayoría de los propóleos del mundo, corresponden a: CAPE, galangina, crisina, quercetina y canferol entre otros (Antonio & Tânia, 2017; Kim et al., 2016; Lee et al., 2007; Rasouli et al., 2017)

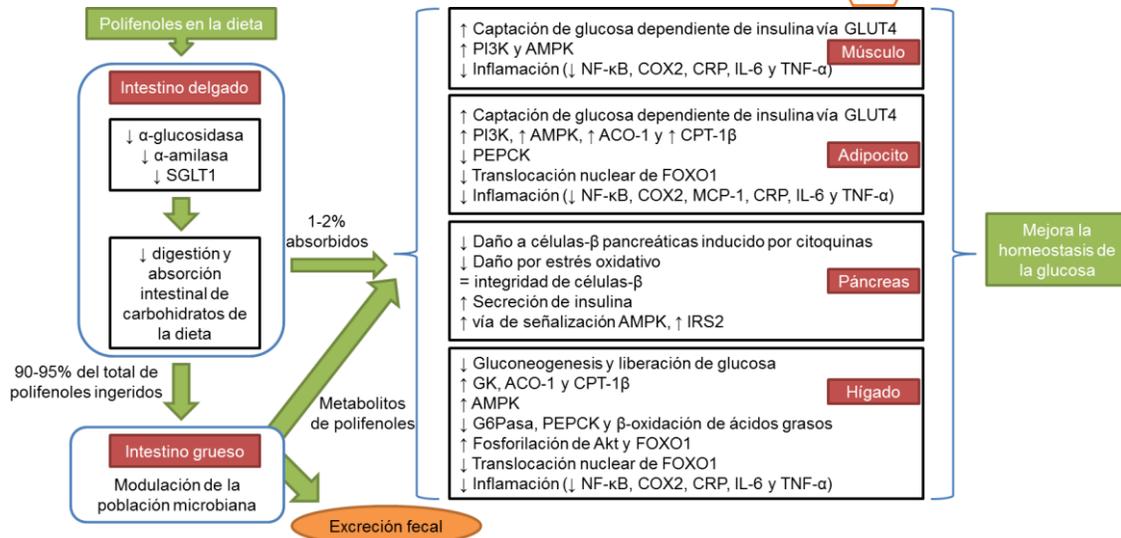


Figura 7: Mecanismos de acción probables de polifenoles ingeridos por vía oral frente a la diabetes (Kim et al., 2016).

Por otra parte en Chile, existe un único trabajo en el que se ha estudiado el efecto de los propóleos sobre el metabolismo de la glucosa en ratones diabéticos C57BL/6 machos de 6 a 8 semanas de edad, determinando que un propóleo proveniente de la zona cordillerana de la Región de la Araucanía, aumenta la sensibilidad a la insulina disminuyendo los niveles de insulina e índice HOMA, probablemente actuando por la vía AMPK generando un aumento de los transportadores GLUT4 a nivel muscular (Pacheco et al., 2011).

Basados en los antecedentes anteriormente descritos, en esta tesis se determinará la actividad inhibitoria de enzimas relacionadas al control glicémico de extractos ricos en fenoles obtenidos de propóleos de tres localidades de la RM, junto con su actividad antioxidante y se correlacionarán las actividades con la composición fenólica.

Es importante mencionar que a la fecha no hay reportado ensayos de inhibición de la actividad de la GPa con propóleo a nivel mundial, a diferencia de ensayos frente a α -glucosidasa. Por otra parte, no existen estudios comparativos de inhibición de la actividad frente a ambas enzimas con propóleos chilenos.

Se espera que al menos uno de los extractos de las distintas localidades de la RM o alguna de sus fracciones presente efectos inhibitorios de la actividad de ambas enzimas y además exhiba una actividad antioxidante significativa para reducir el estrés oxidativo generado por la hiperglicemia crónica. De esta forma a partir de un producto apícola como el propóleo, se podría establecer su utilidad como materia prima para generar fitofármacos y/o alimentos funcionales destinados al tratamiento y/o prevención de enfermedades que cursen con hiperglicemia y estrés oxidativo, como la DMT2, a través de distintos efectos farmacológicos:

- i) inhibiendo las actividades de las enzimas α -glucosidasa y glicógeno fosforilasa a, lo que podría disminuir la hiperglicemia postprandial y en ayuno, y
- ii) neutralizando radicales libres y por lo tanto disminuyendo el estrés oxidativo, lo que reduciría el riesgo de aparición de las complicaciones microangiopáticas y vasculares clásicas de la hiperglicemia y prolongando la calidad de vida de los pacientes.

HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos globales obtenidos desde propóleos recolectados en diferentes localidades de la Región Metropolitana exhibirán diferencias en la actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasa y glicógeno fosforilasa a, así como la actividad antioxidante *in vitro* debido a las diferencias en la composición fenólica y el contenido de flavonoles.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Determinar en forma comparativa los perfiles fenólicos y la actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasa y glicógeno fosforilasa a, así como la actividad antioxidante *in vitro* de extractos ricos en fenoles de propóleos de distintas localidades de la Región Metropolitana de Chile (RM).

2. Objetivos específicos

- I. Caracterizar químicamente los extractos etanólicos globales (EEGs) de propóleos de las distintas localidades mediante: cromatografía en capa fina (CCF); contenido de fenoles totales (CFT) mediante la técnica de Folin-Ciocalteu; contenido de flavonas y flavonoles (CFF) mediante la técnica del $AlCl_3$; contenido de flavanonas y dihidroflavonoles (CFD) mediante la técnica de la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNP) y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de arreglo de diodos (CLAE-DAD).
- II. Evaluar la calidad de los propóleos mediante normativa internacional.
- III. Evaluar la actividad inhibitoria de los distintos EEGs frente a las enzimas α -glucosidasa y glicógeno fosforilasa a (GP_a) *in vitro*.
- IV. Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los distintos EEGs, mediante las técnicas de capacidad de neutralización de radicales del oxígeno (ORAC-FL, ORAC-PGR y ORAC-EPR) y poder reductor del ion férrico (FRAP).
- V. Seleccionar el EEG más activo para fraccionarlo y evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria de enzimas relacionadas con control glicémico.
- VI. Identificar y cuantificar en forma relativa los compuestos del EEG y de la fracción más activa mediante CLAE-DAD y espectrometría de masas en tándem (CL-ESI-MS/MS).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

La sal sódica de HEPES, el EGTA, la acarbosa, el PGR, la 2,4-dinitrofenilhidracina, la fluoresceína, el TPTZ, el AAPH, el DMPO, el 2-Aminoetil difenilborinato (*Natural product*), el p-anisaldehído, el polietilenglicol 400 (PEG), el pNPG, la sal hidratada disódica de α -D-glucosa-1-fosfato, el pNPP, el glicógeno proveniente de hígado de bovino, la enzima α -glucosidasa (*Saccharomices cerevisiae*), la enzima GPa proveniente de músculo de conejo, la gelatina en polvo, los patrones ácido gálico, quercetina, naringenina, canferol, apigenina, galangina, pinocembra, crisina, ácido cafeico, feniletil éster del ácido cafeico, ácido clorogénico y rutina, la cafeína y el trolox fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, Chile. El fosfato diácido de sodio monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), el fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4), el hidróxido de potasio (KOH), el cloruro de magnesio (Mg_2Cl), el cloruro de potasio (KCl), el molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$), el tricloruro férrico (FeCl_3), el tricloruro de aluminio (AlCl_3), el nitrato básico de bismuto ($\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), el yoduro de potasio (KI), el carbonato de sodio (Na_2CO_3), el acetato de sodio (CH_3COONa), el verde malaquita (oxalato), el magnesio metálico, el ácido clorhídrico (HCl), el ácido sulfúrico (H_2SO_4), el ácido fórmico (HCOOH), el ácido acético glacial (CH_3COOH), el anhídrido acético ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$), el DMSO (CH_3SOCH_3), el acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), el hexano (C_6H_{14}), el metanol (CH_3OH), el etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), el acetonitrilo (CH_3CN) grado HPLC, el metanol grado HPLC, los cromatofolios de gel de sílice en placa de aluminio 60 F₂₅₄, gel de sílice, el reactivo de F-C y el solvente de lavado Extran MA 03 libre de fosfato fueron adquiridos en Merck, Chile. La glicerina líquida fue adquirida en Reachem S.A. El hidróxido de sodio (NaOH) fue adquirido en Fluka Chemik El agua Milli-Q fue preparada empleando un sistema Milipore Mili-Q (Milipore, Bedford, MA, USA).

2. Muestras de propóleo

La obtención de muestras de propóleos crudos se llevó a cabo mediante la compra en centros especializados o por contacto directo con los apicultores, así se logró disponer de seis muestras de propóleo crudo de una zona determinada de Chile. Junto con la adquisición del producto apícola se recopiló información de la fuente del propóleo, es decir, si era mezcla de propóleos de distintas localidades, del método de recolección y del tipo de colmenas. Además, se les consultó a los apicultores por la flora circundante a las colmenas.

Una vez obtenidos los propóleos, estos fueron limpiados extrayendo material orgánico como abejas y madera de las colmenas, fueron triturados o rallados dependiendo de la consistencia del propóleo crudo y posteriormente almacenados a -20°C y protegidos de la luz hasta la realización de los procesos extractivos.

3. Extracción y descerado

Para la obtención de los EEGs se utilizó la metodología descrita por Valenzuela-Barra et al. (2015) con ligeras modificaciones. Los propóleos crudos limpios de residuos de colmena, agentes extraños e insectos se maceraron en etanol grado técnico (1:5) a $4-8^{\circ}\text{C}$ por 24 h aproximadamente, luego se sometieron a calentamiento en un baño termostático a 70°C por 30 min y nuevamente se llevaron a $4-8^{\circ}\text{C}$ por 24 h más. Posteriormente, fueron filtrados en frío a presión reducida para extraer la cera. Para hacer más exhaustivo este procedimiento, se procedió a repetir una vez más el ciclo de temperatura y posterior filtración. A continuación, el filtrado fue concentrado en un evaporador rotatorio a presión reducida y baño termostático a 50°C . Los EEGs concentrados fueron secados en una estufa de vacío a $45-50^{\circ}\text{C}$ por 3 días, hasta masa constante y posteriormente fueron almacenados y protegidos de la luz. A partir de las masas obtenidas se calculó el rendimiento de la extracción.

4. Caracterización química de los extractos etanólicos globales

4.1. Tamizaje fitoquímico

Para determinar de forma cualitativa la presencia de algunos metabolitos secundarios presentes normalmente en las especies vegetales, se prepararon 10 mL de soluciones a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de EEGs en metanol. Posteriormente fueron evaluados con reacciones de identificación como: reacción con tricloruro férrico 5% (FeCl_3) para polifenoles en general; tricloruro de aluminio (AlCl_3) 10% para flavonoides, principalmente flavonas y flavonoles; reacción de Shivata, donde zinc o magnesio metálico se hace reaccionar en metanol y ácido clorhídrico junto al extracto para determinar presencia de flavonoides del tipo flavonas y flavonoles; reacción de Börntrager, donde un álcali, como hidróxido de sodio al 30% determina la presencia de derivados antracénicos; y la reacción de Dragendorff para alcaloides, donde la sal de yoduro de potasio y bismuto precipitan. Adicionalmente se mantuvo un control de la coloración de los extractos.

4.2. Cromatografía en capa fina

Para analizar cualitativamente los EEGs de las distintas localidades, se realizaron CCF utilizando diferentes reveladores para evaluar la posible presencia de diferentes familias de compuestos normalmente presente en las muestras de propóleo: *Natural Product*/Polietilenglicol (NP/PEG), para la derivatización y reconocimiento de polifenoles como flavonoides, ácidos fenólicos y cumarinas; Liebermann-Burchard y calentamiento para el reconocimiento de: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y esteroides; y finalmente p-anisaldehído sulfúrico y calentamiento para reconocer: triterpenoides, saponinas y aceites esenciales.

Las CCFs se llevaron a cabo en cromatofolios de aluminio con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 10 x 10 cm o 10 x 20 cm, como fase móvil se usaron distintos sistemas de solventes. Se prepararon muestras de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de los EEGs en etanol y se sembraron 5 veces en los cromatofolios, además se utilizaron distintos patrones correspondientes a flavonoides y ácidos fenólicos de interés. Posteriormente se

inició la elución en una cámara cromatográfica saturada con la fase móvil. Una vez que el frente de solvente alcanzó una distancia de 0,5 cm del borde superior del cromatofolio, éstos fueron retirados de la cámara, se secaron y se aplicaron los distintos reveladores. Las observaciones se llevaron a cabo al visible y bajo lámpara UV a 254 y 365 nm.

4.3. Cromatografía líquida de alta eficacia

Con el fin de evidenciar diferencias sustanciales en los perfiles fenólicos de los distintos EEGs que no lograron ser observadas en la CCF, se compararon los cromatogramas de los EEGs, sin embargo, dada la variabilidad de condiciones cromatográficas relacionadas a la variabilidad química de los propóleos que han sido estudiados alrededor del mundo, se decidió utilizar inicialmente una condición cromatográfica conocida para la determinación de compuestos fenólicos en el vino, para posteriormente evaluar una condición más cercana a nuestra realidad química en una matriz compleja como es el propóleo.

4.3.1. Condición 1: análisis de vinos

Con el fin de evaluar el perfil fenólico de los distintos EEGs, se realizó una CLAE-DAD a 280 y 360 nm. La columna utilizada fue una Merck Purosphere® RP-18 de 25 cm x 4,5 mm x 5 µm, una bomba Thermo Fisher Scientific, UltiMate™ 3000 y un sistema binario de solventes como fase móvil: (A) Acetonitrilo y (B) Ácido acético 1% a un flujo de 1 mL/min. 20 µL de los EEGs disueltos en metanol grado CLAE a 6500 ppm fueron inyectados con un *autosampler* Thermo Fisher Scientific UltiMate™ 3000. El sistema de gradiente se resume en la Tabla 1.

Tabla 1: Sistema de gradiente binario acetonitrilo (ACN)/ácido acético 1% (HAC 1%)

Tiempo [min]	(A) ACN	(B) HAC 1%	Tiempo [min]	(A) ACN	(B) HAC 1%
0-2	20	80	16-18	40	60
2-4	21	79	18-20	50	50
4-6	21,5	78,5	20-24	48	62
6-8	25	75	24-28	44	56
8-10	27	73	28-33	52,5	47,5
10-12	30	70	33-36	62	38
12-14	35	65	36-40	70	30
14-16	37	63	40-60	8	92

4.3.2. Condición 2: análisis de propóleos

Con el fin de evaluar el perfil fenólico de los distintos EEGs, se realizó una CLAE-DAD a 270 nm, guiado por la metodología descrita por Zhang et al, 2016. La columna utilizada fue una ACE Ultracore 5[®] SuperC18 de 150 cm x 4,5 mm x 5 µm, una bomba Thermo Fisher Scientific, UltiMate™ 3000 y un sistema binario de solventes como fase móvil: (A) ácido acético 1% y (B) metanol a un flujo de 1 mL/min y 33°C. 5 µL de los EEGs disueltos en metanol grado CLAE a 3000 ppm fueron inyectados con un *autosampler* Thermo Fisher Scientific UltiMate™ 3000. El sistema de gradiente se resume en la Tabla 2. Adicionalmente se inyectó una mezcla de patrones que incluía: ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, quercetina, canferol, apigenina, galangina, naringenina, pinocebrina, CAPE (feniletíl éster del ácido cafeico) y rutina.

Tabla 2: Sistema de gradiente binario ácido acético 1% (HAC)/metanol (MeOH)

Tiempo [min]	(A) HAC 1%	(B) MeOH
0-30	85-60%	15-40%
30-65	60-45%	40-55%
65-70	45-38%	55-62%
70-85	38-0%	62-100%
85-95	0-85%	100-15%

5. Estandarización de los extractos etanólicos globales

5.1. Contenido de fenoles totales

El CFT fue determinado mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (F-C) previamente descrita por Peña-Cerda et al.,(2017), donde en un pocillo de reacción 20 μL de EEG disuelto en metanol al 80% reaccionan con 20 μL del reactivo de F-C al 1% en medio básico, para lo cual 260 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) fueron agregados para iniciar la reacción. La facultad de los fenoles de reducir al ácido fosfotúngstico (W^{+6}) y fosfomolibdico (Mo^{+6}) del reactivo de F-C a W^{+5} y Mo^{+5} es evidenciado por el viraje del color amarillo a azul cuyo máximo de absorbancia se observa a los 765 nm. La lectura se llevó a cabo con un lector de microplaca Multiscan GO[®]. Posteriormente los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración de ácido gálico ($Y = 0,0622X + 0,053$), previamente montada en el laboratorio (Peña-Cerda et al., 2017). Los resultados fueron expresados como g equivalentes de ácido gálico por 100g de EEG seco (g EAG/100g ES).

5.2. Contenido de flavonas y flavonoles

Para la cuantificación del CFF se utilizó la metodología del tricloruro de aluminio (AlCl_3) descrita previamente por Peña-Cerda et al. (2017), para la cual 30 μL de EEG disuelto en metanol se hacen reaccionar con 10 μL de AlCl_3 10% y 10 μL de acetato de sodio (CH_3COONa) 1M, completando un volumen de 300 μL con agua destilada. El AlCl_3 forma un complejo estable de color amarillo con máximos de absorbancia a 415 nm, donde el AlCl_3 se puede complejar con el carbonilo y el hidroxilo de la posición C-4 y C-5 en las flavonas, así como en las posiciones C-4 y C-3 de los flavonoles. Además, el AlCl_3 forma complejos ácidos lábiles con los grupos ortodihidroxis del anillo A o B de los flavonoides, como se muestra en la Figura 8. El tipo de unión depende del tipo de flavonoide, siendo los complejos formados con otros tipos de flavonoides como flavanonas y flavanonoles de menor implicancia y donde la relación Al^{+3} y los flavonoides en general es 1:1 bajo las

condiciones de este ensayo (Chang et al., 2002; Kasprzak et al., 2015). Las absorbancias obtenidas posteriormente fueron interpoladas en una curva de calibración previamente montada en el laboratorio con quercetina como patrón ($Y = 0,0489X + 0,0077$). Los valores obtenidos son expresados como g equivalentes de quercetina por 100g de extracto seco (g EQ/100g ES, %p/p).

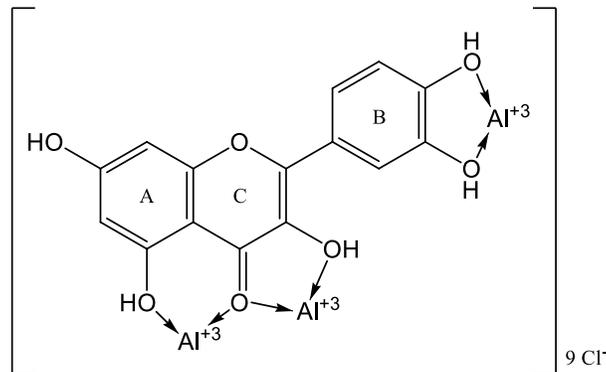


Figura 8: Esquema de los posibles complejos formados entre las flavonas y flavonoles y el $AlCl_3$.

5.3. Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles

Para la cuantificación del CFD se utilizó la metodología de la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNP) descrita previamente por Popova et al. (2004), con ligeras modificaciones. 100 μ L de los EEGs disueltos en metanol se hicieron reaccionar con 200 μ L de solución DNP (0,1g de DNP disuelto en 200 μ L de ácido sulfúrico (H_2SO_4), diluido hasta 10 mL) a 50 °C por 50 min en un baño termostático. Posteriormente los 300 μ L se diluyeron con una solución de KOH 10% hasta completar un volumen de 1 mL. 40 μ L de la mezcla fueron luego diluidos con metanol hasta completar un volumen de 1 mL y 300 μ L de esta mezcla fueron evaluados en un lector de microplaca, Multiskan GO® a 495 nm. La metodología se basa en la formación de dinitrofenilhidrazonas de coloración anaranjadas, producto de la reacción de la DNP con los grupos cetonas o aldehídos de flavanonas y dihidroflavonoles (flavanonoles), como se observa en la Figura 9. Pese a que todos los tipos de flavonoides poseen grupos cetonas, en el anillo C, se ha determinado que tanto las

flavonas, flavonoles así como las isoflavonas son incapaces de reaccionar con la DNP debido a la presencia del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (Chang et al., 2002).

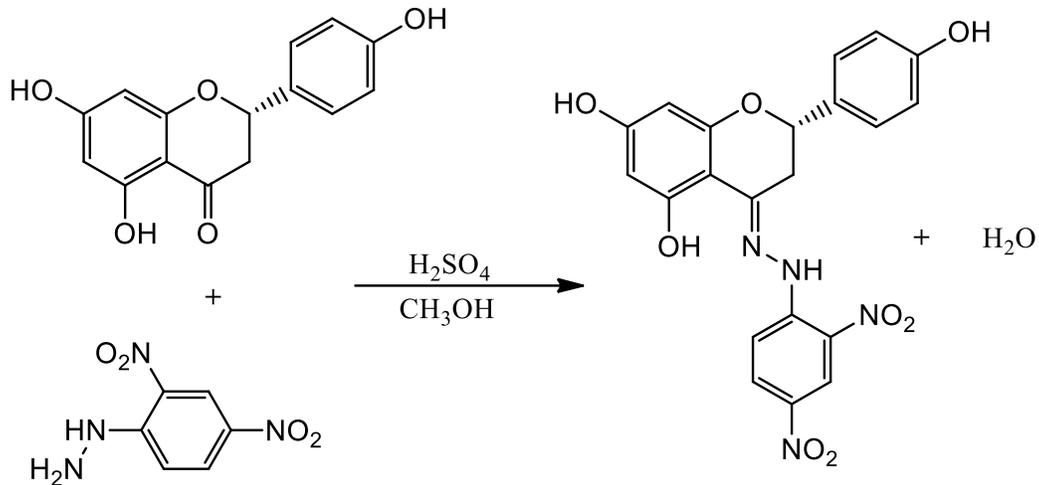


Figura 9: Reacción implicada en la metodología de la 2,4-dinitrofenilhidracina

Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración realizada con naringenina con concentraciones entre 1,0 y 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siguiendo el mismo procedimiento antes descrito.

6. Control de calidad de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1

6.1. Análisis gravimétricos

6.1.1. Pérdida por calentamiento

Se utilizaron cápsulas de porcelana previamente secadas en una estufa a $100\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ y taradas. Se masaron 4 g de las muestras de propóleo crudo y se colocaron en las cápsulas secas. Posteriormente se calentaron en una estufa regulada a $100\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Luego, se retiraron y se colocaron en un desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente y se pesaron. Las cápsulas con las muestras tratadas se reservaron para la determinación de cenizas. Los cálculos se realizaron empleando la Fórmula 1 que se muestra a continuación:

$$\text{Fórmula 1: } H = 100 \cdot \left(1 - \frac{(C_{TS} - m_{100})}{(C_{TH} - m_{100})} \right)$$

Dónde: H es la pérdida de humedad por calentamiento; C_{TS} , la masa de la cápsula con la muestra seca, en gramos; C_{TH} , la masa de la cápsula con la muestra en bruto, en gramos y m_{100} , la masa de la cápsula vacía, en gramos.

6.1.2. Determinación de porcentajes de cenizas

Se colocaron en un horno de mufla la muestra seca y la cápsula de porcelana provenientes del ensayo de pérdida de calentamiento previamente quemada en mechero bajo campana, y se incineró a $550 \text{ }^\circ\text{C} \pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$, hasta que se obtuvieron cenizas sin residuos. A continuación, se retiró cuidadosamente del horno de mufla y se dejó enfriar en un desecador hasta que se alcanzó la temperatura ambiente. Se masó hasta constancia de masa, lo cual se verificó cuando dos pesadas sucesivas no difirieron entre sí en más de 5 mg. Se calcularon las cenizas (C) mediante la Fórmula 2:

$$\text{Fórmula 2: } C = \frac{(C_Z - m_{550})}{(C_{Ph} - m_{550})} \cdot 100$$

Donde: C corresponde al contenido de cenizas, en gramos por cien gramos; C_Z a la masa de la cápsula con cenizas, en gramos; C_{Ph} , a la masa de la cápsula con la muestra húmeda, en gramos y m_{550} , a la masa de la cápsula, en gramos.

6.1.3. Determinación de índice de oxidación

Se masaron 0,2 g de las muestras de propóleo crudo y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Se añadieron 5 mL de etanol grado técnico y se dejaron en reposo durante 1 h. Luego se agregaron 100 mL de agua destilada para su análisis, se agitaron, se filtraron a través de un papel filtro simple y se recogió el filtrado en un vaso precipitado. 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 min. Finalmente,

se agregaron 0,05 mL (1 gota) de la solución de permanganato de potasio 0,1 N y se puso en marcha el cronómetro en el preciso momento en que la gota se puso en contacto con la solución acidulada de propóleos, agitando constantemente. Se registró el tiempo en segundos respecto a lo que tardó en decolorarse la solución.

6.1.4. Determinación del porcentaje de sustancias extraíbles en hexano

Se pesaron aproximadamente 2 g de propóleo crudo, se depositó en un cartucho de celulosa seco previamente tarado y posteriormente se colocó en el cuerpo de un extractor de Soxhlet. Se masó el balón del extractor de Soxhlet y se colocó en un volumen adecuado de hexano y se calentó durante 6 h. En el balón quedaron las ceras disueltas en hexano, por lo que se evaporó el solvente en un evaporador rotatorio; el remanente se trasladó a una placa de Petri, la cual se colocó en un desecador hasta temperatura ambiente, para finalmente masarlo. Se masó hasta lograr constancia de masas (cuya diferencia no fuese más de 5 mg). El cálculo del contenido de sustancias extraíbles en hexano se realizó mediante la Fórmula 3:

$$\text{Fórmula 3: } S_E = \left(\frac{(B_{c1} - B_{c0})}{m} \right) \cdot 100$$

Dónde: S_E corresponde al contenido de sustancias extraíbles en n-hexano (g/100 g); B_{c1} , a la masa de la placa de Petri con sustancias extraíbles (g) B_{c0} , a la masa de la placa vacía (g) y m , a la masa del propóleo crudo (g).

6.1.5. Determinación del porcentaje de resinas

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. Se colocó 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 solvente en contacto con la muestra se puso incoloro. El punto final de la extracción se controló agregando gotas de una solución de FeCl_3 10%. Si el color de la solución

cambiaba de amarillo a verdoso, indicaba la presencia de sustancias fenólicas y, por lo tanto, sería necesario continuar con la extracción.

Se transfirió cuantitativamente el contenido del balón a un matraz aforado de 100 mL y se aforó con etanol. Se tomaron 50 mL y se colocaron en un balón de destilación. Se eliminó completamente el etanol mediante un evaporador rotatorio. El volumen restante se transfirió a un frasco ámbar y se reservó para la determinación de flavonoides, fenoles totales y espectro de absorción al UV. El remanente de la muestra (cartucho de celulosa) se sacó del extractor Soxhlet y se reservó para la determinación de impurezas mecánicas.

El balón de destilación con las resinas remanentes 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 masó. 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. Los resultados se obtuvieron aplicando la Fórmula 4.

$$\text{Fórmula 4: } R = \frac{(B_{R1} - B_{R0})}{m} \cdot 200$$

Donde: R corresponde al contenido de resinas, en gramos por cien gramos; B_{R1} , a la masa del balón con resinas (secas), en gramos; B_{R0} , a la masa del balón vacío (seco), en gramos y m, a la masa de la muestra, en gramos.

6.1.6. Impurezas mecánicas

Se secaron en la estufa a 80°C los cartuchos provenientes de la determinación de resinas. Posteriormente se retiraron de la estufa y se colocaron en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesaron hasta lograr masa constante. Se calcularon las impurezas mecánicas mediante la Fórmula 5:

$$\text{Fórmula 5: } IM = \frac{(P_1 - P)}{m} \cdot 100$$

Donde: IM corresponde al contenido de impurezas mecánicas en gramos por cada cien gramos de propóleo crudo; P_1 , a la masa del cartucho seco; P , a la masa del cartucho vacío seco; y m , a la masa de la muestra.

6.2. Determinación de compuestos fenólicos

6.2.1. Contenido de fenoles totales

Para generar la curva de calibración se tomaron alícuotas de 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, y 25 mL de una solución *stock* de ácido gálico 500 $\mu\text{g/mL}$ y se transfirieron a matraces de aforo de 25 mL. Se completó el volumen con una solución de etanol 10% v/v. Se tomó 1 mL de cada una de las soluciones de referencia diluidas y se colocaron en matraces aforados de 25 mL, se agregó 10 mL de agua destilada y 1 mL del reactivo de F-C, se agitó suavemente y se dejó en reposo durante 2 min. Se añadieron 4 mL de la solución de Na_2CO_3 y se completó el volumen con agua destilada, sin agitar. Finalmente, se calentó en un baño de agua a 50°C durante 5 min y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se mezcló el contenido de los matraces antes de efectuar la medición. Posteriormente se colocaron las soluciones en cubetas de cuarzo y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UNICAM UV-VIS a 765 nm, contra un blanco.

Posteriormente se pipetearon 5 mL de cada uno de los extractos alcohólicos obtenidos en la determinación de resinas y se transfirieron en un matraz aforado de 100 mL. Se completó con agua destilada, y se agitó vigorosamente para estabilizar. Se tomó 1 mL de la solución anterior y se colocaron en un matraz aforado de 25 mL, se agregaron 10 mL de agua destilada y 1 mL de reactivo de FC, se agitó suavemente y se dejó en reposo durante 2 min. Se añadieron 4 mL de la solución de carbonato de sodio y se completó el volumen con agua destilada, sin agitar. Finalmente, se calentó en baño de agua a 50 °C durante 5 min, y se enfrió en baño de agua hasta temperatura ambiente. Se colocó la solución en una cubeta de cuarzo y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 765 nm, contra un blanco. Las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en la curva de calibración.

6.2.2. Determinación de flavonoides totales

Para realizar la curva de calibración con quercetina se transfirieron alícuotas de 0,5 mL; 0,7 mL; 1 mL; 1,2 mL; 1,5 mL; 2 mL y 2,5 mL de una solución *stock* de quercetina 100 µg/mL, a matraces aforados de 25 ml. Se agregaron 0,5 mL de la solución de AlCl_3 a cada una de ellas y al blanco y se completó el volumen con metanol. Se dejó reposar 30 min en la oscuridad y posteriormente se colocaron en una cubeta de cuarzo y se midió las absorbancias a 460 nm.

A partir de los extractos alcohólicos obtenidos en la determinación de resinas se transfirió 0,1 mL a matraces de 25 mL, se agregó 0,5 mL de solución de AlCl_3 y se aforó con metanol. Se preparó un blanco con 0,1 mL de alcohol etílico y 0,5 mL de solución de AlCl_3 y se enrasó con metanol. Se dejó 30 min en la oscuridad, y luego se colocó en una cubeta de cuarzo y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 460 nm. Las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en la curva de calibración.

7. Actividad inhibitoria de enzimas del control glicémico

7.1. Inhibición de la enzima α -glucosidasa

Debido a la baja solubilidad de los propóleos en DMSO 11,5% que corresponde a la concentración de DMSO para los ensayos de inhibición enzimática, se decidió plantear dos modificaciones importantes al ensayo: i) evaluar el aumento en la proporción del DMSO, respaldado por bibliografía (Lordan et al., 2013; Nurul Islam et al., 2013) y ii) mantener el porcentaje de DMSO solubilizando inicialmente el EEG en DMSO y posteriormente diluyendo en agua para finalmente realizar barridos de absorbancia y en base a los espectro de absorción UV-Vis evaluar la presencia de precipitados.

7.1.1. Modificación del porcentaje de DMSO

El ensayo de inhibición se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Figueroa-Benavides et al. (2018) con las modificaciones correspondientes. Para demostrar que el porcentaje de DMSO no afectaba la actividad enzimática, 20 μL de DMSO a 11,5; 23; 57,5 y 92% en agua Mili-Q (1, 2, 5 y 8%, en pocillo de microplaca) fueron preincubados con 120 μL de tampón fosfato 100 mM a pH 6,8 (ajustado con una solución de NaOH 1M) y 60 μL de una solución de pNPG 5 mM (en tampón fosfato 100 mM a pH 6,8) por 5 min a 37°C. Posteriormente 30 μL de una solución enzimática 0,1 U/ml (α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*) fueron adicionados para iniciar la reacción. El pNPG, sustrato de la enzima, posee en su estructura una D-glucosa unida por enlace α -glucosídico a un grupo p-nitrofenil, el cual en presencia de la enzima es hidrolizado liberando p-nitrofenol, compuesto de naturaleza aromática de color amarillo que absorbe aproximadamente a 400 nm, como se muestra en la Figura 10, por lo que se incubó por 30 min a 37°C y se realizó una lectura a 400 nm, en un lector de microplaca TermoFisher MultiScan GO®.

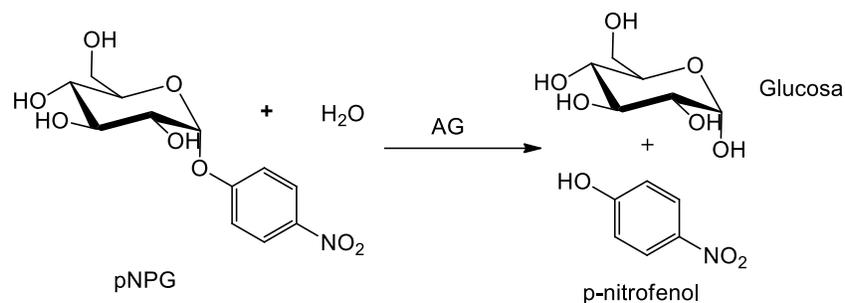


Figura 10: Reacción enzimática de las α -glucosidasas
 pNPG: p-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido, AG: α -glucosidasas

7.1.2. Modificación en el proceso de solubilización

Los EEGs fueron disueltos en DMSO y posteriormente diluidos con agua Mili-Q para lograr concentraciones que iban desde los 0,125 a los 160 $\mu\text{g/mL}$. 300 μL de estas soluciones fueron evaluadas mediante un barrido de absorbancia entre los 200 y 520 nm. Posteriormente se analizaron los picos de mayor absorbancia de los

espectros y la longitud de onda involucrada en el ensayo de inhibición enzimática (400 nm) buscando pérdida de la linealidad que indicara la presencia de precipitados.

El ensayo de inhibición se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Figueroa-Benavides et al. (2018) con las modificaciones recientemente evaluadas: modificación del porcentaje de DMSO y cambios en la solubilización. Los EEGs fueron disueltos en DMSO y luego diluidos en tampón fosfato 100 mM a pH 6,8 (ajustado con una solución de NaOH 1M), 140 μ L de la mezcla se incubaron con 60 μ L de una solución de pNPG 5 mM (en tampón fosfato 100 mM a pH 6,8) por 5 min a 37°C. Posteriormente 30 μ L de una solución enzimática 0,1 U/ml (α -glucosidasa de *S. cerevisiae*) para iniciar la reacción. Inmediatamente después de iniciada la reacción se realizó una lectura a 400 nm (0 min) y se incubó por 30 min a 37°C y se realizó la segunda lectura a 400 nm, en un lector de microplaca ThermoFisher MultiScan GO®. Como control positivo se utilizó acarbosa, inhibidor competitivo de la enzima. Adicionalmente se realizaron controles no enzimáticos (CNE), Blancos (B) y controles negativos (CN) y se calcularon los porcentajes de inhibición (%I) con la Fórmula 6.

$$\text{Formula 6: \%I} = \frac{(\Delta A_{CN} - \Delta A_B) - (\Delta A_M - \Delta A_{CNE})}{(\Delta A_{CN} - \Delta A_B)}$$

Dónde, ΔA corresponde a las diferencias de absorbancias entre el tiempo 30 min y el tiempo 0 min y M a la muestra. Para determinar la concentración inhibitoria del 50% de la cantidad de enzimas (CI_{50}), se evaluaron concentraciones distintas de los EEGs y los resultados fueron ajustados a un modelo de inhibición obteniéndose curvas concentración-respuesta.

7.2. Inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a

La metodología de inhibición utilizada fue descrita por Martin et al. (1998). La actividad de la GP_a se determinó por espectrofotometría en un lector de microplaca ThermoFisher MultiScan GO®, para esto se midió la reacción en dirección de la

síntesis de glicógeno por la liberación de fosfato a partir de glucosa-1-fosfato, al inverso de la reacción fisiológica (Figura 11). Esta reacción se llevó a cabo a 22°C durante 25 minutos en un volumen de 150 µL que contenía: 60 µL del EEG en DMSO y diluido con tampón salino (tampón HEPES 50 mM (pH 7.2), KCl 100 mM, EGTA 2,5 mM, MgCl₂ 5 mM), 35 µL de glucosa-1-fosfato 0,6 mM, 35 µL 1 mg/mL de glicógeno y 20 µL de solución enzimática 60 µg/mL (GPa de músculo de conejo). El fosfato fue medido a 621 nm cinco minutos después de la adición de 150 µL de solución de detención que contiene 10 mg/mL de molibdato de amonio y 0,38 mg/mL de verde malaquita en HCl 1M. Como control positivo se utilizó cafeína, inhibidor alostérico. Adicionalmente se realizaron controles no enzimáticos (CNE), Blancos (B) y controles negativos (CN) y se calcularon los porcentajes de inhibición (%I) con la Fórmula 7:

$$\text{Formula 7: \%I} = \frac{(A_{\text{CN}} - A_{\text{B}}) - (A_{\text{M}} - A_{\text{CNE}})}{(A_{\text{CN}} - A_{\text{B}})}$$

Dónde, A corresponde a las absorbancias a los 5 min y M a la muestra. Para determinar la concentración inhibitoria del 50% de la actividad de la GPa (C_{I50}), se evaluaron concentraciones distintas de los EEGs y los resultados fueron ajustados a un modelo de inhibición obteniéndose curvas concentración-respuesta

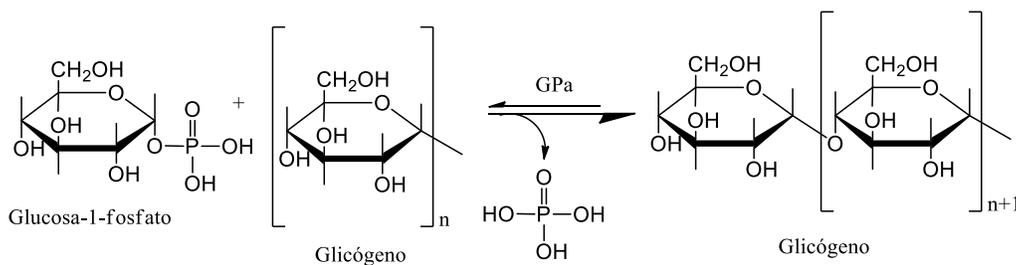


Figura 11: Reacción catalizada por la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa)
Hacia la izquierda: reacción fisiológica, hacia la derecha: reacción del ensayo

8. Capacidad antioxidante

8.1. Capacidad de absorción de radicales del oxígeno

Dado el alto contenido de fenoles en el propóleo, se espera que estos productos apícolas posean una capacidad antioxidante importante, por ejemplo, para neutralizar radicales libres de interés biológico como el radical peroxilo, el anión superóxido y radical hidroxilo, entre otros. Para poder comparar la capacidad antioxidante se utilizó la metodología ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) donde los compuestos que son capaces de estabilizar a un radical, evitan la oxidación de una sonda y pérdida de su fluorescencia (fluoresceína, FL), pérdida de su color (rojo de pirogalol, PGR) o disminución de la intensidad de la señal de un aducto de *spin trap*; luego la capacidad antioxidante es determinada respecto a un compuesto de referencia, en este caso se utilizó trolox, mediante la comparación de las respectivas ABCs (áreas bajo las curvas).

8.1.1. ORAC-Fluoresceína (ORAC-FL)

Para calcular el índice ORAC-FL, se procedió con la metodología descrita por Castro et al. (2014) con ligeras modificaciones, para lo cual 25 μL de EEG en metanol a distintas concentraciones fueron incubados con 150 μL de fluoresceína (concentración final, 55 nM) en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos por 5 min a 37 °C. Posteriormente 25 μL de AAPH (concentración final de 19 mM) en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 fueron agregados al pocillo iniciando la reacción. Inmediatamente se leyó el apagamiento de la fluorescencia en lector multidetector de microplacas Synergy, BioTek Instruments (Inc. Winoosky, USA) controlado a través del software Gen5. La fluorescencia se midió con una longitud de onda de excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 520 nm. Se realizaron mediciones sin EEG (blanco) y se utilizó trolox como control positivo previamente evaluado ($Y = 124,15X + 108,59$ y $R^2=0,994$). El índice ORAC-FL fue calculado de acuerdo con la Fórmula 8:

$$\text{Formula 8: Índice ORAC – FI} = \frac{m_{\text{muestra}}}{m_{\text{trolox}}}$$

Donde m corresponde a la pendiente de la curva ABC_{neta} ($ABC-ABC_b$) versus concentración de la muestra o de trolox, en donde ABC es el área bajo la curva del gráfico fluorescencia versus tiempo en presencia de la muestra y ABC_b es el área bajo la curva del gráfico fluorescencia vs tiempo del blanco. Las áreas fueron calculadas integrando el decaimiento de la fluorescencia normalizado con respecto a la fluorescencia inicial vs tiempo.

8.1.2. ORAC-Rojo de pirogalol (ORAC-PGR)

Para calcular el índice ORAC-PGR, se procedió con la metodología descrita por Castro et al. (2014) con ligeras modificaciones, para lo cual 25 μL de EEG en metanol a distintas concentraciones fueron incubados con 150 μL de rojo pirogalol (concentración final, 52,5 μM) en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 en una microplaca de 96 pocillos por 5 min a 40 °C. Posteriormente 25 μL de AAPH (concentración final de 100 mM) en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 fueron agregados al pocillo iniciando la reacción. Inmediatamente se leyó la pérdida de coloración en lector multidetector de microplacas Synergy, BioTek Instruments (Inc. Winoosky, USA) controlado a través del software Gen5. La pérdida de color rojo se midió a una longitud de onda de 540 nm. Se realizaron mediciones sin extracto (blanco) y se utilizó trolox como control positivo previamente evaluado ($Y = 3,2594X + 66,703$ y $R^2=0,986$). El índice ORAC-PGR fue calculado de acuerdo con la Fórmula 9:

$$\text{Formula 9: Índice ORAC – RPG} = \frac{m_{\text{muestra}}}{m_{\text{trolox}}}$$

Dónde m corresponde a la pendiente de la curva ABC_{neta} ($ABC-ABC_b$) versus concentración de la muestra o de trolox, en donde: ABC es el área bajo la curva del gráfico absorbancia versus tiempo en presencia de la muestra y ABC_b es el área bajo la curva del gráfico absorbancia vs tiempo del blanco. Las áreas fueron

calculadas integrando el decaimiento de la coloración roja normalizada con respecto a la absorbancia inicial vs tiempo.

8.1.3. ORAC-Resonancia paramagnética de electrón (ORAC-EPR)

Para calcular el índice ORAC-EPR, se procedió con la metodología descrita por Mura (2016), para lo cual 50 μL de EEG en metanol a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (concentración final 250 $\mu\text{g/mL}$) con 50 μL de DMPO 200 mM (concentración final, 50 mM) en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 y 100 μL de AAPH 14 mM (concentración final de 7 mM) en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 son mezclados en una cubeta de cuarzo. Posteriormente, la solución es irradiada con una lampara de deuterio Ocean Optics DH-2000, por 5 min e inmediatamente se realizó la medición mediante un espectrómetro Bruker ECS106 con una cavidad rectangular y modulación de la radiación de 50 kHz.

Se realizaron mediciones sin extracto (blanco) y se utilizó trolox como control positivo para la generación de una curva de calibración. El índice ORAC-EPR fue calculado interpolando en la curva de calibración de trolox la diferencia de intensidad observada para cada uno de los EEGs.

8.2. Capacidad antioxidante reductora del ion férrico (FRAP)

La capacidad reductora de los EEGs fue medida mediante la técnica FRAP descrito por Peña-Cerda et al. (2017). El ensayo FRAP se fundamenta en la capacidad de una muestra de reducir el ion férrico (Fe^{3+}) a ion ferrosos (Fe^{2+}) inserto en un complejo con TPTZ como se muestra en la Figura 12, guarda directa relación con la capacidad antioxidante que ésta pueda poseer, es así como este método permite evaluar una de las formas de estabilización de los radicales libres mediante la cesión de un electrón del antioxidante o mecanismo SET (*single electron transfer*) (Ou et al., 2001).

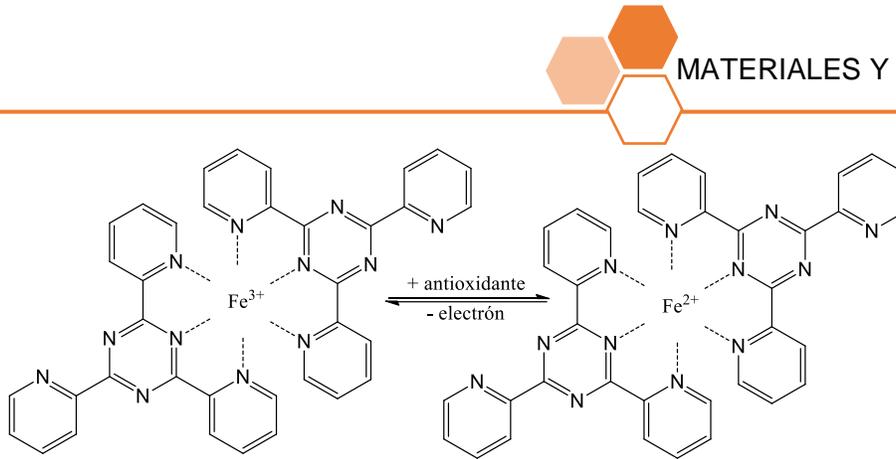


Figura 12: Reducción del complejo $\text{TPTZ}_2\text{Fe}^{3+}$ a $\text{TPTZ}_2\text{Fe}^{2+}$

Para obtener el valor FRAP, 290 μL del reactivo FRAP que contenía 1020 μL de buffer de acetato de sodio 300 mM, pH 3,6; 100 μL de TPTZ 10 mM y 100 μL de FeCl_3 20 mM fueron agregados a los pocillos de reacción de una microplaca, posteriormente 10 μL del EEG de propóleo a distintas concentraciones en metanol fueron agregados para iniciar la reacción, realizándose lecturas de la absorbancia a 593 nm cada 12 s, hasta completar 1 h de reacción. Los valores fueron obtenidos a los 4, 30 y 60 min, en concordancia con referencias bibliográficas que han señalado que, en mezclas complejas de antioxidantes, se podría subestimar el valor FRAP al realizar un ensayo a tiempos menores. Los valores de absorbancia fueron luego interpolados en una curva de calibración realizadas con FeSO_4 previamente montada en el laboratorio ($Y = 0,0178X - 0,0034$; $R^2 = 0,9996$; $p > 0,05$).

9. Fraccionamiento por cromatografía en columna

El EEG seleccionado por el control de calidad, actividad inhibitoria y actividad antioxidante fue fraccionado mediante una cromatografía en columna utilizando la metodología propuesta por Aguirre et al. (2006) con las modificaciones correspondientes. En una columna cromatográfica de vidrio de 50 cm de largo y 5 cm de ancho, se dispusieron 200 g de sílice embebida en hexano y se aplica vacío de tal forma de extraer el hexano y de esta manera secarla y empaquetar la sílice para formar el cuerpo de la columna. 20 g del EEG seleccionado fueron mezclados con 30 g de sílice hasta completa homogeneización y se dispuso sobre el cuerpo

de la columna separada con papel Whatman n°1, para formar la cabeza de la columna. Una vez estabilizada la columna y dispuesta bajo protección de la luz se eluyeron 400 mL de solventes de polaridad creciente y mezclas de ellos (hexano, hexano:acetato de etilo 1:1, acetato de etilo, acetato de etilo:etanol 1:1, etanol, metanol, metanol 80%) en porciones de 100 mL.

Las fracciones recolectadas fueron analizadas mediante CCF y las que mostraban perfiles fenólicos similares fueron mezcladas en una sola gran fracción (fracción hija). Posteriormente se midió el porcentaje de inhibición frente a enzimas del control glicémico según las metodologías descrita previamente. La fracción con mayor actividad inhibitoria fue seleccionada para los estudios posteriores de caracterización y estandarización.

10. Análisis de masas.

Se llevaron a cabo dos análisis de masas por equipos distinto: uno con el fin de cuantificar flavonoides y ácidos fenólicos típicos de las muestras de propóleo tipo álamo y un segundo análisis metabolómico de todos los compuestos que pueden estar presentes en los EEG.

10.1. Cuantificación de compuestos fenólicos

Para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se utilizó un sistema cromatográfico Eksigent®, Ekspert ultraLC 100-XL acoplado a un espectrómetro de masa AB Sciex® Triple Quad 4500, triple cuadrupolo ubicado en las dependencias de la Unidad Central de instrumentación, de la Facultad de Química y de Farmacia de la Pontificie Universidad Católica de Chile. Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Merck®, LiChrospher® 100 RP-18 (125 mm x 4 mm, 5 µm) a 50°C y una gradiente de elución de ácido fórmico 0,1% en agua (A) y metanol (B) como fase móvil. La gradiente fue programada de la siguiente manera: de 0-1 min, 15% de B; de 1-17 min, 15-100% de B; de 17-21 min; 100% de B; de 21-22 min,

100-15% de B y de 22-25 min, 15% de B. El volumen de inyección fue de 10 μL a un flujo de 0,5 mL/min.

Las condiciones de la fuente de iones por ESI fueron: Gas 1 N_2 , 50 psi; gas 2 N_2 , 50 psi; voltaje del aerosol de iones, 4500 V; temperatura en la fuente de iones, 650 $^{\circ}\text{C}$; y gas cortina N_2 , 30 psi. El modo de escaneo fue monitoreo de reacción múltiple (MRM) con polaridad negativa. Las curvas de calibración fueron construidas para cada compuesto en un rango de 0,1 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

10.2. Análisis de identificación metabólica

Para la identificación metabólica de compuestos fenólicos se utilizó un sistema cromatográfico Elute UHPLC®, BRUKER acoplado a un espectrómetro de masa Compact Q-TOF, BRUKER ubicado en las dependencias de la Unidad de Secuenciación y Tecnologías Ómicas, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificie Universidad Católica de Chile. Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Kinetex® C-18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) a 40 $^{\circ}\text{C}$ y un gradiente de elución de ácido fórmico 0,1% en agua (A) y Acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% (B) como fase móvil. La gradiente fue programada de la siguiente manera: de 0-3 min, 10% de B; de 3-16 min, 10-90% de B; de 16-21 min; 90% de B; de 21-21,2 min, 90-10% de B y de 21,2-26 min, 10% de B. El volumen de inyección fue de 5 μL a un flujo de 0,350 mL/min.

Las condiciones de la fuente de iones ESI fueron: voltaje capilar, 4500 V; temperatura, 250 $^{\circ}\text{C}$; *end plate offset*, 500 V; gas seco, 4,0 L/min; y nebulizador, 0,4 bar. El modo de escaneo fue *auto MS/MS* en modo positivo y negativo.

El análisis de identificación metabólica se llevó a cabo utilizando el software Metaboscape 4.0. El patrón de fragmentación se obtuvo usando las librerías espectrales del MassBank of North America (MoNA) del 2021, también se evaluó la identificación mediante las librerías espectrales utilizadas durante 2020, obtenidas desde el sitio web de MS-DIAL y la librería LipidBlast a cargo del Dr. Oliver Fiehn de la Universidad de California en Davis.



11. Análisis estadístico

Todos los ensayos se llevaron a cabo en triplicados a menos que se describa lo contrario. Las diferencias estadísticas se establecieron por análisis de varianza (ANOVA) y test de comparaciones múltiples de Tukey o Dunett. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software GraphPad Prism 6.0. El análisis de componentes principales (ACP) se llevó a cabo en Excel con la extensión XLSTAT.

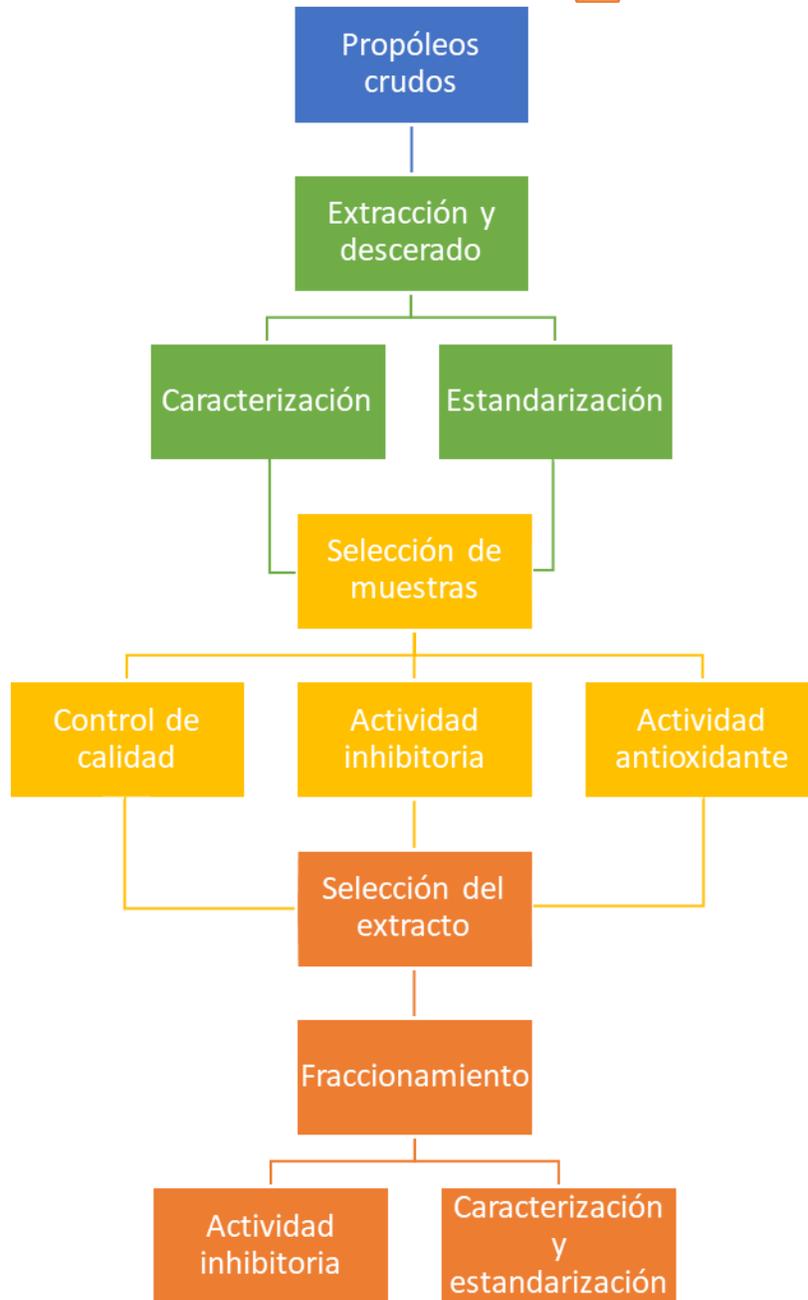


Figura 13: Esquema de las etapas del estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Extracción y desecado

Se lograron obtener seis muestras de propóleos crudos de las localidades de Pichidegua (PPc), Pirque (PPi), Lampa (PLa), Melipilla (PMe), Pudahuel (PPu) y Peñaflo (PPe), la fuente y el año de recolección, así como las características físicas se observan en la Tabla 3.

Tabla 3: Propóleos, localidad, obtención y año de recolección

Localidad		Obtención	Año
Pichidegua		Apicultor/a	2013
Pirque		Apicultor/a	2016
Lampa		Apicenter®	2016
Melipilla		Apicenter®	2016
Pudahuel		Apicultor/a	2016
Peñaflo		Apicultor/a	2017

Los rendimientos de los EEGs obtenidos se resumen en la Tabla 4. Los rendimientos fueron mayores a 45%, valor mínimo aceptado para considerar un propóleo tipo álamo de buena calidad en base al contenido de resina (o EEG) de acuerdo al criterio de Popova et al. (2007) y Bankova (2005).



Tabla 4: Rendimiento de los EEGs obtenidos desde propóleos crudos

Localidad	g Propóleo crudo	g EEG seco	Rendimiento (%)
Pichidegua	249,4	174,5	70,0
Pirque	389,4	229,3	58,9
Lampa	299,0	203,8	68,2
Melipilla	300,9	210,4	69,9
Pudahuel	310,6	233,4	75,1
Peñaflor	303,9	225,1	74,1

EEG: extracto etanólico global

Cabe destacar, que los rendimientos obtenidos de los EEGs fueron mayores a los obtenidos por Castro et al. (2014) y Valenzuela-Barra et al. (2015) para propóleos de otras localidades de la zona central de Chile (Región Metropolitana) que fluctuaron entre los 17,9% y 36,1%. Esto debido principalmente a que la técnica extractiva fue optimizada mediante el uso de filtración en frío al vacío y secado a presión reducida, sin embargo, otra explicación probable es que la calidad de los propóleos crudos de este trabajo de tesis, sean de mejor calidad en cuanto al contenido de compuestos presentes en ellos. Por otra parte, los rendimientos de los EEGs son semejantes a los reportados para propóleos de la Región del Maule, que fluctúan entre los 39,5% y 78,8% con una metodología de extracción similar (Nina et al., 2015).

Basado en estudios previos realizados en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, los propóleos provenientes de la zona central de Chile, pueden ser clasificados como propóleos tipo álamo (*Poplar-type*) en base a los compuestos presentes en estos productos apícolas y la flora de origen de recolección de los exudados realizada por las abejas, principalmente de especies del género *Poplar* (Castro et al., 2014; Valenzuela-Barra et al., 2015).



2. Caracterización química de los EEGs

2.1. Tamizaje fitoquímico

Los resultados del tamizaje fitoquímico se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos globales.

Reacción	Coloración positiva	Resultado	
FeCl ₃	Rojo (flavonoides) Azul (taninos gálicos) Verde (taninos catéquicos)	Positivo azulado verdoso	
AlCl ₃	Amarillo	Positivo Amarillo	
Shivata	Tonalidades de rojo	Positivo Anaranjado	
Bornträger	Rojo intenso	Negativo Café	
Dragendorff	Precipitado anaranjado	Negativo Precipitado Blanco	

Las pruebas que dieron positivo corresponden a: la del FeCl₃, donde el ion férrico forma complejos coloreados verdes tanto con flavonoides y taninos catéquicos o complejos azules con ácido gálico y taninos gálicos; la del AlCl₃, donde el ion Al³⁺ forma complejos de color amarillo con flavonoides del tipo flavonas y flavonoles; y la reacción de Shivata, donde la incorporación de magnesio (Mg) al medio clorhídrico genera hidrógeno molecular naciente (H₂) y reduce a los flavonoides (flavonas y flavonoles) al catión flavilio, que estructuralmente corresponde a los

derivados de antocianinas o antocianidinas, dependiendo de su estado como geninas o como heterósidos, respectivamente (Bruneton, 2001).

La reacción de Bornträger que se fundamenta en la generación de sales de derivados antracénicos de coloración rojo intenso en presencia de álcalis, dio resultado negativo, mientras que la reacción de Dragendorff que se fundamenta en la generación de precipitados anaranjados de alcaloides por la presencia de nitrógenos básicos (par de electrones libres) y el reactivo de Dragendorff (ioduro de potasio y bismuto) también dio resultado negativo, sin embargo se pudo observar la presencia de un precipitado blanco (Bruneton, 2001).

2.2. Cromatografía en capa fina

En la Figura 14, se observan los cromatofolios bajo lámpara UV a 254 y 365 nm después de realizada la separación con una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético en una proporción 60:40:1 (Figura 14-A) y 5:3:1 (Figura 14-B y 14-C). Tanto en la Figura 14-A como en la 14-B, se observan las bandas fluorescentes de los compuestos fenólicos a 365 nm, donde se puede advertir diferencias cualitativas en la composición de los EEGs de los PPI y PLa, mientras que en la Figura 14-C se observan bandas oscuras producto del fenómeno de *quenching* (apagamiento de la fluorescencia), muy similares entre los distintos EEGs a 254 nm, pudiéndose apreciar el alto contenido de compuestos de diferente polaridad con doble enlaces conjugados en su estructura, normalmente incoloras (Wagner & Blandt, 1996).

En general los propóleos tipo álamo poseen una mezcla compleja de compuestos, de los cuales se han descrito al menos 340, los que pueden ser clasificados como: ácidos fenólicos aromáticos libres, esteres de estos ácidos, flavonoides que incluyen a flavonas, flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles (flavanonoles) junto a algunos heterósidos principalmente de galactosa, rutinosa y rhamnosa, chalconas y dihidrochalconas, terpenoides (mono-, sesqui-, di- y triterpenos) y otros como hidrocarburos acíclicos y esteres de alcoholes de alto peso molecular, alcoholes,



aldehídos, aminoácidos, hidrocarburos aromáticos, ácidos grasos, cetonas, esteroides y azúcares (Ristivojevic et al., 2015).

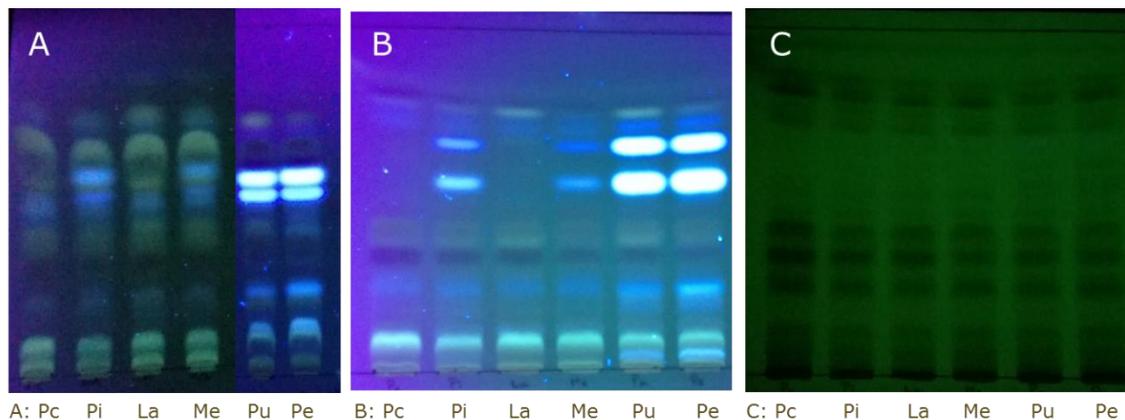


Figura 14: Cromatografía en capa fina de los EEGs bajo luz UV.

Cromatofolio de gel de sílice, fase móvil: hexano, acetato de etilo y ácido acético, (A) 60:40:1 a 365 nm, (B) 5:3:1 a 365 nm y (C) 5:3:1 a 254 nm. Pc: EEG de propóleo de Pichidegua, Pi: EEG de propóleo de Pirque, La: EEG de propóleo de Lampa, Me: EEG de propóleo de Melipilla, Pu: EEG de propóleo de Pudahuel, Pe: EEG de propóleo de Peñaflores y EEG: Extracto etanólico global.

En la Figura 15, se observan los cromatofolios a 365 nm, después de realizada la separación con una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético en una proporción 60:40:1 (Figura 14-A) y 5:3:1 (Figura 15-B) y de revelar con NP/PEG. En la figura 15-A se puede observar una mejor separación de compuesto polares presentes en los EEGs de los propóleos, mientras que en la figura 15-B de los menos polares. En base a la coloración de las bandas observadas con este revelador, es posible determinar la presencia de algunos compuestos característicos como los que se resumen en la Tabla 6, los que incluyen: ácidos fenilcarboxílicos (ácidos hidroxibenzoicos y cinámicos), cumarinas (simples, furano- y piranocumarinas), flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonoles, flavanonoles e isoflavonoides) y lignanos (Wagner & Blandt, 1996).

Debido a la compleja mezcla de compuestos presentes en los propóleos tipo álamo mencionados anteriormente, es que hay estudios que clasifican este tipo de propóleo en subtipos de acuerdo a los patrones y coloraciones de las bandas observadas por CCF, así podemos encontrar propóleos: tipo-O (*orange*) por presencia de bandas naranjas fuertes, típicas de flavonoides como quercetina; tipo-



B (*blue*) por presencia de bandas azules y celeste típicas del ácido cafeico y derivados ferúlicos y cumáricos junto a bandas naranjas y verdes claras débiles; y finalmente, tipo-G (*green*) semejante al tipo-O pero con bandas naranjas débiles y bandas verdes dominantes típicas de compuestos como apigenina, galangina y sus derivados. También se ha descrito que el propóleo tipo álamo tipo-G, podría tratarse de un intermediario de los tipos antes mencionados (Bertrams et al., 2013; Ristivojevic et al., 2015).

Si bien la utilización de patrones como quercetina, rutina, naringenina, ácido gálico y ácido cafeico nos permiten comparar coloraciones y factores de retardo (R_f) de las bandas observadas, dada la compleja mezcla de compuestos presentes en los propóleos, no se puede asegurar que correspondan a ellos.

Finalmente, en la Figura 16 y Figura 17 se observan los cromatofolios al visible (Figura 16-A y 17-A) y a 365 nm (Figura 16-B y 17-B) después de realizada la separación con una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético en una proporción 5:3:1 y reveladas con p-anisaldehído/sulfúrico y reactivo de Liebermann-Burchard, respectivamente. En base a la coloración de las bandas observadas con estos reveladores es posible determinar la presencia de algunos compuestos característicos como los que se resumen en la Tabla 7, los que incluyen: terpenoides, saponinas, aceites esenciales, entre otros (Wagner & Blandt, 1996).

Cabe mencionar que, pese a que se pueden observar bandas de colores característicos, en ningún caso se puede asegurar la presencia de solo un tipo de compuesto, dado que pueden solaparse bandas enmascarando colores o tratarse de grupos de compuestos de características similares y con similar R_f . Para un análisis más exhaustivo de los compuestos presentes en los EEG fue necesario emplear otras técnicas más precisas como la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector de arreglo de diodos y, por otra parte, acoplada a espectrometría de masa.

Sin embargo, el análisis por CCF logra complementar y confirmar las observaciones realizadas por el tamizaje fitoquímico en cuanto a la presencia de polifenoles:



flavonoides, ácidos fenólicos y cumarinas principalmente y descartando la presencia de alcaloides, como se menciona en las Tablas 6 y 7.

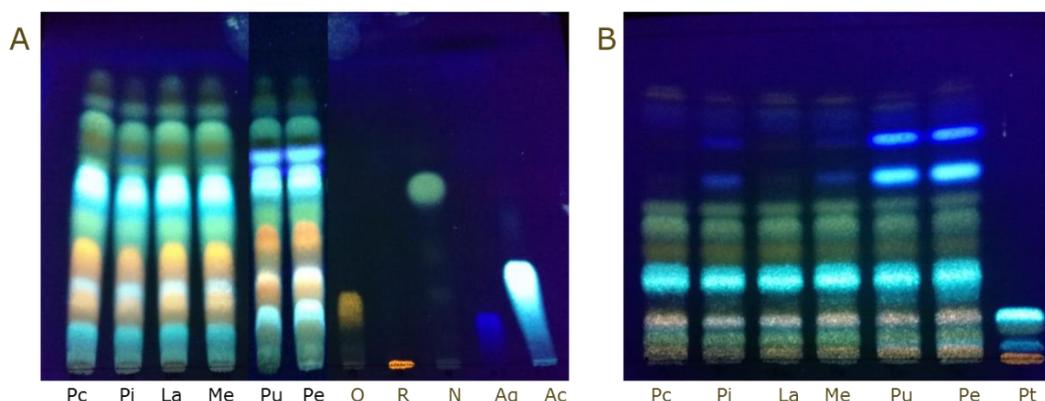


Figura 15: Cromatografía en capa fina de los EEGs revelados con NP/PEG a 365 nm.

Cromatofolio de gel de sílice, fase móvil: hexano: acetato de etilo: ác. acético (A), 60:40:1 y (B) 5:3:1. Pc: EEG de propóleo de Pichidegua, Pi: EEG de propóleo de Pirque, La: EEG de propóleo de Lampa, Me: EEG de propóleo de Melipilla, Pu: EEG de propóleo de Pudahuel, Pe: EEG de propóleo de Peñaflo, Q: quercetina, R: rutina, N: naringenina, Ag: ác. gálico, Ac: ác. cafeico, Pt: mezcla de patrones y EEG: extracto etanólico global.

Tabla 6: Familia de compuestos presentes en los EEGs mediante análisis de CCF y revelador NP/PEG

Familia	254 nm	365 nm	365 nm + NP/PEG	Presencia*
Alcaloides	Si**	Amarillo Azul Verde-azul	No	No detectado
Antracenos	Si	Amarillo café-rojo	Antronas y antranoles amarillo intenso	No detectado
ácidos cinámicos	Si	Azul Verde-azul	Azul Verde-azul	Si, posible
Cumarinas	Si	Amarillo Café Azul Verde-azul	Intensifica y estabiliza la fluorescencia	Si, posible
Flavonoides	Si	Amarillo oscuro Verde Azul	Flavonoles y flavonas naranja, naranja-amarillo y verde-amarillo	Si
Isoflavonoides	Si	Celeste	Celeste	Posible
Lignanós	Si	Azul	No	Posible

* En baso a lo observado en los cromatofolios, tamizaje fitoquímico y bibliografía, ** Indoles, quinolinas, isoquinolinas, purinas, tropina (débil), EEG: extracto etanólico global, CCF: cromatografía en capa fina, NP/PEG: natural product/polietilenglicol.

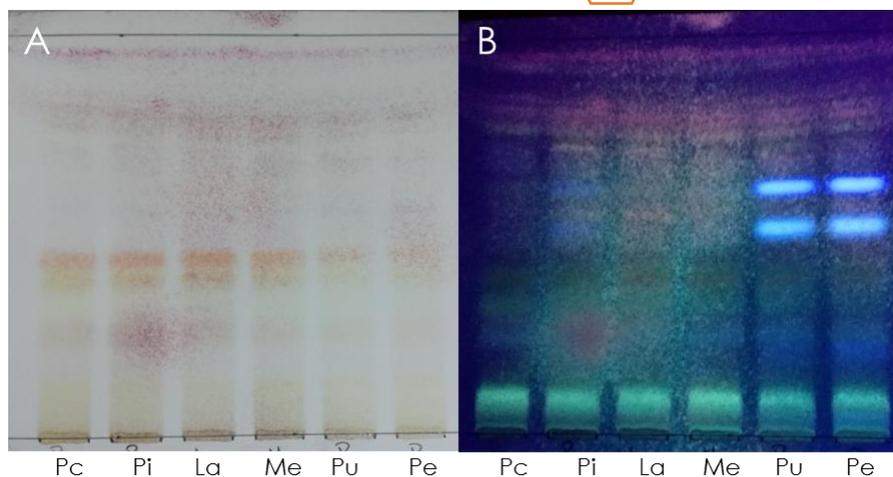


Figura 16: Cromatografía en capa fina de los EEGs revelados con PAAS al visible y a 365 nm.

Cromatofolio de gel de sílice, fase móvil: hexano:acetato de etilo:ác. Acético, 5:3:1 al visible (A) y a 365 nm (B). Pc: EEG de propóleo de Pichidegua, Pi: EEG de propóleo de Pirque, La: EEG de propóleo de Lampa, Me: EEG de propóleo de Melipilla, Pu: EEG de propóleo de Pudahuel, Pe: EEG de propóleo de Peñaflo; PAAS: p-anisaldehído/sulfúrico y EEG: extracto etanólico global

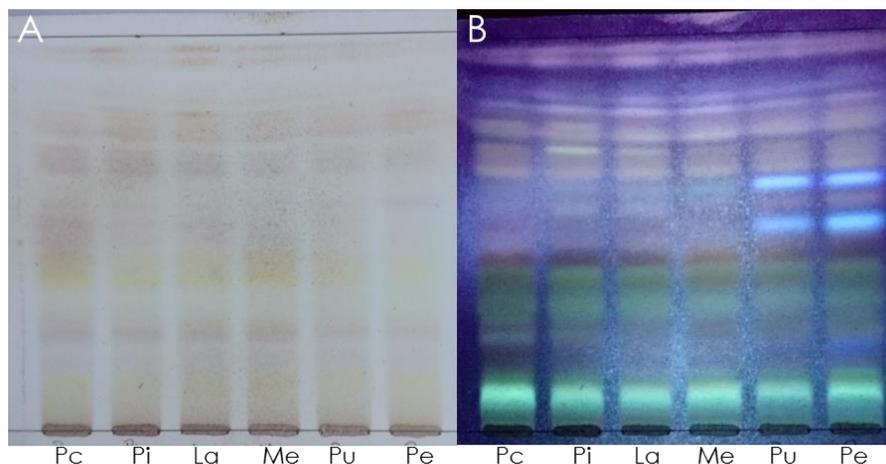


Figura 17: Cromatografía en capa fina de los EEGs revelados con LB al visible y a 365 nm.

Cromatofolio de gel de sílice, fase móvil: hexano:acetato de etilo:ác. Acético, 5:3:1 al visible (A) y a 365 nm (B). Pc: EEG de propóleo de Pichidegua, Pi: EEG de propóleo de Pirque, La: EEG de propóleo de Lampa, Me: EEG de propóleo de Melipilla, Pu: EEG de propóleo de Pudahuel, Pe: EEG de propóleo de Peñaflo; LB: Liebermann-Burchard y EEG: extracto etanólico global.



Tabla 7: Familia de compuestos presentes en los EEGs mediante análisis de CCF y reveladores PAAS y LB

Familia	Visible	UV-365 nm	Presencia*	
Terpenos	Amargos	Café, rojo, verde, azul, gris, amarillo **café oscuro y gris	amarillo, verde y rojo **café-arena, gris claro, verde	Posible
	Dulces	**Rojo, café-gris; LB		No detectado
	Picantes	Amarillo-limón, violeta-azul		Posible
	Aceites esenciales	azul, violeta, verde, rojo y café	Positivo	Posible
	Triterpenos	Azul-violeta, rojo, rojo violeta		Posible
Saponinas	Azul-azul-violeta, rojo, amarillo-café, ***amarillo	Azul, violeta, verde	Posible	
Glucósidos cardíacos	Azul (bufenólidos)		No detectado	
Glucósidos flavónicos	rojo-violeta, rojo-naranja, amarillo, amarillo-café		Posible	
Lignanos	Azul		Posible	
Pigmentos (crocina)	Azul-violeta, rojo-violeta		No detectado	

* En base a lo observado en los cromatofolios y bibliografía, ** con reactivo revelador Liebermann-Burchard, *** Reactivo de Liebermann-Burchard reacciona con saponinas esteroidales, EEG: extracto etanólico global, CCF: cromatografía en capa fina, PAAS: p-anisaldehído/sulfúrico, LB: Liebermann-Burchard.

3. Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos

Los cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD de los seis EEGs de propóleo de las distintas localidades se pueden observar en la Figura 18 a 280 nm donde se pueden observar picos que representan principalmente a los compuestos fenólicos presentes en las muestras, ya sea ácidos fenólicos o flavonoides, mientras que en la Figura 19 a 360 nm se observan picos que representan principalmente a los compuestos del tipo flavonoides.

Se pueden observar diferencias menores entre los perfiles fenólicos de los distintos EEGs: entre los tiempos de retención (R_t) 15 y 18 min se observan diferencias principalmente cuantitativas de los 3 picos principales; entre los R_t 20 y 22 min se logran observar diferencias cualitativas por la presencia de un pico a los 21,5 min en los EEGs de PPe y PPU a 280 nm; y entre los R_t 23 y 25 min también se observan diferencias principalmente cuantitativas, al igual que en el rango de los 30 y 36 min de R_t . Respecto a las diferencias observadas a los 380 nm, todas parecen ser diferencias cuantitativas más que cualitativas.

Si bien los perfiles fenólicos de los diferentes EEGs se ven similares, como se verá más adelante, se utilizaron técnicas más sensibles como LC-MS/MS para establecer diferencias cualitativas en la composición.

Por otra parte, las diferencias cuantitativas se establecieron a través de la determinación de los compuestos fenólicos totales y el contenido de flavonoides, así como mediante la cuantificación relativa de compuestos por CLAE-DAD y cuantificación mediante curvas de calibración con patrones por LC-MS/MS.

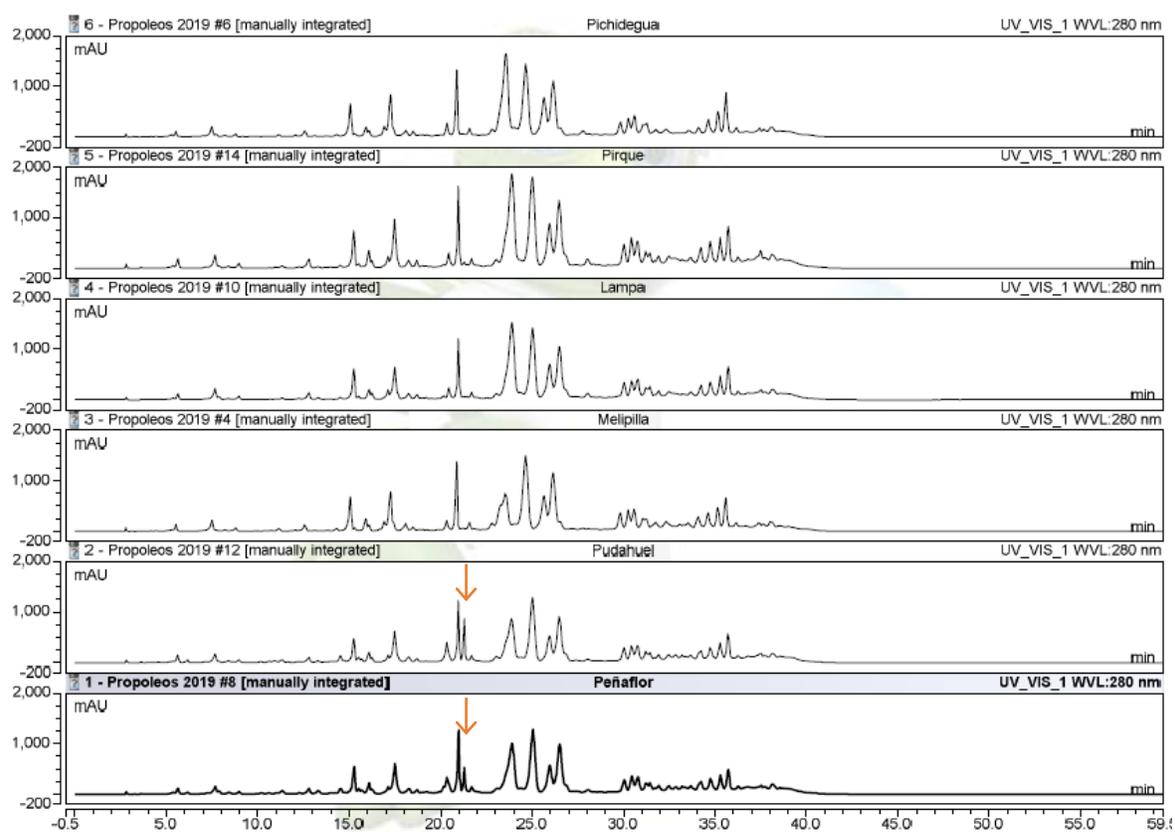


Figura 18: Cromatogramas de los EEGs de los propóleos de las distintas localidades a 280 nm.

Las flechas naranjas indican la presencia de un pico que aparece en los EEGs (extractos etanólicos globales) de los propóleos de Pudahuel y Peñaflo.

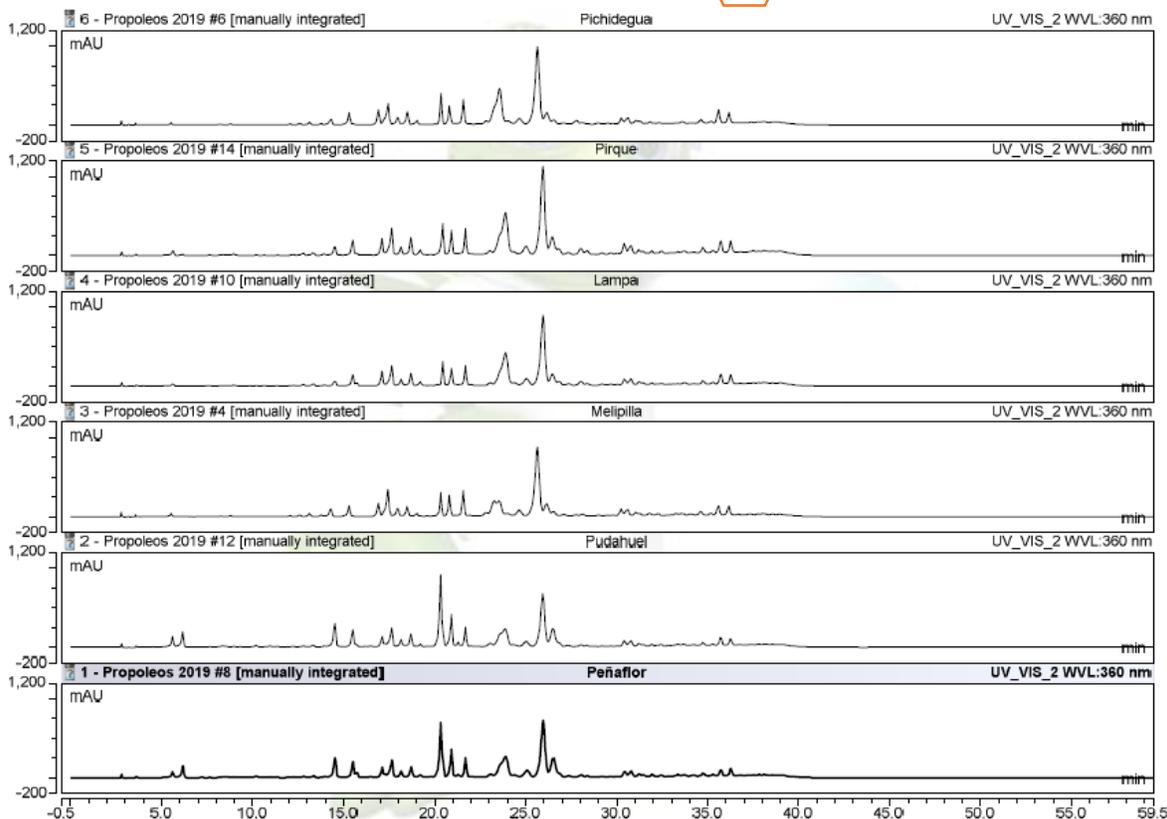


Figura 19: Cromatogramas de los EEGs de los propóleos de las distintas localidades a 360 nm.

EEGs: extractos etanólicos globales

4. Estandarización de los extractos etanólicos globales

4.1. Contenido de fenoles totales

Los resultados expresados como g equivalentes de ácido gálico por 100 g de EEG seco (g EAG/100 g ES) se observan en la Figura 20-A, mientras que los expresados como g equivalentes de ácido gálico por 100g de propóleo crudo (gEAG/100g PC) se observan en la Figura 20-B y se resumen en la Tabla 8. El EEG del PMe presentó el mayor CFT con $20,6 \pm 1,2$ g EAG/100 g ES ($14,4 \pm 0,8$ g EAG/100 g PC). Los demás EEGs no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí, cuando el CFT fue calculado respecto del ES, sin embargo, el EEG del PMe no presentó diferencias estadísticamente significativas con los EEGs de PPU y PPE en base a PC. Por otra parte, el CFT de los distintos EEGs no superó el 21% de fenoles

totales en base al PC, valor mínimo sugerido por Popova et al. (2007) para el control de calidad de propóleos tipo álamo.

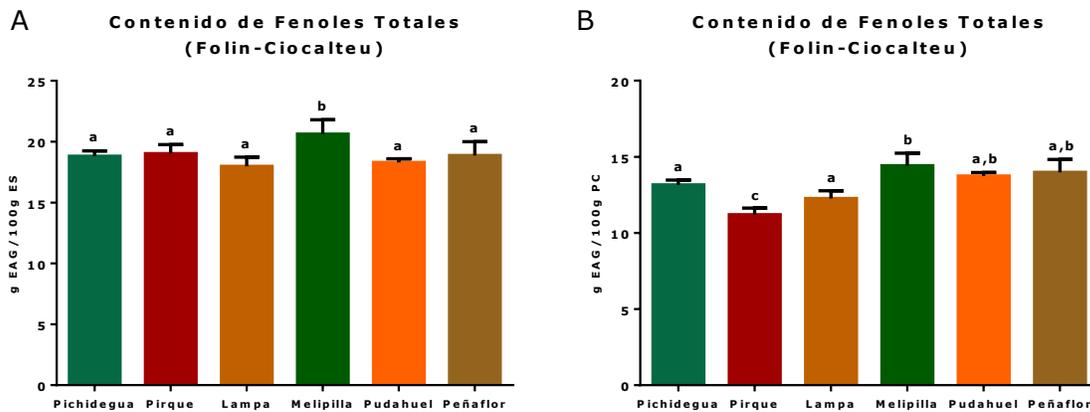


Figura 20: Contenido de fenoles totales mediante la metodología de Folin-Ciocalteu. Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar (N=3) en g EAG/100g ES (A) o g EAG/100g PC (B). Las letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey. CFT: contenido de fenoles totales, EAG: equivalentes de ácido gálico, ES: EEG seco, PC: propóleo crudo y EEG: extracto etanólico global.

En cuanto a los EEGs de propóleos de otras localidades de la zona central de Chile evaluados por Valenzuela-Barra et al. (2015), los CFT superan los aquí estudiados con valores que fluctúan entre los 24,3 y 31,9% p/p en base a ES, al igual que los estudiados por Castro et al. (2014) que mostraron valores de CFT entre 23 y 29,3% p/p en base a ES. Sin embargo, estos últimos resultados se encuentran expresados en equivalentes de ácido cafeico ($Y = 0,1133X + 0,0016$).

Al comparar los resultados aquí obtenidos con los de propóleos de otras regiones del país, se puede observar que el CFT varía dependiendo del origen, así para propóleos de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, se reportan valores entre 2,5 y 10,5 %p/p en base a PC, para la Región del Maule valores entre 11,5 y 20,8 %p/p en base a ES, finalmente un estudio realizado en Japón con propóleo procedente de Chile reportó un valor de 21% p/p en base a ES (Bridi et al., 2015; Kumazawa et al., 2004; Nina et al., 2015).

Debido a que la reacción que tiene lugar en la metodología de F-C se trata de una oxidación-reducción, está sujeta a falsos positivos por cualquier compuesto que tenga



la capacidad de reducir al reactivo de F-C, estos incluyen: proteínas, ácido ascórbico, ácido úrico, algunos aminoácidos y nucleótidos, azúcares, aminos aromáticas y algunas sales inorgánicas (Prior et al., 2005). Sin embargo, la metodología de F-C sigue siendo muy utilizada para la cuantificación de fenoles totales, ya sea para estandarizar o para comparar muestras de distintas matrices relacionadas a los productos naturales. Los investigadores que modificaron el método F-C lo hicieron pensando en reducir la interferencia de este tipo de compuestos (Singleton & Rossi, 1965). Por otra parte, el estudio realizado por Castro et al. (2014) sugiere que, si bien se pueden encontrar azúcares presentes en el propóleo de la RM, se encuentran en bajas concentraciones, lo que hacen despreciable su interferencia. La presencia de azúcares en esta matriz se debe principalmente al manejo de las mieles y su posible rol contaminante en el propóleo.

En base a lo mencionado previamente, todos los EEGs presentan un contenido alto de compuestos fenólicos respecto a otros propóleos de la RM estudiados en nuestro laboratorio, diferenciándose sólo estadísticamente el EEG del PMe. Sin embargo, evaluando la calidad de los propóleos crudos en base al CFT los PMe, PPU y PPE muestran los mayores valores de CFT lo que permite diferenciarlos como materias primas prometedoras en la búsqueda de compuestos con actividad biológica y para la fabricación de productos en el ámbito farmacéutico y alimentario.

4.2. Contenido de flavonas y flavonoles

Los valores obtenidos son expresados como g equivalentes de quercetina por 100 g de extracto seco (g EQ/100 g ES, %p/p) como se muestra en la Figura 21-A o como g equivalentes de quercetina por 100 g de propóleo crudo (g EQ/100 g PC) como se muestra en la Figura 21-B y que se resumen en la Tabla 8.

El EEG del PPE exhibió el mayor CFF con $6,2 \pm 0,8$ g EQ/100g ES ($4,6 \pm 0,6$ g EQ/100g PC), sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas con el CFF del EEG de PPU con $5,5 \pm 0,4$ g EQ/100g ES ($4,1 \pm 0,3$ g EQ/100g PC). Respecto del CFF de los EEGs restantes, sus valores no mostraron diferencias

estadísticamente significativas entre ellos. Por otra parte, tanto el EEG del PPe como del PPU cumplen con los valores mínimos de CFF de 4% en base a PC para establecer la calidad de propóleos de tipo álamo descrito por Popova et al. (2007).

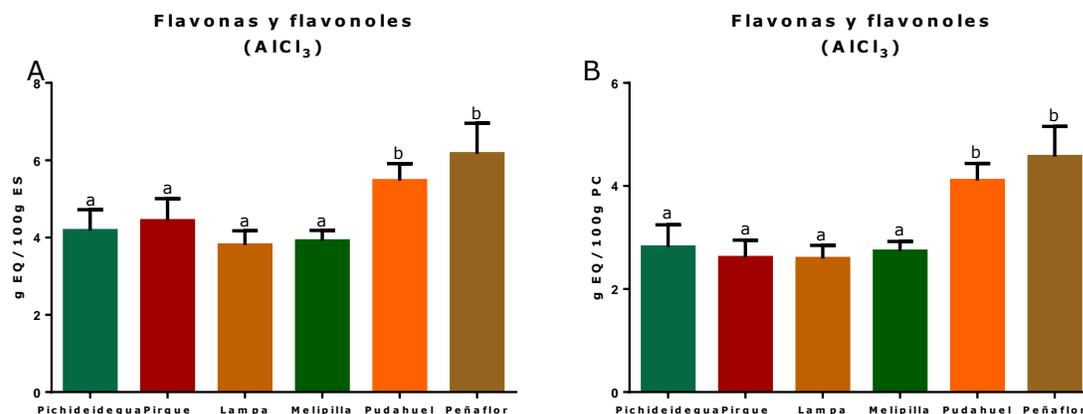


Figura 21: Contenido de flavonas y flavonoles mediante la metodología del AICI₃ Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar (N=3). Las letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey. EQ: equivalentes de quercetina, ES: extracto seco y PC: propóleo crudo.

Comparando los valores aquí obtenidos con los de Valenzuela-Barra et al. (2015) realizado en el Laboratorio de productos naturales para otros propóleos de la RM, se aprecian valores relativamente similares entre los $3,1 \pm 0,6$ y $10,9 \pm 0,2$ %p/p en base a ES. Por otro lado, para propóleos de otras regiones se observan valores similares, como por ejemplo: para propóleos de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins con valores entre 2,1 y 7,7 %p/p en base a PC, de la Región del Maule valores entre 1,72 y 14,0 %p/p expresados como equivalentes de catequina en base a ES, de la Región del Biobío valores entre 0 y 16 %p/p en base a PC y finalmente en un estudio realizado en Japón con propóleo chileno se reporta un contenido de flavonas y flavonoles de 11,6 %p/p en base a ES (Betances-Salcedo et al., 2017; Bridi et al., 2015; Kumazawa et al., 2004; Nina et al., 2015).

Es importante considerar que los compuestos flavónicos del tipo flavonas y flavonoles tienen mayor interés biológico ya que tienen reportadas la mayoría de las actividades estudiadas del propóleo, por ejemplo, en la inhibición de enzimas del

control glicémico, así como en la disminución de las complicaciones micro- y macrovasculares de la diabetes. Además, en general son mas abundantes que otros tipos de flavonoides, lo que aumenta el interés en los EEGs de los PPe, y PPU para considerarlos en la manufactura de productos farmacéuticos y alimentarios con potencial actividad sobre la regulación de la glicemia (Tesla et al., 2016; Xiao et al., 2013).

4.3. Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles

La metodología empleada tuvo que ser adaptada a un lector de microplaca. Los valores de absorbancia de las soluciones a distintas concentraciones de naringenina, así como la curva de calibración resultante se muestran en la Figura 22. Los valores obtenidos se expresan como g equivalentes de naringenina por cada 100 g de extracto seco (g EN/100 g ES, p/p%) como se pueden observar en la Figura 23-A o como g equivalentes de naringenina por cada 100 g de propóleo crudo (g EN/100 g PC) como lo muestra la Figura 23-B y resumidos en la Tabla 8.

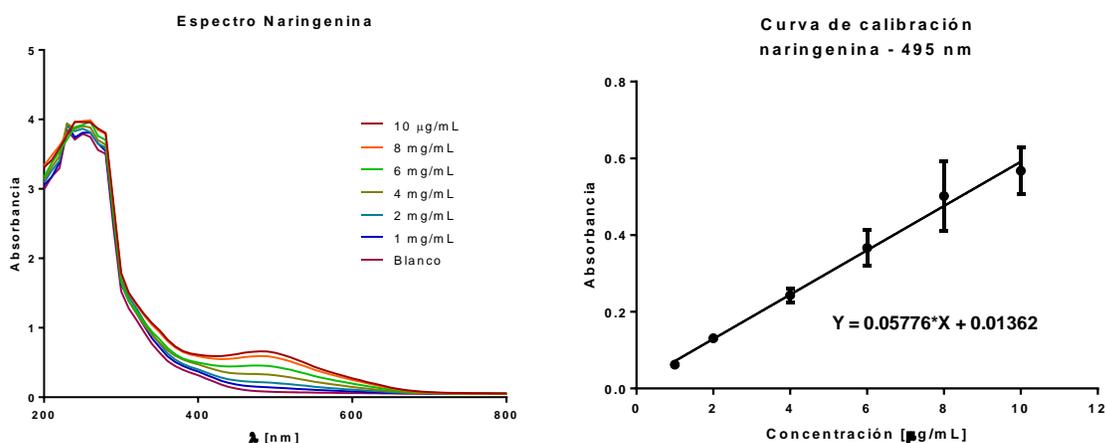


Figura 22: Espectro de absorción UV-Vis y curva de calibración con naringenina

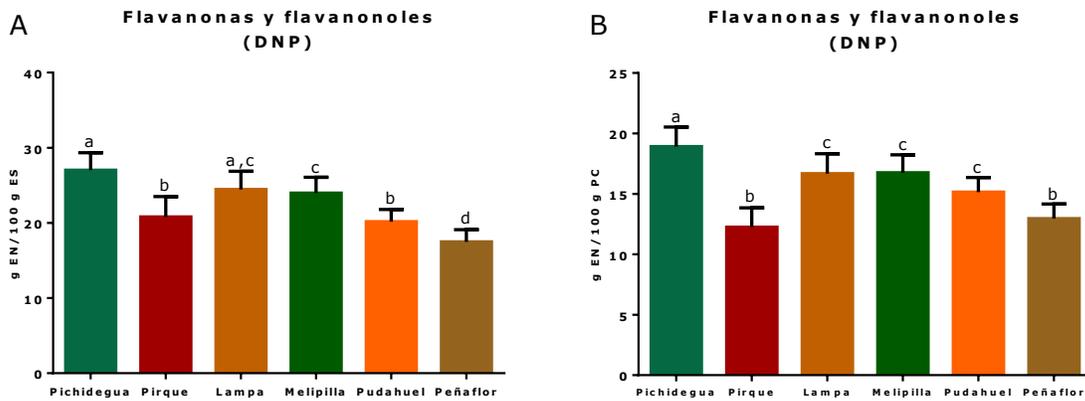


Figura 23: Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles mediante la metodología de la DNP

Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar (N=3). Las letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey. EN: equivalentes de naringenina, ES: extracto seco, DNP: 2,4-dinitrofenilhidracina.

El EEG con mayor CFD corresponde al del PPc con $27,0 \pm 2,3$ g EN/100 g ES, seguido del EEG del PLa con $24,4 \pm 2,4$ g EN/100 g ES, con el cual no presenta diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, al evaluar los valores en base a PC, nuevamente el EEG del PPc presenta el mayor CFD con $18,9 \pm 1,6$ g EN/100 g PC, pero muestra diferencias estadísticamente significativas con los otros EEGs. Todos los propóleos cumplen con el criterio de calidad que estableció Popova et al. (2007), con valores muy superiores al 4 %p/p en base a PC.

Los valores obtenidos para otros propóleos de la RM se encuentran entre $4,6 \pm 1,0$ y $24,0 \pm 1,0$ %p/p en base a ES (Valenzuela-Barra et al., 2015). En cuanto a propóleos de otras zonas se observan valores entre 2,7 y 15,0 %p/p en base a ES para la Región del Biobío (Betances-Salcedo et al., 2017).

De manera contraria a lo observado previamente con el contenido de flavonas y flavonoles, los flavanones y dihidroflavonoles tienen menor cantidad de estudios biológicos, por una parte porque son menos abundantes en las especies vegetales, entre ellas las que visitan las abejas, ya que corresponden a compuestos intermediarios en la biosíntesis de flavonoides. Por otra parte, sus características estructurales, como, por ejemplo, la pérdida del doble enlace en los carbonos C2 y



C3 del anillo C quita rigidez a las moléculas, permite menor conjugación de enlaces y menor capacidad de deslocalizar cargas, importante en las actividades antioxidantes de los compuestos fenólicos (Xiao et al., 2013; Bruneton, 2001).

Tabla 8: Contenido de fenoles totales, flavonas y flavonoles y flavanonas y dihidroflavonoles

Localidades	CFT [%p/p]		CFF [%p/p]		CFD [%p/p]	
	g EAG	g EAG	g EQ	g EQ	g EN	g EN
	100 g ES	100 g PC	100 g ES	100 g PC	100 g ES	100 g PC
Pichidegua	18,8 ± 0,4 ^a	13,2 ± 0,3 ^{a,b}	4,0 ± 0,6 ^a	2,8 ± 0,4 ^a	27,0 ± 2,3 ^a	18,9 ± 1,6 ^a
Pirque	19,0 ± 0,7 ^a	11,2 ± 0,4 ^c	4,4 ± 0,6 ^a	2,6 ± 0,3 ^a	20,8 ± 2,7 ^{b,a}	12,2 ± 1,6 ^b
Lampa	17,8 ± 0,8 ^a	12,3 ± 0,5 ^{a,b}	3,8 ± 0,4 ^a	2,6 ± 0,2 ^a	24,4 ± 2,4 ^{a,c}	16,7 ± 1,7 ^c
Melipilla	20,6 ± 1,2 ^b	14,4 ± 0,8 ^b	3,9 ± 0,3 ^a	2,7 ± 0,2 ^a	24,0 ± 2,1 ^{c,b}	16,8 ± 1,5 ^c
Pudahuel	18,3 ± 0,3 ^a	13,7 ± 0,2 ^{a,b}	5,5 ± 0,4 ^b	4,1 ± 0,3 ^b	20,2 ± 1,6 ^{b,c}	15,1 ± 1,2 ^c
Peñaflor	18,9 ± 1,1 ^a	14,0 ± 0,8 ^{a,b}	6,2 ± 0,8 ^b	4,6 ± 0,6 ^b	17,5 ± 1,6 ^d	13,0 ± 1,2 ^b

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar (N=3). Las letras iguales por columna, sobre los valores indican que no existen diferencias estadísticamente significativas por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey. CFT: contenido de fenoles totales, CFF: contenido de flavonas y flavonoles, CFD: contenido de flavanonas y dihidroflavonoles (flavanonoles), EAG: equivalentes de ácido gálico, EQ: equivalentes de quercetina, EN: equivalentes de naringenina, ES: extracto seco y PC: propóleo crudo.

Es interesante resaltar que no hay correlación entre el CFT con el CFF ni con CFD, sin embargo, si existe una correlación negativa ($r = -0,8800$), significativa ($p = 0,0207$) entre el CFF y CFD, cuyo coeficiente de determinación (R^2) es del 0,7744; es decir, que las variables explican en un 77% la variabilidad de la otra. A mayor CFF, menor CFD lo que es bueno desde el punto de vista de las actividades biológicas estudiadas en esta tesis, como la actividad inhibitoria de enzimas y antioxidante. El PPe es el que presentó el mayor CFF y uno de los que presenta menor CFD.

Para mantener el factor geográfico más acotado el PPc fue descartado para continuar con los estudios, debido a que esta localidad se encuentra fuera de la RM. Por otra parte, para los propóleos de las localidades de Lampa y Melipilla, no fue posible corroborar el origen de estos productos apícolas y la flora circundante a las colmenas, por lo que también fueron excluidos para los estudios siguientes. Por lo tanto, los propóleos seleccionados para continuar con los estudios de control de calidad e inhibición enzimática fueron los de Pirque, Pudahuel y Peñaflor.



5. Control de calidad de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1

En Chile no existe una norma reguladora de la calidad del propóleo, el Servicio agrícola Ganadero (SAG) solo lleva a cabo controles a las colmenas para garantizar que se encuentren libres de enfermedades, por lo que se hace necesaria la utilización de normas internacionales que permitan controlar la calidad de los propóleos chilenos. El propóleo crudo se utiliza para la comercialización, principalmente en las áreas farmacéuticas y cosmetológicas, por ende, debe cumplir con estándares mínimos de calidad, con el fin de que los productores adopten medidas destinadas a proteger la salud de la población consumidora.

5.1. Análisis gravimétricos

5.1.1. Pérdida por calentamiento

Los resultados obtenidos de la determinación de pérdida por calentamiento se resumen en la Tabla 9.

Según los requisitos de calidad exigidos por la norma argentina utilizada, IRAM-INTA 15935-1 (2008), la pérdida por calentamiento debe ser de un máximo de 10% p/p (10 g/100 g PC). Teniendo en cuenta el requisito de la norma, los tres propóleos cumplen con este criterio, el PPe mostró el menor valor ($0,70 \pm 0,18$ %) sin diferencias estadísticamente significativas con el PPi ($0,88 \pm 0,10$ %).

La determinación del porcentaje de humedad o pérdida por calentamiento es importante debido a que, si las muestras poseen una humedad excesiva, se favorece el desarrollo de mohos y levaduras, además de fermentaciones que generan productos no deseados y toxinas perjudiciales para el organismo (Palomino et al., 2010). Además, es importante destacar que en las condiciones en que se efectuó el ensayo, no sólo permitió la pérdida de agua, sino también de compuestos volátiles.



5.1.2. Determinación del porcentaje de cenizas

Los porcentajes de cenizas obtenidos para las muestras de propóleo evaluadas se observan en la Tabla 9.

Según los requisitos de calidad exigidos, de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), el contenido máximo de cenizas permitido es de 5 % p/p (5 g/100 g PC). De acuerdo con los resultados obtenidos, todas las muestras de propóleos analizadas cumplen con este requisito. Sin embargo, cabe destacar que la muestra de PPe alcanzó el menor porcentaje de cenizas con un $3,45 \pm 0,11$ %, sin diferencias significativas con el PPI ($3,70 \pm 0,16$ %).

Las cenizas son el residuo inorgánico del propóleo y su medición sirve para determinar, en parte, si las muestras de propóleo han sido adulteradas con algún componente de tal forma que aumente el peso total. Se ha descrito que de los principales adulterantes la arcilla es la más utilizada, en los cuales se obtienen valores superiores al 5% (Valenzuela, 2014). Cabe destacar, que el ensayo de cenizas se relaciona directamente con el contenido de impurezas mecánicas, debido a que ambos ensayos son indicadores directos del tipo de recolección y las condiciones de manipulación del propóleo.

5.1.3. Determinación del índice de oxidación

Los índices de oxidación de las muestras de propóleo se aprecian en la Tabla 9. Según los requisitos de calidad exigidos, de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), el tiempo máximo de decoloración de las muestras es de 22 s, por lo tanto, todas las muestras de propóleos evaluadas cumplen con esta exigencia, siendo el resultado del PPU el más bajo con $4,79 \pm 1,22$ s, sin presentar diferencias estadísticamente significativas con el PPI ($6,80 \pm 1,14$ s).

Este tipo de análisis da cuenta de la capacidad reductora de las muestras, y por esto que indica la posible presencia de compuestos de naturaleza fenólica o grupos funcionales oxidables como hidroxilos, insaturaciones, entre otras, permitiendo así



poder obtener una estimación del efecto antioxidante de los propóleos estudiados (Palomino et al. 2010). Sin embargo, cabe destacar, que el método empleado es cualitativo y bastante subjetivo, ya que depende de la capacidad visual del investigador.

5.1.4. Determinación del porcentaje de sustancias extraíbles en hexano

En la Tabla 9 se visualizan los resultados obtenidos en la determinación de sustancias extraíbles con hexano. Según la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), el máximo aceptado es un 35% p/p (35 g/ 100 g PC) y de acuerdo con los resultados el propóleo que exhibió un menor porcentaje fue el PPe con $33,69 \pm 1,23$ % diferenciándose estadísticamente con los demás propóleos.

Una gran cantidad de sustancias extraídas con solventes apolares como es el hexano, indica un gran contenido de ceras en el propóleo. Teniendo presente que los compuestos fenólicos no se encuentran en la cera, es de esperar que los propóleos presenten un contenido bajo de ésta y mayor contenido de resina, donde si se presentan la mayoría de los compuestos bioactivos polares. Además, es importante destacar que el contenido de ceras está determinado por la época del año de recolección del propóleo y el procedimiento de cosecha. Cabe destacar que compuesto bioactivos más apolares podrían ser extraídos también con solventes como el hexano.

5.1.5. Determinación del porcentaje de resinas

La resina corresponde al EEG seco obtenido desde el propóleo crudo descerado. Los resultados del porcentaje de resinas de las muestras de propóleo evaluados se observan en la Tabla 9.

De acuerdo con los requisitos de calidad exigidos por la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), el contenido mínimo de resinas para los propóleos es de un 35 % p/p (35 g/ 100 g PC) y todas las muestras analizadas están por sobre ese valor, cumpliendo

satisfactoriamente con este requisito. El PPe presentó el mayor porcentaje de resina con $59,81 \pm 0,93 \%$ y no mostró diferencias estadísticamente significativas con el PPu ($58,06 \pm 1,06 \%$).

Es relevante tener en cuenta que cuanto mayor sea el porcentaje de resina, mayor contenido de compuestos bioactivos se esperaría obtener, por lo que se podría correlacionar con una mejor actividad farmacológica y por lo tanto con un producto de mejor calidad.

5.1.6. Impurezas mecánicas

Los resultados del porcentaje de impurezas mecánicas de las muestras de propóleo se resumen en la Tabla 9. Según los requisitos de calidad exigidos, de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008) el contenido máximo de impurezas mecánicas permitido es de 25 %p/p (25 g/ 100 g PC). De acuerdo con esto, todas las muestras poseen valores bastante inferiores a lo establecido. El porcentaje más bajo se presentó en el PPu con valores de $2,49 \pm 0,46 \%$, diferenciándose estadísticamente de los otros propóleos.

En las impurezas mecánicas no se presentan compuestos bioactivos, por lo tanto, la presencia elevada de estas impurezas podría disminuir la potencial eficacia terapéutica del propóleo (Palomino et al., 2010). Como impurezas mecánicas se pueden encontrar diversos elementos asociados o no a la actividad apícola, por ejemplo, abejas o restos de éstas, virutas de madera, restos vegetales, piedras, arena, entre otros.

Con el fin de disminuir este tipo de elementos en las muestras de propóleo aquí estudiadas, se aplicaron distintos criterios de selección, por ejemplo, propóleos que se hubiesen cosechado por el método de rejilla o malla, provenientes de colmenas fijas y no trashumantes y muestras que no fueran de acopio, es decir que solo provinieran de un sector, sin ser mezcladas.



Tabla 9: Pruebas gravimétricas de los distintos propóleos seleccionados.

Gravimetría	PPi	PPu	PPe
Perdida por calentamiento	0,88 ± 0,10 % ^{a, b}	1,13 ± 0,16 % ^a	0,70 ± 0,18 % ^b
Porcentaje de ceniza	3,70 ± 0,16 % ^a	4,45 ± 0,27 %	3,45 ± 0,11 % ^a
Índice de oxidación	6,80 ± 1,14 s ^{a, b}	4,79 ± 1,22 s ^a	10,63 ± 2,82 s ^b
Sustancias extraíbles en hexano	38,46 ± 1,39 % ^a	37,03 ± 1,65 % ^a	33,69 ± 1,23 %
Porcentaje de resina	53,45 ± 0,95 %	58,06 ± 1,06 % ^a	59,81 ± 0,93 % ^a
Impurezas mecánicas	6,43 ± 0,50 %	2,49 ± 0,46 %	5,27 ± 0,63 %

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar (N=3). Las letras iguales por filas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey. PPi: propóleo de la localidad de Pirque, PPU: propóleo de la localidad de Pudahuel y PPe: propóleo de la localidad de Peñaflores.

Al comparar los resultados gravimétricos aquí obtenidos con los descritos previamente en el laboratorio de Productos Naturales por Valenzuela (2015), se observan diferencias importantes que pueden atribuirse principalmente a la localidad y año de recolección. El porcentaje de humedad para propóleos de Buin, Cajón del Maipo, Caleu y Curacaví resultaron ser mayores que los obtenidos en este estudio, al igual que las impurezas mecánicas que fluctuaron entre el 2 a 3% y 4,6 a 14,7%, respectivamente. Sin embargo, al comparar el índice de oxidación y el porcentaje de resina, los valores anunciados por Valenzuela (2015) son superiores a los presentados en este estudio, siendo de 2,4 a 14,5 segundos para el índice de oxidación y de 56,7 a 82,3% de resina. Por otra parte, los valores del porcentaje de cenizas y de sustancias extraíbles en hexano son menores a los aquí presentados, indicando un propóleo de mejor calidad para los estudiados por Valenzuela (2015). Estos valores fluctuaron entre 1,4 a 3,2 % de cenizas y 20,4 a 27,4% de sustancias extraíbles en hexano.

Hernández et al. (2005) por su parte también evaluó la calidad de propóleos de la actual región de Ñuble. Nuevamente los propóleos aquí estudiados mostraron mejores resultados para la humedad y las impurezas mecánicas además del índice de oxidación, siendo de 4,95 a 5,28% el porcentaje de cenizas, de 8,68 a 12,03% de impurezas mecánicas y de 9,44 a 10,52 el índice de oxidación para los propóleos estudiados por Hernández et al. (2005). Sin embargo, al comparar los otros indicadores de calidad, estos resultaron ser mucho mejores que los aquí estudiados,

con valores de 1,51 a 1,91% de cenizas, 11,5 a 18,47% de sustancias extraíbles en hexano y 68,12 a 80,41% de resinas. Cabe destacar que, en estos dos últimos indicadores de calidad, el procedimiento establecido por Hernández et al. (2005) es inverso al utilizado en este trabajo como al utilizado por Valenzuela (2015), pudiendo afectar los porcentajes reales de sustancias extraíbles en hexano al realizarlo de forma posterior a la extracción con etanol.

5.2. Determinación de compuestos fenólicos

5.2.1. Contenido de fenoles totales

La curva de calibración de ácido gálico realizada mediante el método de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de fenoles totales se muestra en la Figura 24. La concentración de compuestos fenólicos totales expresados como gramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de PC se resumen en la Tabla 10.

Según la norma Argentina IRAM-INTA 15935-1 (2008), el contenido mínimo de compuestos fenólicos que deben contener las muestras es de 5 % p/p (5 g/100 g PC), de acuerdo con esto podemos observar que todas las muestras presentaron CFT superior al límite establecido. El valor más alto lo exhibió el PC de Peñaflores con $9,45 \pm 0,61$ %, diferenciándose estadísticamente de los otros propóleos.

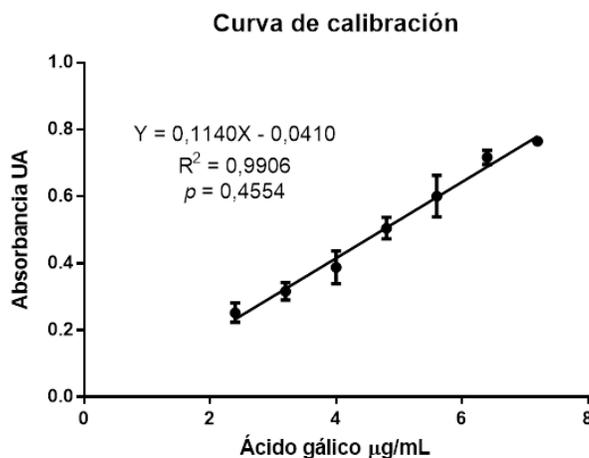


Figura 24: Curva de calibración de ácido gálico por metodología de Folin-Ciocalteu. R^2 : coeficiente de determinación, valor p para test de carencia de ajuste.

5.2.2. Determinación de flavonoides totales

La curva de calibración de quercetina construida mediante el método del tricloruro de aluminio (AlCl_3) para la cuantificación de flavonoides totales se muestra en la Figura 25. La concentración de flavonoides totales expresados como gramos equivalentes de quercetina por cada 100 g de PC se resumen en la Tabla 10.

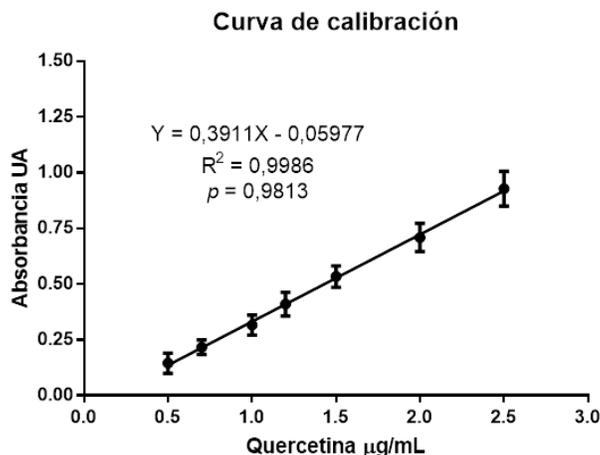


Figura 25: Curva de calibración de quercetina obtenida por método del tricloruro de aluminio (AlCl_3).

R^2 : coeficiente de determinación, valor p para test de carencia de ajuste.

Según los requisitos de calidad exigidos de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), la mínima cantidad de flavonoides presentes en las muestras debe ser de un 1% y se observa que los tres propóleos evaluados presentan porcentajes por sobre el requerido.

Es importante destacar que el método de evaluación de flavonoides empleando la formación de un complejo coloreado con AlCl_3 sólo permite determinar flavonas y flavonoles, ya que éstos, desde el punto de vista químico, pueden formar complejos estables con el tricloruro de aluminio y así ser susceptibles de analizar mediante espectrofotometría ultravioleta-visible, pero no así las flavanonas o isoflavonas, las cuales se deben determinar por otros métodos, como se ha mencionado en la caracterización y estandarización de los EEGs obtenidos a partir de las muestras de propóleo bajo estudio.



Tabla 10: Determinación de compuestos fenólicos en las muestras de propóleo crudo.

Compuestos fenólicos	PPi	PPu	PPe
Contenido de fenoles totales	6,98 ± 0,23 % ^a	7,40 ± 0,38 % ^a	9,45 ± 0,61 %
Contenido de flavonoides totales	5,50 ± 0,20 %	7,21 ± 0,88 % ^a	7,56 ± 0,46 % ^a

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar (N=3). Las letras iguales por filas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey. PPI: propóleo de la localidad de Pirque, PPU: propóleo de la localidad de Pudahuel y PPE: propóleo de la localidad de Peñaflores.

Comparando nuevamente con los valores expuestos por Valenzuela (2015) y Hernández (2005), los PPI, PPU y PPE muestran valores inferiores de contenido de fenoles totales, pero respecto al contenido de flavonoides totales obtuvieron valores superiores a los expuestos por Valenzuela (2015), nuevamente evidenciando las diferencias que pueden ejercer los factores zonales y temporales en la composición de los propóleos.

En consecuencia, los tres propóleos aquí estudiados cuentan con buenos índices de calidad de acuerdo con la norma argentina IRAM-INTA 15935-1 del año 2008, sin embargo, el PPE es el único que cumple con todos los criterios de calidad, lo que permite clasificarlo como una materia prima de calidad para el desarrollo de productos tanto en el área farmacéutica, alimentaria, como cosmética.

Por otra parte, con base en la valoración de los compuestos fenólicos totales y flavonoides totales se logra respaldar los resultados obtenidos previamente en la estandarización de los EEGs, que indican al EEG del PPE como el EEG con mayor CFT y CFF, mediante dos técnicas extractivas distintas.

6. Actividad inhibitoria de la actividad de enzimas del control glicémico

6.1. Inhibición de la actividad de la enzima α -glucosidasa

6.1.1. Modificación del porcentaje de DMSO

Para evaluar como afectaba el porcentaje de DMSO en la actividad enzimática, se evaluaron los blancos de reacción con las distintas proporciones de DMSO avaladas

por la literatura. Los valores de absorbancia obtenidos se presentan en la Figura 26-A. Un ANOVA demostró que bajo las cuatro proporciones de DMSO no se observan diferencias significativas en la actividad enzimática, por lo que se decidió utilizar la mayor proporción de DMSO para realizar el ensayo de inhibición de la actividad de la α -glucosidasa y asegurar la solubilidad de los EEGs.

Todos los EEGs presentaron actividad inhibitoria concentración-dependiente frente a la α -glucosidasa y con mayor potencia que el fármaco de referencia (acarbose). Las curvas concentración-respuesta se muestran en el Anexo 1, las CI_{50} se observan en la Figura 26-B y se resumen en la Tabla 11. El EEG con mayor potencia inhibitoria de la actividad de la enzima corresponde al del PPe con una CI_{50} de $6,4 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$, unas 40 veces más potente que acarbose ($CI_{50} = 259,1 \pm 33,4 \mu\text{g/mL}$). Los tres EEGs se diferencian estadísticamente entre ellos mediante ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey.

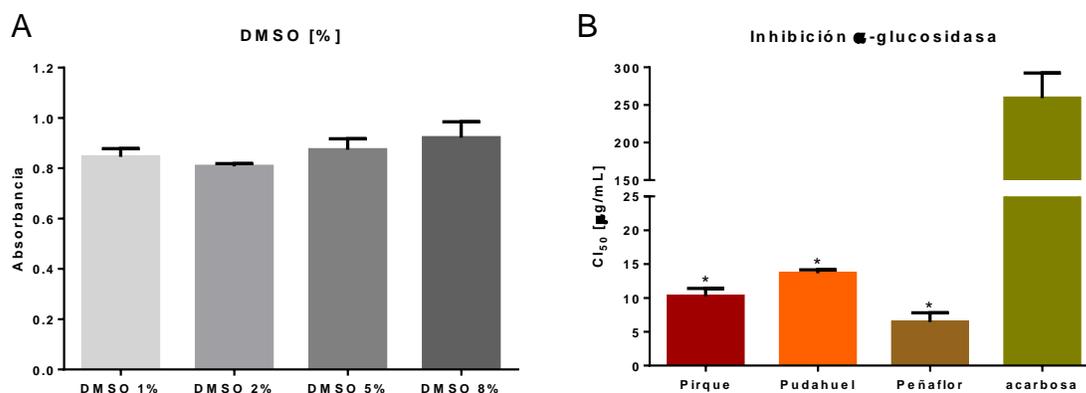


Figura 26: Porcentaje de dimetilsulfóxido e inhibición de la actividad de la enzima α -glucosidasa

Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar (N=3). (A) absorbancias a distintas proporciones de DMSO sin diferencias estadísticamente significativas mediante ANOVA. (B) Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de los EEGs disueltos en DMSO (8%) frente a α -glucosidasa. Los * representan diferencias estadísticamente significativas con el control positivo (acarbose) por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Dunnett.



6.1.2. Modificación en el proceso de solubilización

Pese a que la inspección visual no arrojó presencia de precipitados entre las concentraciones de 0,125 y 80 $\mu\text{g/mL}$, 300 μL de estas soluciones fueron evaluadas mediante un barrido de absorbancia entre los 200 y 520 nm (Anexo 2). Se observaron dos máximos de absorbancias: entre 200 y 240 nm asociados al DMSO y posiblemente a terpenoides y entre 260 y 320 nm asociada a los polifenoles. Sin embargo, a 400 nm no se observaron picos y los niveles de absorbancia eran muy bajos, además de tener un rango de absorción lineal: de 0,125 a 20 $\mu\text{g/mL}$ para el EEG del PPI ($r^2 = 0,9672$, carencia de ajuste $p = 0,5678$), de 0,125 a 40 $\mu\text{g/mL}$ para el EEG del PPU ($r^2 = 0,9979$, carencia de ajuste $p = 0,4380$) y de 0,125 a 80 $\mu\text{g/mL}$ para el EEG del PPE ($r^2 = 0,9975$, carencia de ajuste $p = 0,1126$), por lo que se decidió seguir con el ensayo de inhibición enzimática.

Para determinar la CI_{50} , se evaluaron seis concentraciones de los EEGs (1 a 80 $\mu\text{g/mL}$), los resultados fueron ajustados a un modelo de inhibición obteniéndose curvas concentración-respuesta que se muestran en el Anexo 3; las CI_{50} se observan en la Figura 27 y se resumen en la Tabla 11.

Todos los EEGs presentaron actividad inhibitoria concentración-dependiente frente a la α -glucosidasa y con mayor potencia que el fármaco de referencia (acarbose). El EEG con mayor potencia inhibitoria corresponde al del PPE con una CI_{50} de $7,5 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$, unas 35 veces más potente que acarbose ($CI_{50} = 259,1 \pm 33,4 \mu\text{g/mL}$). Los tres EEGs se diferencian estadísticamente entre ellos. Al comparar los resultados de ambas modificaciones, que se representan en la Figura 28, se puede observar que con DMSO 1% las CI_{50} tienden a aumentar, es decir, reducir la potencia inhibitoria, sin embargo, tanto para el EEG del PPI como el del PPE este aumento es ligero y no implica diferencias estadísticamente significativas a diferencia del EEG del PPU que aumenta en casi un 50%. Este aumento es esperable dado que al reducir el porcentaje de DMSO reduce las probabilidades de tener una solución con todos los compuestos disueltos y no formando una dispersión, pese a que no se observó turbidez en los pocillos de reacción. Pese a

esto, la tendencia de inhibición es igual y el EEG del PPe mantiene en forma significativa la mayor potencia inhibitoria.

Muchos estudios se han realizado con compuestos aislados en la búsqueda de nuevos agentes inhibidores de actividad de la α -glucosidasa, entre ellos muchos polifenoles (Yin et al., 2014), logrando establecer relaciones estructura-actividad de los flavonoides que han determinado que la hidroxilación así como la galoilación genera un aumento en la actividad inhibitoria de los flavonoides, por otro lado la glucosilación de hidroxilos así como la hidrogenación del doble enlace C2=C3 (flavanonas y dihidroflavonoles) disminuyen la actividad inhibitoria. Lo que podría explicar la mayor potencia inhibitoria del EEG del PPe quien también exhibe el mayor CFF de los tres EEGs seleccionados. Por otra parte, todos los ácidos fenólicos poseen una fuerte potencia inhibitoria de la α -glucosidasa (Xiao et al., 2013). Algunos de estos compuestos y sus CI_{50} se mencionan en la Tabla 12.

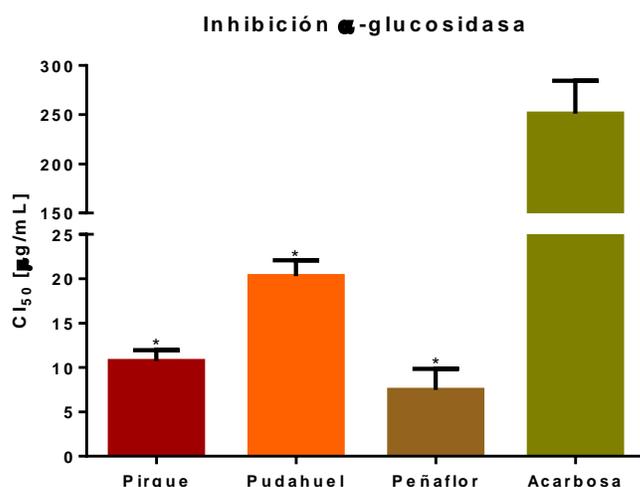


Figura 27: Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de los EEGs frente a α -glucosidasa. Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar (N=3). Los * representan diferencias estadísticamente significativas con el control positivo (acarbosa) por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Dunnett.

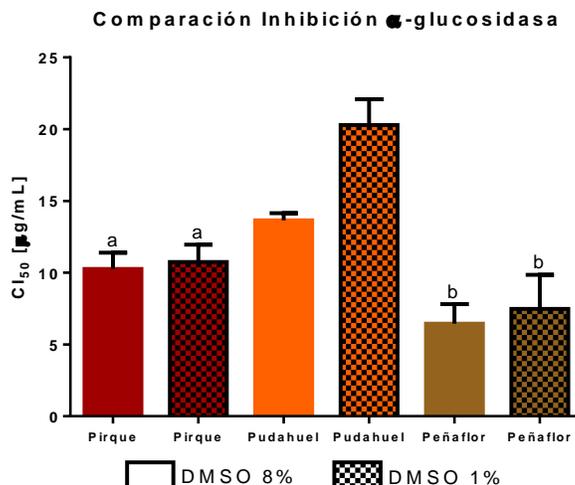


Figura 28: Comparación de las CI_{50} por modificaciones en la metodología

Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar (N=3). Las letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Sidak.

Un estudio realizado con 40 polifenoles naturales (flavonoides y ácidos fenólicos) mediante *docking* molecular en el sitio catalítico, determinó que los 40 compuestos poseían energías de unión entre -8,2 y -3,6 Kcal/mol, de los cuales 3 flavonoides poseían las mejores energías de unión con α -glucosidasa: rutina (-8,2 Kcal/mol), quercetina (-8,0 Kcal/mol) y miricetina (-7,7 Kcal/mol), corroborados posteriormente con ensayos de inhibición. Los residuos aminoacídicos involucrados en las interacciones moleculares correspondieron a los residuos Glu322, Lys324 y Asp325 que generaban puentes de hidrógeno con rutina; Asp325 y Asp521 puentes de hidrógeno con quercetina junto a Lys324 con interacciones tipo Van der Waals; y finalmente Glu22, Asp325 y Asp521 puentes de hidrógeno con miricetina junto a Lys324 con interacción polar que involucra a un anillo π . (Hyun et al. 2014).

6.2. Inhibición de la actividad de la enzima glicógeno fosforilasa a

Para determinar la concentración inhibitoria del 50% de la actividad de la GP_a (CI_{50}), se evaluaron concentraciones distintas de los EEGs y los resultados fueron ajustados a un modelo de inhibición obteniéndose curvas concentración-respuesta

que se muestran en el Anexo 4, las CI_{50} se observan en la Figura 27 y se resumen en la Tabla 11.

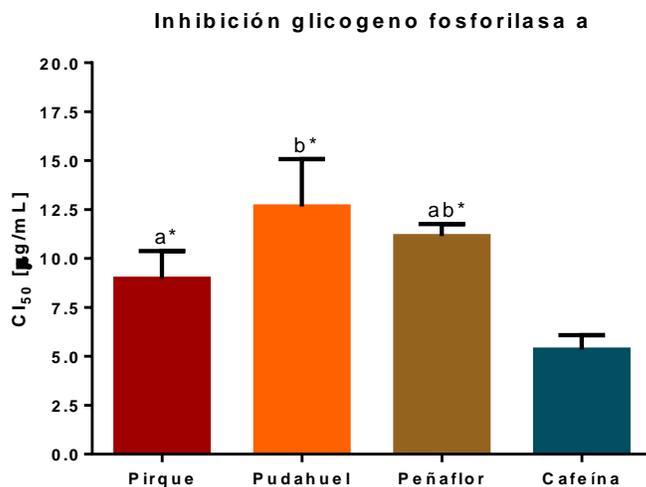


Figura 29: Concentración inhibitoria 50 frente a glicógeno fosforilasa a.

Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar (N=3). Los * representan diferencias estadísticamente significativas con el control positivo (cafeína) por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Dunnett. Las letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey.

Todos los EEGs presentaron actividad inhibitoria de la actividad enzimática concentración-dependiente frente a la enzima GP_a, sin embargo, con menor potencia que el compuesto de referencia (cafeína). El EEG con mayor potencia inhibitoria corresponde al obtenido desde el PPI con una CI_{50} de $9,0 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{mL}$, casi un 70% menos potente que cafeína ($CI_{50} = 5,3 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{mL}$). Por otra parte, el EEG del PPI no se diferenció estadísticamente con el EEG del PPE, que presentó una CI_{50} de $11,2 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{mL}$.

La cafeína es un inhibidor alostérico de la enzima y en su curva concentración-respuesta se observó una pérdida en la eficacia de la inhibición de la GP_a, alcanzando alrededor de un 87% de inhibición máxima. Los EEGs muestran el mismo comportamiento que la cafeína, alcanzando valores máximos de inhibición entre un 80% para el EEG del PPU y un 87% para el EEG del PPI y del PPE, lo que sugiere un comportamiento de inhibidores alostéricos para los EEGs de propóleos



de la RM (Anexo 4). Sin embargo, son necesarios estudios de competición enzimática para precisar el tipo de inhibición.

Tabla 11: Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) frente a las enzimas α-glucosidasa y glicógeno fosforilasa a

	CI ₅₀ AG (µg/mL)		CI ₅₀ GPa (µg/mL)
	DMSO 8%	DMSO 1%	DMSO 1%
EEG Pirque	10,3 ± 1,1	10,7 ± 1,2*	9,0 ± 1,4 ^a
EEG Pudahuel	13,7 ± 0,5	20,3 ± 1,8*	12,6 ± 2,4 ^b
EEG Peñaflo	6,4 ± 1,4	7,5 ± 2,4*	11,2 ± 0,6 ^{a,b}
Acarbosa	n.d.	259,1 ± 33,4	n.d.
Cafeína	n.d.	n.d.	5,3 ± 0,7

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar (N=3). Las letras iguales por columna indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey. Los * representan diferencias estadísticamente significativas con el control positivo (acarbosa o cafeína) por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Dunnett. CI₅₀ AG: inhibición del 50% de la actividad de la α-glucosidasa, CI₅₀ GPa: inhibición del 50% de la actividad de la glicógeno fosforilasa a, DMSO: dimetilsulfóxido, EEG: extracto etanólico global, n.d.: no determinado.

Al igual que con la α-glucosidasa, diversos estudios se han llevado a cabo con flavonoides aislados para evaluar la potencia inhibitoria tanto de la GPa como de la GPb. En base a estos estudios se ha podido definir la relación estructura-actividad de los flavonoides indicando que la hidroxilación del anillo B genera un aumento de la actividad inhibitoria de la actividad de la GPa, específicamente en las posiciones 3' y 4', mientras que la pérdida de los hidroxilos en la posición 5 y 7 del anillo A tiene como consecuencia la pérdida total de la actividad inhibitoria de estos metabolitos secundarios. La presencia del hidroxilo en la posición C-3 del anillo C también genera un aumento en la actividad inhibitoria de la actividad de la GPa. Por otra parte la adición de grupos metoxilos así como la hidrogenación del doble enlace 2C=3C del anillo C disminuyen notoriamente la actividad inhibitoria (Jakobs et al., 2006; Kato et al., 2008). Algunos de los compuestos aislados evaluados en ensayos de inhibición de la actividad de la GP se resumen en la Tabla 12.

La mayoría de los compuestos fenólicos de origen natural que tienen actividad inhibitoria de la GP no tienen descrito el lugar ni tipo de unión. Sin embargo, se ha descrito un sitio alostérico especial para quercetina, denominado sitio de unión a quercetina, distinto de otros sitios alostéricos previamente descritos. Los residuos



aminoacídicos con los que interactúa la quercetina corresponden a: Arg551 y Lys544 formando puentes de hidrogeno e interacciones de Van der Waals; con Glu121 y Lys655 formando puentes de agua con los hidroxilos de la posición 4' (anillo B) y 5 (anillo A); y con Ley494, Lys445 y Glu554, formando puentes de agua con el hidroxilo de la posición 7 (anillo A). La crisina, por otra parte, se une al sitio inhibidor, que reconoce purinas como la cafeína, interactuando con los residuos Phe285 y Tyr613 mediante los grupos aromáticos (Hayes et al., 2014).

Se puede apreciar que tanto para la α -glucosidasa como para la GPa los requerimientos estructurales mínimos de los flavonoides son similares, lo que aumenta la probabilidad de encontrar en este estudio un extracto a base de propóleo que sea capaz de inhibir la actividad de ambas enzimas *in vivo*. Es importante mencionar que a la fecha no hay reportado ensayos de inhibición de la actividad de la GPa con propóleos a nivel mundial, a diferencia de ensayos frente a α -glucosidasa. Por otra parte, no existen estudios de inhibición frente a ambas enzimas con propóleos chilenos, siendo éstos los primeros reportes de inhibición de la actividad *in vitro*.

Tabla 12: Inhibición de AG y GPa con distintos compuestos aislados presentes en propóleos

Compuesto	AG	GPa/GPb
Quercetina	$1 \pm 0,1 \mu\text{L/mL}^a$; $58,93 \pm 6,69 \mu\text{M}^b$; $0,017 \text{ mmol/L}^c$; $3,5 \text{ mM}^d$; $8 \mu\text{mol/L}^e$; $8,86 \mu\text{g/mL}^e$ $216 \mu\text{g/mL}^e$ (sacarasa)	$4,8 \pm 0,4 \mu\text{M}^f$ $20,9 \pm 1,9 \mu\text{M}^f$ (GPb) $33,5 \mu\text{M}^g$ (GPb)
Canferol	$20 \mu\text{mol/L}^e$	$>200 \mu\text{M}^g$ (GPb)
Apigenina	$12 \mu\text{M}^d$	$>30 \mu\text{M}^f$
Crisina		$> 27,5 \mu\text{M}^f$ $5,3 \pm 1,0 \mu\text{M}^f$ (GPb)
Naringenina	$75 \mu\text{M}^d$; $50 \mu\text{mol/L}^e$	$>50 \mu\text{M}^f$, μM^g (GPb)
Pinocembrina		$>200 \mu\text{M}^g$ (GPb)
Acarbosa	$140,5 \pm 0,5 \mu\text{L/mL}^a$ $130,52 \pm 10$; $01 \mu\text{M}^b$ $0,091 \text{ mmol/L}^c$	
Cafeina		$0.49 \pm 2.00 \text{ mg/mL}^h$,

Valores expresados como promedio (\pm desviación estándar). ^a Hyun et al., 2014; ^b Nurul Islam et al., 2013; ^c Li et al., 2009; ^d Xiao et al., 2013; ^e Yin et al., 2014; ^f Jakobs et al., 2006; ^g Kato et al., 2008; ^h Ablat et al., 2014. AG: α -glucosidasa, GPa: glicógeno fosforilasa a.



7. Capacidad antioxidante

7.1. Capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC)

7.1.1. ORAC-Fluoresceína (ORAC-FL)

Los perfiles de decaimiento de la fluorescencia en función de la concentración de EEG y las regresiones lineales de las concentraciones vs ABC_{neta} se muestran en el Anexo 5. Los valores del índice ORAC-FL se presentan en la Figura 30-A expresados como μ moles equivalentes de trolox por mg de EEG seco (μ moles eq trolox/mg ES) y en la Figura 30-B expresados como μ moles eq trolox/mg PC y se resumen en la Tabla 13. Los tres EEGs evaluados exhibieron valores mayores a 1, lo que demostró que los EEGs presentaron mayor capacidad de neutralizar radicales libres del oxígeno que trolox. El EEG del PPe presentó el mayor valor con $22,0 \pm 1,5$ μ moles eq trolox/mg ES. Todos los propóleos mostraron un mayor índice ORAC-FL que los EEGs provenientes de propóleos de otras localidades de la RM estudiados previamente en el laboratorio, los que fluctuaron entre los 6,7 y 14,5 μ moles eq trolox/mg ES (Castro et al., 2014).

Los valores ORAC-FL están relacionados a un factor estequiométrico entre los agentes antioxidantes y los radicales que se generan por la descomposición del AAPH, indicando que para este estudio el EEG del PPe posee compuestos con mayor capacidad de neutralizar estos radicales. Además se ha determinado que el mecanismo de neutralización subyacente en esta metodología es del tipo HAT (*Hydrogen Atom Transfer*), es decir que el apagamiento de los radicales ocurre producto de que las moléculas antioxidantes son capaces de transferir un átomo de hidrógeno, de esta manera se genera un nuevo radical a partir de los compuestos antioxidantes con baja o nula actividad oxidante debido a la capacidad de estos últimos de deslocalizar el electrón desapareado (Alarcón et al. 2008; Ou et al., 2001).

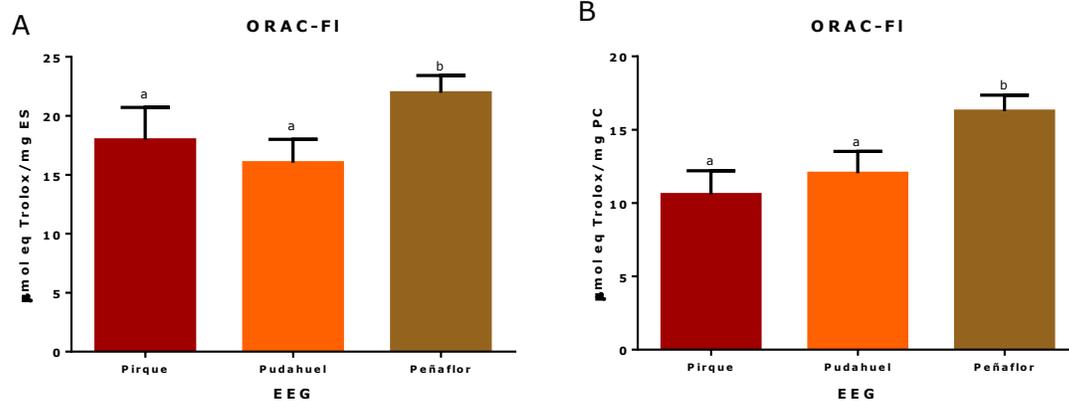


Figura 30: Índice ORAC-FL para los extractos etanólicos globales (EEGs) de propóleo.

Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar (N=3). Las letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey. ES: Extracto seco y PC: propóleo crudo.

Pese a que se creía que la metodología de ORAC-FL reflejaba principalmente el apagamiento de los radicales peroxilos (ROO^{\bullet}) recientemente se ha determinado que, bajo ciertas condiciones como la concentración, el tipo y la capacidad neutralizadora de los agentes antioxidantes, la metodología podría reflejar el apagamiento tanto del radical peroxilo como alcoxilo (RO^{\bullet}). Sin embargo, esta metodología se ha seguido utilizando puesto que es una metodología sencilla, económica y que permite comparar distintos tipos de muestras, ya sea aisladas o complejas, siempre y cuando se tenga presente este antecedente y de que la capacidad antioxidante no se puede determinar con solo un ensayo, por lo que siempre se recomienda la evaluación de la capacidad antioxidante con distintos ensayos que complementen los resultados dado que la actividad antioxidante se presenta por distintos mecanismos (Dorta et al., 2015).

7.1.2. ORAC-Rojo de pirogalol (ORAC-PGR)

Los perfiles de decaimiento de la absorbancia en función de la concentración de EEG y las regresiones lineales de las concentraciones vs ABC_{neta} se muestran en el Anexo 6. Los valores del índice ORAC-PGR se observan en la Figura 31-A y 31-



B expresados como $\mu\text{mol eq trolox/mg ES}$ y $\mu\text{mol eq trolox/mg PC}$, respectivamente y se resumen en la Tabla 13. Los tres EEGs mostraron valores mayores que trolox, lo que indica una reactividad frente a radicales libres del oxígeno de los EEGs al menos el doble que la del compuesto de referencia en base a ES. El EEG del PPI mostró el mayor valor con $2,8 \pm 0,3 \mu\text{moles eq trolox/mg ES}$. Sin embargo, al evaluarlos en base a PC, ningún EEG mostro diferencias estadísticamente significativas (Figura 31). Todos los propóleos mostraron índices ORAC-PGR mayores que los EEGs provenientes de propóleos de otras localidades de la RM estudiados previamente en el laboratorio, los que fluctuaron entre los 0,2 y 1,2 $\mu\text{moles eq trolox/mg ES}$ (Castro et al., 2014).

Bajo las condiciones en las que se efectuaron las mediciones de ORAC-PGR, se ha demostrado que el radical de oxígeno presente en mayor proporción es el radical peroxilo, a diferencia del ensayo ORAC-FL, lo que permite mejores determinaciones de capacidad antioxidante frente a un tipo de radical, sin embargo la diferencia sustancial entre estas dos metodologías como se mencionó previamente es que los valores del índice ORAC-FL contienen un factor estequiométrico de neutralización de los radicales peroxilos y alcoxilos con los protones lábiles del antioxidante, observadas como etapas de baja velocidad de reacción inicial (etapa de inducción), mientras que los valores ORAC-PGR miden principalmente la reactividad de los compuestos antioxidantes que compiten con la sonda frente a los radicales peroxilos, observándose ausencia de esta etapa y un rápido decaimiento (Dorta et al., 2017; Dorta et al., 2015; López-Alarcón & Lissi, 2006).

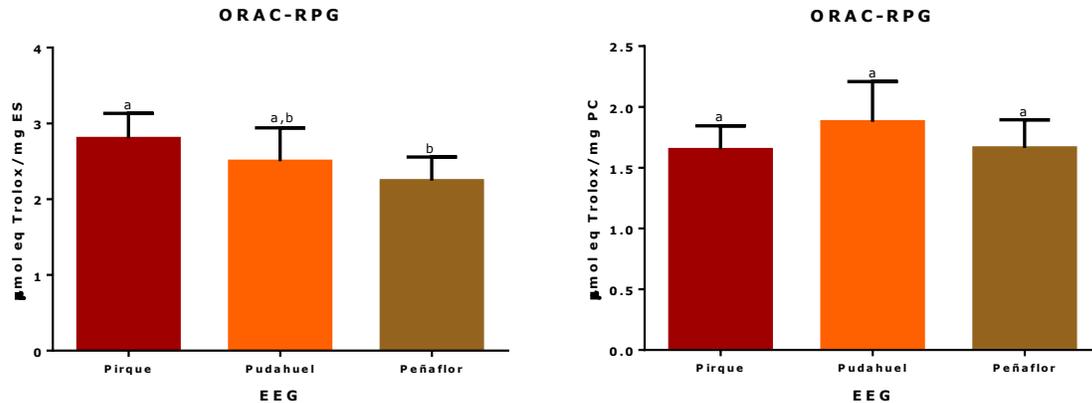


Figura 31: Índice ORAC-RPG para extractos etanolicos globales (EEGs) de propóleo.

Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar (N=3). Las letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey. ES: Extracto seco y PC: propóleo crudo.

Bridi et al. (2015), proponen los valores ORAC como control de calidad de propóleos, para ello evaluaron muestras de la Región del Libertador Bernardo O'Higgins. Las 6 muestras de propóleo evaluadas mostraron valores ORAC-FI menores a las aquí estudiadas, fluctuando entre $0,2 \pm 0,1$ y $2,3 \pm 0,1$ $\mu\text{mol Eq trolox/ mg PC}$, mientras que para valores ORAC-PGR fluctuaron entre $0,4 \pm 0,1$ y $4,1 \pm 0,2$ $\mu\text{mol Eq trolox/ mg PC}$, obteniendo valores más altos que los aquí estudiados, sin embargo, ellos realizan una relación entre ambos valores que determinaría la proporción de compuestos antioxidantes que protegen a la sonda PGR versus las que protegen la sonda FL. Los valores ORAC-PGR/ORAC-FL obtenidos con los EEGs de las muestras de propóleo de Pirque, Pudahuel y Peñaflores se resumen en la Tabla 13 y dan cuenta de que los compuestos capaces de neutralizar radicales libres por la metodología ORAC-PGR corresponderían a alrededor del 16% para los PPI y PPU y del 10% para el PPE, de los compuestos capaces de neutralizar radicales por metodología ORAC-FL, alejándose notoriamente de los propóleos evaluados por Bridi et al. (2015) cuyos valores ORAC-PGR/ORAC-FL se mueven entre el 11 y 56%.



Tabla 13: Índice ORAC-FI y ORAC-PGR de los EEGs de los propóleos de Pirque, Pudahuel y Peñaflo

EEG	ORAC-FI		ORAC-PGR		$\frac{\text{ORAC} - \text{PGR}}{\text{ORAC} - \text{FL}}$
	ET/mg ES	ET/mg PC	ET/mg ES	ET/mg PC	
Pirque	18,0 ± 2,7 ^a	10,6 ± 1,6 ^a	2,8 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,2 ^a	0,16
Pudahuel	16,0 ± 2,0 ^a	12,0 ± 1,5 ^a	2,5 ± 0,4 ^{a,b}	1,9 ± 0,3 ^a	0,16
Peñaflo	22,0 ± 1,5 ^b	16,3 ± 1,1 ^a	2,2 ± 0,3 ^b	1,7 ± 0,2 ^b	0,10

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar (N=3). Las letras iguales por columna, sobre los valores indican que no existen diferencias estadísticamente significativas por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey. ET: $\mu\text{mol eq trolox}$, ES: extracto seco y PC: propóleo crudo.

7.1.3. ORAC-Resonancia paramagnética de electrón

En la tabla 14 se resumen los valores ORAC-EPR obtenido al interpolar en la curva de calibración realizada con trolox entre las concentraciones 0,01 mM y 0,1 mM que se muestra en la Figura 32.

Tabla 14: Valores ORAC-EPR de los EEGs.

EEG	ORAC-EPR	
	ET/mg ES	ET/mg PC
Pirque	0,03 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,02 ^a
Pudahuel	0,65 ± 0,40 ^b	0,49 ± 0,30 ^b
Peñaflo	0,14 ± 0,06 ^{a,b}	0,10 ± 0,45 ^{a,b}

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar (N=3). Las letras iguales por columna, sobre los valores indican que no existen diferencias estadísticamente significativas por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey. ET: $\mu\text{mol eq trolox}$, ES: extracto seco y PC: propóleo crudo.

De acuerdo con estos resultados el EEG del PPU tiene mayor actividad neutralizadora de los radicales alcoxilos con $0,65 \pm 0,40 \mu\text{mol eq trolox/mg ES}$, sin embargo, no logra diferenciarse estadísticamente del EEG del PPE ($0,14 \pm 0,06 \mu\text{mol eq trolox/mg ES}$). Los resultados implican que tanto el EEG del PPU como del PPE tienen compuestos con la reactividad suficiente para atrapar los radicales alcoxilo, que tienen una vida media del orden de los microsegundos, observándose

una disminución en la intensidad de aparición de la señal del aducto formado por el atrapador de *spin* (DMPO) con el radical alcoxilo.

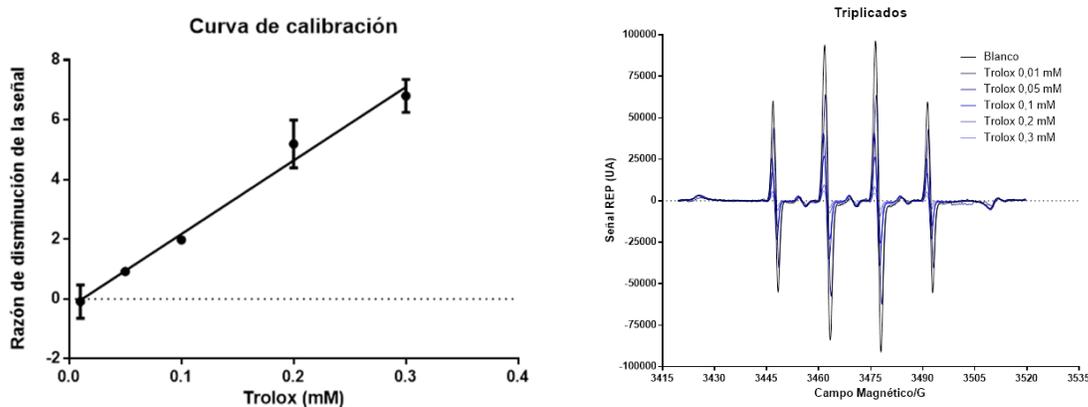


Figura 32: curva de calibración con trolox

Curva de calibración obtenida por normalización de la señal en el tercer pico de la señal REP (3474 a 3477 CM/G). (B) Señal del aducto [DMPO-OR]^{*} y su disminución al aumentar la concentración de trolox.

Como lo describe Mura (2016), se espera que los extractos que tienen valores ORAC-FL mayores, tengan valores ORAC-EPR menores, debido a que la baja reactividad frente a los radicales alcoxilos permite que permanezcan más tiempo protegiendo a la sonda fluorescente, observándose las etapas de velocidad lenta inicial o etapas de inducción en el ensayo de ORAC-FL.

7.2. Capacidad reductora del ion férrico (FRAP)

Las curvas de absorbancia versus tiempo y los valores FRAP se presentan en la Figura 32 y se resumen en la Tabla 15. A los 4 min el EEG del PPe exhibe el mayor valor FRAP con $1,30 \pm 0,05$ μmol equivalentes de Fe^{2+} por mg de extracto seco ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg ES}$) sin diferencias estadísticamente significativa con el EEG del PPu, a los 30 min el EEG del PPu presentó el mayor valor FRAP con $1,97 \pm 0,10$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg ES}$, sin diferencias estadísticamente significativa con el EGG del PPe, mientras que a 60 min los valores FRAP no presentan diferencias estadísticamente

significativas siendo el EEG del PPe el que mostró el mayor valor FRAP de $2,3 \pm 0,1 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg ES}$.

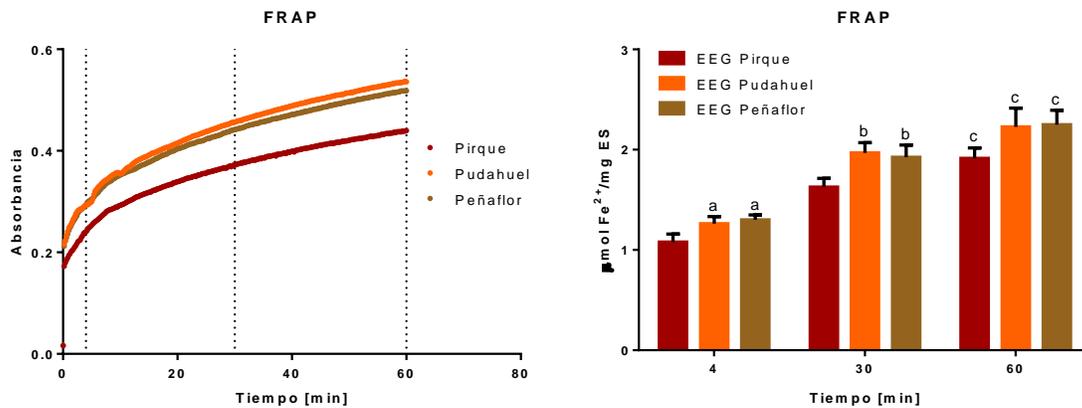


Figura 33: Valores FRAP de los EEGs

Las letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los EEGs por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey.

Los valores FRAP aquí observados son levemente mayores a los EEG de otros propóleos de la RM evaluados por Castro et al. (2014) exceptuando al EEG del propóleo de Buin, los cuales presentaron valores entre $1,7 \pm 0,1$ y $3,2 \pm 0,0 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg ES}$.

Tabla 15: Valor FRAP de los EEGs de los propóleos de Pirque, Pudahuel y Peñafior

FRAP			
	4 min	30 min	60 min
Pirque	1,07 ± 0,08	1,63 ± 0,09	1,9 ± 0,1 ^a
Pudahuel	1,26 ± 0,07 ^a	1,97 ± 0,10 ^a	2,2 ± 0,2 ^a
Peñafior	1,30 ± 0,05 ^a	1,93 ± 0,12 ^a	2,3 ± 0,1 ^a

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar (N=3). Expresados en $\mu\text{moles de Fe}^{2+}/\text{mg}$ de extracto seco. Las letras iguales por columna, sobre los valores indican que no existen diferencias estadísticamente significativas por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, los EEGs de los propóleos aquí estudiados poseen capacidades antioxidantes significativas comparadas con trolox en la neutralización de radicales del oxígeno, pero también como agentes reductores. Con las metodologías de ORAC-FL y ORAC-PGR no se logra definir cual de los extractos podría considerarse mejor en términos de capacidad



antioxidante, puesto que los valores son muy similares. Por el contrario, la metodología del ORAC-EPR permite apreciar diferencias en la capacidad neutralizadora de los EEGs frente al radical alcoxilo de forma más sensible y específica y nos permite excluir al EEG del PPI debido a su baja reactividad. Si bien el EEG del PPU obtuvo el mayor valor ORAC-EPR, aludiendo a una alta reactividad, no mostró diferencias estadísticamente significativas con el EEG del PPE y este último, además, mostró el mejor valor ORAC-FL.

No se encontraron correlaciones importantes entre el CFF y el CFD con estas actividades, sin embargo, existe una correlación entre los valores ORAC-EPR y el CFT ($R^2 = 0,9988$, $p = 0,0220$). Esta relación es inversa ($r = -0,9994$), es decir, en la medida que aumenta el CFT, el valor ORAC-EPR tiende a disminuir gradualmente, esto podría ser explicado por una sobrevaloración en el contenido de fenoles totales, como se ha mencionado previamente con compuestos reductores que no necesariamente tengan una buena actividad neutralizadora de radicales del oxígeno, como azúcares reductores o metales que promuevan la oxidación. Si bien estudios previos realizados en nuestros laboratorios han demostrado que los azúcares presentes son bajos y tienen un impacto muy bajo sobre el método de Folin-Ciocalteu para propóleos de otras localidades y años de recolección, son necesarios más estudios con los propóleos actualmente evaluados para corroborar estas observaciones. Un estudio realizado con extractos hidroalcohólicos de propóleo de Eslovenia, mostró un aumento en la oxidación de compuestos de la fracción más polar del extracto, los autores responsabilizan de este fenómeno a compuestos fenólicos poco estables en los medios de reacción que favorecen la oxidación de compuestos (Petelinc et al, 2013). Esto podría también explicar en parte la correlación negativa que pueden tener las muestras de propóleos entre los ensayos antes mencionados.

Por otra parte, existe una relación positiva ($r = 0,9997$) entre el valor FRAP a los 30 min y el CFT, es decir, a medida que aumenta el CFT, se observan mejores valores FRAP y por ende poder reductor ($R^2 = 0,9994$ y $p = 0,0157$). Sin embargo, esta



correlación no se observa en valores FRAP en otros tiempos, lo que se podría explicar por la composición variable y compleja de los propóleos.

8. Fraccionamiento por cromatografía en columna

Debido a los resultados obtenidos en los controles de calidad, actividades inhibitorias de la α -glucosidasa y de la GP_a, además de las actividades antioxidantes de los EEGs, se seleccionó el EEG del PPe para continuar con el fraccionamiento con el objetivo de purificar los componentes activos, para posteriormente evaluar las actividades inhibitorias frente a enzimas del control glicémico, así como la cuantificación y análisis de masa de la fracción seleccionada.

A partir del fraccionamiento por cromatografía en columna y la elución de solventes de polaridad creciente y mezclas de ellos (Figura 33), se obtuvo un total de 26 fracciones (F1-F26), las que fueron analizadas mediante CCF para reconocer perfiles fenólicos con ayuda del revelador NP/PEG, con el fin de agrupar las fracciones que tuvieran un patrón de bandas similares (Anexo 7).

Del análisis anterior y la agrupación de fracciones se obtuvo un total de nueve fracciones hijas (FA-FI) cuyos rendimientos se resumen en la Tabla 16. En la Figura 34 se observan los cromatofolios a 254 nm (Figura 34-A) y 365 nm con ocho fracciones hijas después de realizada la separación con una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético en una proporción de 60:40:1 (Figura 34-B) y de revelar con NP/PEG (Figura 34-C). Adicionalmente se sembraron nueve patrones que incluían: rutina, ácido gálico, quercetina, galangina, crisina, naringenina, canferol, ácido cafeico y apigenina.

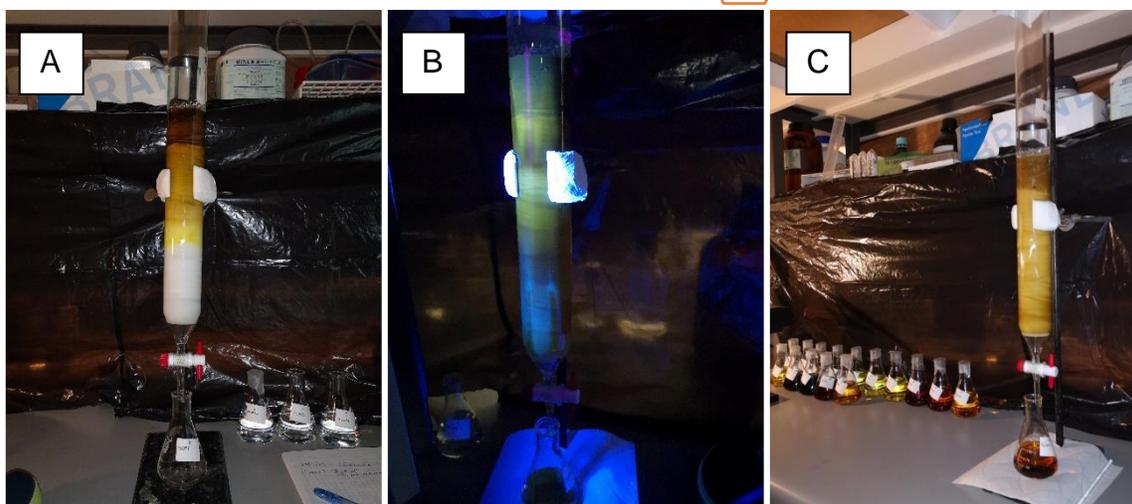


Figura 34: Cromatografía en columna del extracto etanólico global del propóleo de Peñaflo.

A. Inicio de la cromatografía en columna con elución de hexano. B. Elución bajo lámpara UV a 365 nm. C. Fracciones obtenidas por elución de distintos solventes de polaridad creciente y sus mezclas.

Tabla 16: Fracciones del EEG de PPe y sus rendimientos.

Fracciones agrupadas	Fracción hija	Masa (g)	Rendimiento (%)
F1 – F4	FA	0,1163	0,6
F5	FB	0,8906	4,5
F6 – F7	FC	5,9226	29,6
F8 – F12	FD	12,3099	61,5
F13 – F17	FE	1,2158	3,7
F18	FF	0,0243	0,1
F19 – F22	FG	0,0819	0,4
F23	FH	0,1242	0,6
F24 – F26	FI	0,1365	0,7

EEG: extracto etanólico global y PPe: propóleo de Peñaflo

La fracción FD es la única fracción que muestra bandas anaranjadas, pudiendo ser derivados de quercetina, basado en la coloración del patrón. Por otra parte, las fracciones FB y FC se caracterizan por poseer compuestos de mediana polaridad a apolares, que avanzan con la mezcla de solvente observándose bandas con R_f sobre los 0,5. Las fracciones FE a FI presentan bandas celestes que no avanzan de la línea de siembra, dando a entender que se trata de compuestos polares afines a la fase estacionaria (gel de sílice).



Las fracciones obtenidas fueron sometidas a los ensayos de inhibición enzimática previamente descritos, para tales efectos se prepararon soluciones de las fracciones FB a FI a la misma concentración a la cual el EEG padre inhibe el 50% de la actividad enzimática (CI_{50}), por lo tanto, para el ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa se utilizó la concentración de 7,65 $\mu\text{g/mL}$ y para el de la enzima glicógeno fosforilasa a, de 11,2 $\mu\text{g/mL}$. La Figura 35 muestra los resultados de inhibición para ambas enzimas por parte de las fracciones hijas y se resumen en la Tabla 17.

En el ensayo de inhibición de α -glucosidasa las fracciones FD, FE, FF y FG superaron el 50% de inhibición además de no mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellas. La fracción que mayor porcentaje de inhibición presentó con un $69,6 \pm 5,5 \%$ fue FE. Que cuatro fracciones hayan superado el porcentaje de inhibición del EEG padre, puede implicar dos fenómenos interesantes: i) que el compuesto inhibidor puede estar presente en las cuatro fracciones y que pequeñas cantidades sean suficiente para inhibir la enzima o ii) que los compuestos presentes en las fracciones compitan por la inhibición de la enzima (antagonismo farmacológico) de tal forma que cuando actúan en conjunto estas fracciones, como lo que ocurre con el EEG padre, no se observa un aumento superior al 50% de la inhibición (sinergismo farmacológico).

Por otra parte, en el ensayo de inhibición de GP_a, ninguna de las fracciones fue capaz de alcanzar o superar el 50% de inhibición. La fracción que presentó mayor porcentaje de inhibición fue la FD, con un $22,1 \pm 6,5 \%$ y no mostró diferencias significativas con las fracciones FB y FG. Las fracciones FC, FH y FI, muestran valores negativos que se presentan debido a fluctuaciones propia de la metodología al presentar valores tan bajos o nulos de inhibición enzimática. En este caso y a diferencia de lo que ocurre con la inhibición de α -glucosidasa, los compuestos en las fracciones parecen tener mayor actividad en conjunto que separados, observándose un posible sinergismo en el efecto del EEG padre.

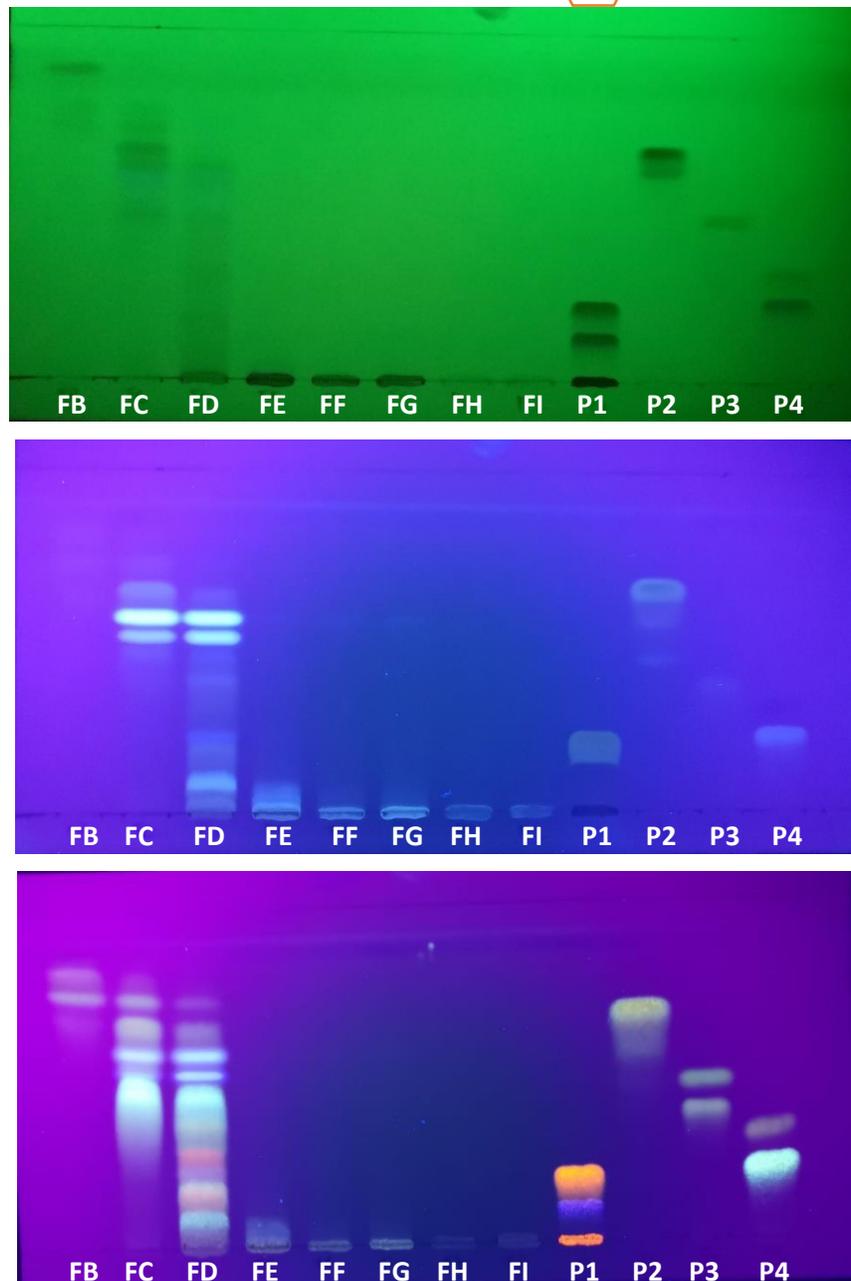


Figura 35: Cromatografía en capa fina de las fracciones hijas del EEG de PPe. Cromatofolio de gel de sílice, fase móvil: hexano, acetato de etilo y ác. Acético (60:40:1) a (A) 254 nm, (B) 365 nm y (C) 365 nm con NP/PEG. FA-I: fracciones; P1: rutina, ácido gálico y quercetina; P2: galangina y crisina; P3: naringenina y canferol; P4: ácido cafeico y apigenina. EEG: extracto etanólico global, PPe: propóleo de Peñaflo, NP: *Natural product* y PEG: pelietilenglicol.

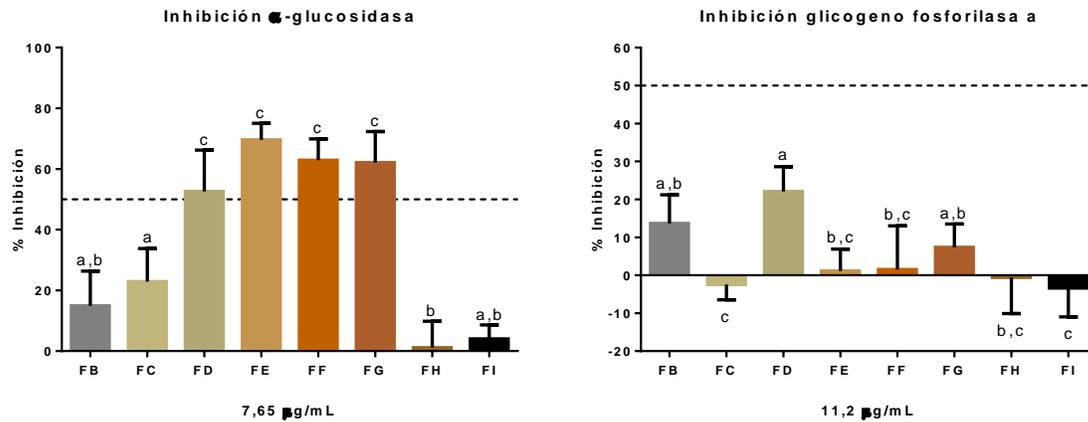


Figura 36: Ensayos de inhibición enzimáticas de las fracciones hijas del EEG de PPe.

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar (N=3). Las letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las fracciones por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey.

Tabla 17: Porcentajes de inhibición de las fracciones hijas del EEG de PPe

Facción	IAG [%]	IGPa [%]
FA	n.d.	n.d.
FB	14,9 ± 11,4 ^{a,b}	13,7 ± 7,5 ^{a,b}
FC	22,9 ± 10,9 ^a	-2,4 ± 4,0 ^c
FD	52,6 ± 13,6^c	22,1 ± 6,5^a
FE	69,6 ± 5,5 ^c	1,1 ± 5,7 ^{b,c}
FF	62,9 ± 7,0 ^c	1,5 ± 11,5 ^{b,c}
FG	62,1 ± 10,2 ^c	7,4 ± 6,2 ^{a,b}
FH	1,14 ± 8,7 ^b	-0,6 ± 9,5 ^{b,c}
FI	4,0 ± 4,6 ^{a,b}	-3,4 ± 7,6 ^c

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar (N=3). Las letras iguales por columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las fracciones por ANOVA y *test* de comparaciones múltiples de Tukey. IAG: inhibición de α-glucosidasa, IGPa: inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a, n.d.: no determinado, EEG: extracto etanólico global y PPe: propóleo de Peñaflo.

Comparando los resultados obtenidos en ambos ensayos de inhibición, la fracción FD parece ser la de mayor capacidad inhibitoria, por ser la mejor fracción en inhibir la GPa y por lograr inhibir más del 50% de la actividad de la α-glucosidasa, por esta razón es que es seleccionada para continuar con la caracterización y estandarización en base a distintos polifenoles que pudiesen estar presente en la muestra.



Se compararon los perfiles fenólicos de los resultados por CCF y un método optimizado por CLAE-DAD descrito por Zhang et al. (2016) de los tres extractos etanolicos globales y la fracción seleccionada; y adicionalmente se contrastaron con 12 patrones de flavonoides y ácidos fenólicos. La Figura 36 muestra los cromatofolios de los tres EEG más la fracción hija FD del EEG de PPe bajo luz UV de 254 nm (Figura 36-A), a 365 nm (Figura 36-B) y a 365 nm con revelador NP/PEG (Figura 36-C), mientras que en la figura 37 se observan los cromatogramas de las cuatro muestras a 280 nm, contrastadas con la solución patrón con 12 compuestos.

De acuerdo con el análisis realizado a los cromatofolios comparando los R_f y colores de bandas de los patrones frente a las bandas observadas en los EEG de PPI, PPU, PPe y la fracción FD del EEG de PPe, se puede establecer a priori la presencia de quercetina, ácido cafeico, canferol, apigenina, galangina, naringenina, crisina, pinosembrina y CAPE. Los R_f y los colores de las bandas se resumen en la Tabla 18. La naringenina que presentó un R_f de 0,45 parecía estar presente pero la coloración era interferida por bandas verdes con R_f mayor en todas las muestras.

Por otra parte, en el análisis realizado a los cromatogramas a 270 nm de los EEG de PPI, PPU, PPe y FD de PPe con los picos de los patrones mediante el R_t y los espectros UV-Vis entre 200 y 500 nm (Anexo 8), se pudo establecer en todas las muestras la presencia de nueve de los 12 compuestos que incluyen: ácido cafeico, quercetina, naringenina, canferol, apigenina, pinocembrina, crisina, feniletil éster del ácido cafeico (CAPE), y galangina, confirmándose lo observado en el análisis por CCF y confirmando también, la presencia de naringenina. Los valores de los R_t y las abundancias relativas de los compuestos se resumen en la tabla 18. Las abundancias relativas se calcularon en base al área total más grande, que en este caso corresponde a la del EEG de PPI. Los compuestos fenólicos más abundantes en los tres EEGs seleccionados fueron, en orden decreciente: pinocembrina, crisina, naringenina y galangina; mientras que en la FD del EEG del PPe el orden decreciente fue: crisina, pinocembrina, naringenina y galangina.

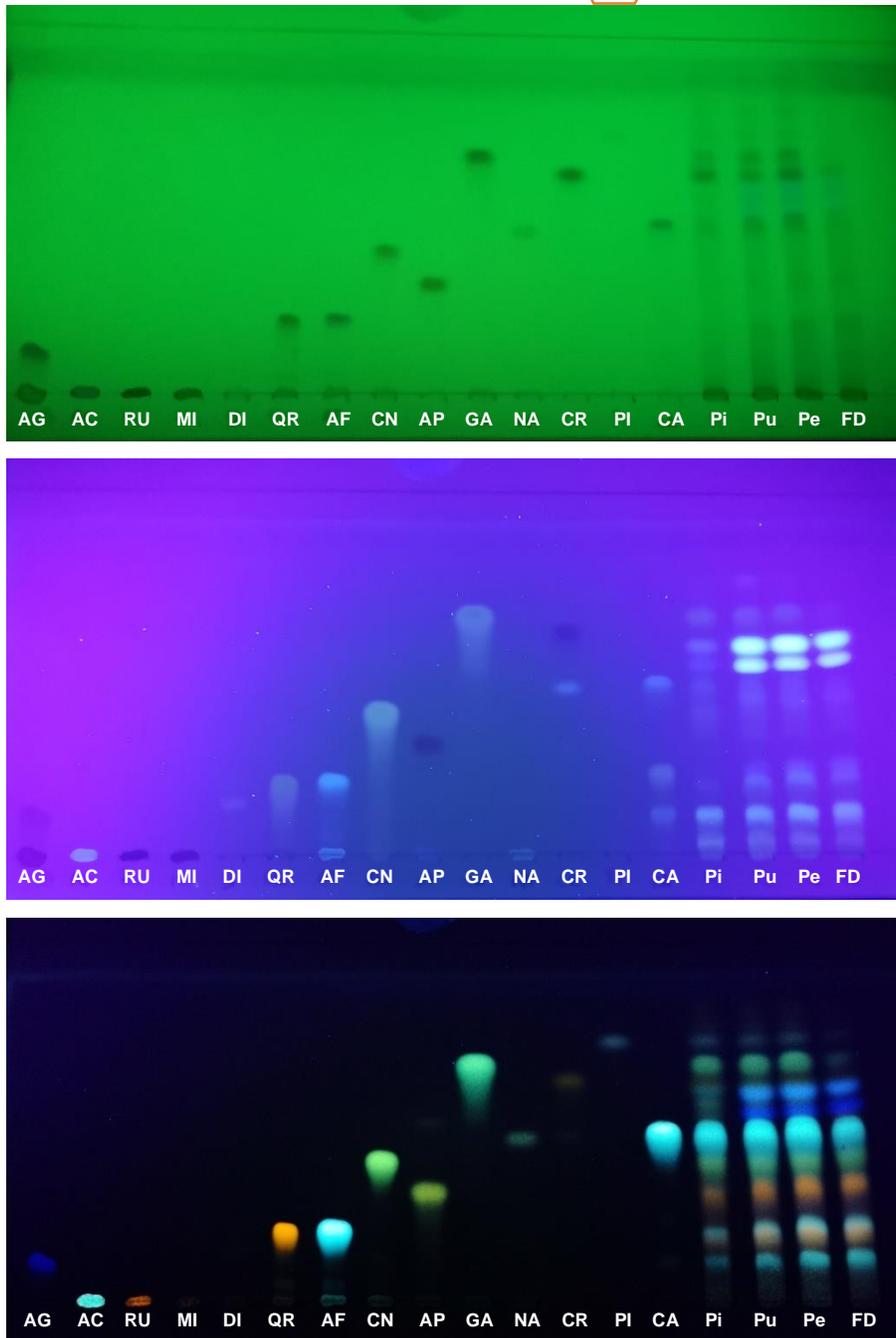


Figura 37: Cromatografía en capa fina de los EEGs seleccionado y la fracción hija del EEG de PPe.

Cromatofolio de gel de sílice, fase móvil: hexano, acetato de etilo y ác. Acético (60:40:1) a (A) 254 nm, (B) 365 nm y (C) 365 nm con NP/PEG. AG: ácido gálico, AC: ácido clorogénico, RU: rutina, MI: miricitrina, DI: diosmina, QR: quercetina, AF: ácido cafeico, CN: canferol, AP: apigenina, GA: galangina, NA: naringenina, CR: crisina, PI: pinosembrina, CA: CAPE. CAPE: feniletíl éster del ácido cafeico, EEG: extracto etanólico global, PPe: propóleo de Peñaflo, NP: *Natural product* y PEG: pelietilenglicol.

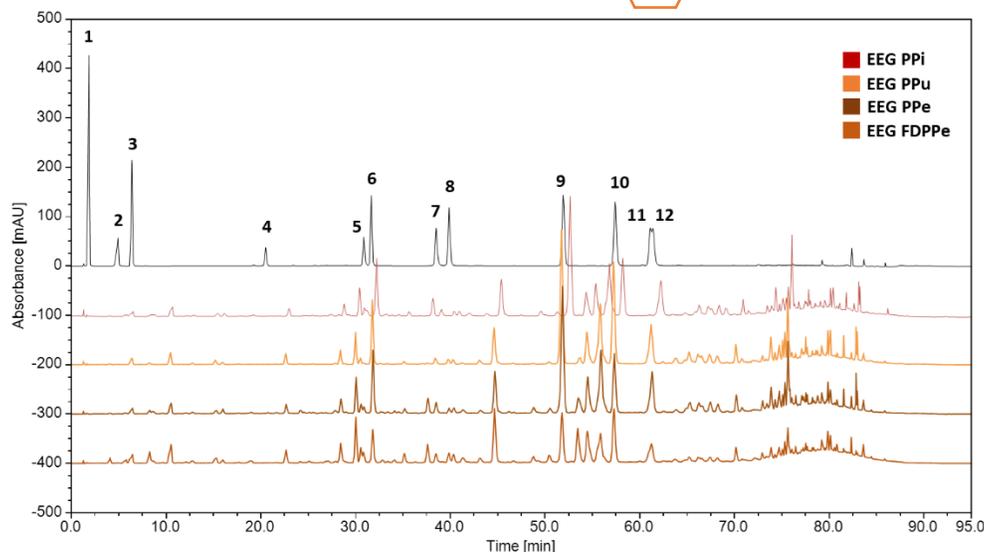


Figura 38: Cromatogramas de los EEGs de los propóleos, fracción hija seleccionada y patrones a 270 nm.

EEG: extracto etanólico global, PPI: propoleo de Pirque, PPU: propóleo de Pudahuel, PPE: propóleo de Peñaflo, FDPPE: fracción D del PPE. Patrones: 1: ácido gálico, 2: ácido clorogénico, 3: ácido cafeico, 4: rutina, 5: quercetina, 6: naringenina, 7: canferol, 8: apigenina, 9: pinocembrina, 10: crisina, 11: feniletil éster del ácido cafeico (CAPE), y 12: galangina.

Tabla 18: Caracterización por CCF y cuantificación relativa por CLAE-DAD de patrones.

Compuesto	CCF		R _t [min]	CLAE-DAD			
	R _f	Color		Abundancia relativa EEG [%]			
				PPI ^a	PPU	PPE	FDPPE
Ácido gálico	0,10	Azul	1,853	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido clorogénico	0,00	Celeste	4,917	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido cafeico	0,19	Celeste	6,377	1,6	0,7	0,4	1,2
Rutina	0,00	Anaranjado	20,507	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Miricitrina	0,00	Anaranjado	-	-	-	-	-
Diosmina	0,00	Amarillo	-	-	-	-	-
Quercetina	0,19	Anaranjado	30,867	0,1	1,1	1,2	2,0
Naringenina	0,45	Verde	31,660	13,0	13,3	12,8	7,4
Canferol	0,38	Verde	38,497	1,4	2,1	1,5	2,1
Apigenina	0,29	Verde	39,867	1,1	0,9	1,0	2,0
Pinocembrina	0,71	Violeta	51,927	39,6	39,0	36,0	14,9
Crisina	0,60	Café	57,410	30,3	17,9	17,8	16,3
CAPE	0,46	Celeste	61,190	1,8	2,1	1,6	2,2
Galangina	0,65	Verde	61,403	11,2	11,9	10,8	6,4

CCF: cromatografía en capa fina, CLAE-DAD: cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un detector de arreglo de diodo, R_f: factor de retardo, R_t: tiempo de retención en minutos, n.d.: no detectado, PPI: propóleo de Pirque, PPU: propóleo de Pudahuel, PPE: propóleo de Peñaflo, FDPPE: Fracción D del PPE y EEG: extracto etanólico global. En negrita se resaltan los porcentajes más altos para cada compuesto.



9. Análisis de masa

9.1. Cuantificación de compuestos fenólicos

Para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos presentes en los EEGs de los propóleos seleccionados y de una de las fracciones obtenidas desde el EEG del PPe, fracción seleccionada porque inhibió la actividad tanto de la α -glucosidasa como de la GP_a, se procedió con el análisis de masa y la cuantificación de los compuestos fenólicos mediante la construcción de curvas de calibración con patrones específicos.

Un total de 23 compuestos fueron evaluados por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masa triple cuadrupolo. De los 23 compuestos 16 pudieron ser cuantificados interpolando el área bajo la curva del pico en la curva de calibración del compuesto de referencia (Anexo 9). Para determinar la presencia del compuesto se evaluó el R_t y los fragmentos del compuesto contrastado con el patrón. Los siete compuestos restantes solo pudieron ser identificados utilizando el mismo criterio (Tabla 19).

Comparando los resultados obtenidos entre los tres EEGs seleccionado para los estudios de inhibición, se logró determinar diferencias cuali- y cuantitativas. De los compuestos analizados la isorhamnetina fue la más abundante alcanzando el 1,164%, 0,960% y 0,492% p/p para los EEG del PPe, PPI y PPU, respectivamente; le sigue el canferol como segundo compuesto más abundante con 0,485%, 0,443% y 0,294% para los EEG del PPe, PPI y PPU, respectivamente. Cabe destacar que, al correlacionar las actividades inhibitorias frente a enzimas del control glicémico y la capacidad antioxidante con los compuestos cuantificados, la isorhamnetina y el canferol fueron los únicos con una correlación negativa ($r = -0,9986$) significativa frente a la inhibición de la α -glucosidasa (Figura 38-A), es decir que, que a medida que aumenta la concentración de estos compuestos en los EEGs, estos presentan menor CI_{50} o, dicho de otra forma, mayor potencia. Sin embargo, producto del fraccionamiento del EEG del PPe, la isorhamnetina no se encuentra presente en la fracción FD, descartando al compuesto como el principal responsable de la actividad inhibitoria. Por su parte, el canferol se mantiene en la FD del EEG del PPe, sin



embargo, su concentración disminuye producto del fraccionamiento (0,291%) aunque de igual forma podría contribuir a la actividad inhibitoria de la fracción. Cabe destacar que los compuestos más abundantes, así como los que se concentraron en la fracción FD (ácido, ferúlico, ácido cafeico, ácido cumárico, quercetina, apigenina y taxifolina) tienen actividad reportada frente a la α -glucosidasa (Hyun et al., 2014; Nurul Islam et al., 2013; Li et al., 2009; Xiao et al., 2013; Yin et al., 2014).

La rutina, el 3-O-ramnoglucosido de quercetina, presentó concentraciones muy bajas que no fueron capaces de ser percibidas por las técnicas cromatográficas previas, sin embargo, bajo el mismo análisis de correlación fue el único compuesto que presentó una correlación significativa con la inhibición de la enzima GPa (Figura 38-B). Además de encontrarse en baja cantidad en los EEGs, este heterósido de flavonol, no se encuentra presente en la FD del EEG del PPe, lo que se podría relacionar con la baja actividad inhibitoria de la fracción frente a la misma enzima. Nuevamente cabe destacar que de los compuestos que se concentraron en la fracción FD, solo los del tipo flavonoide tienen actividad inhibitoria reportada (Ablat et al., 2014; Kato et al., 2008), lo que también podría contribuir en la disminución de la actividad inhibitoria de la fracción FD en comparación al EEG.

La taxifolina, un flavanonol presente en los EEGs, fue el único con una correlación significativamente frente a los valores FRAP obtenidos a los 30 min (Figura 38-C), pudiendo contribuir a esta capacidad reductora.



Tabla 19: Compuestos identificados y cuantificados por LC-ESI-MS/MS.

Compuesto	R _t [min]	[M-H] ⁻ m/z	Fragmentos m/z ₁ / m/z ₂	g/100 g ES [% p/p]			
				PPi	PPu	PPe	FDPPe
Ácido gálico	0,80	168,9	124,9 / 78,9	n.d.	n.d.	0,002	0,002
Ácido ferúlico	5,90	192,9	134,0 / 177,9	0,073	0,048	0,076	0,107
Ácido clorogénico	3,83	353,1	191,0 / 85,0	0,003	0,009	0,041	0,003
Ácido sinápico	5,97	223,0	207,9 / 148,8	n.d.	0,004	0,006	0,004
Ácido cafeico	4,03	178,9	135,0 / 133,9	0,136	0,080	0,145	0,202
Ácido cumárico	5,20	162,9	119,0 / 92,8	0,099	0,057	0,127	0,164
Ácido 3-hidroxibenzoico	6,32	137,0	92,9 / 64,9	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.
Rutina	5,97	609,0	299,8 / 300,5	0,004	0,001	0,002	n.d.
Crisina	11,32	253,0	142,9 / 63,1	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Quercetina	8,36	301,0	150,9 / 178,8	0,098	0,064	0,115	0,315
Ácido abscísico	8,00	263,1	152,9 / 219,0	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Luteolina	8,59	285,0	133,0 / 150,9	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Ácido vanílico	12,91	166,8	122,9 / 151,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.
Canferol	9,52	285,0	184,9 / 116,9	0,443	0,294	0,485	0,291
Apigenina	9,41	269,0	117,0 / 150,9	0,177	0,056	0,269	1,486
Resveratrol	10,02	227,0	185,0 / 143,1	0,139	0,081	n.d.	n.d.
Miricetina	7,26	316,9	150,9 / 178,9	0,005	n.d.	n.d.	n.d.
Isorhamnetina	9,93	315,0	299,9 / 150,9	0,960	0,492	1,164	n.d.
Quercitrina	6,80	447,0	299,9 / 300,9	0,002	0,001	0,001	0,001
Ácido criptoclorogénico	3,64	353,0	173,0 / 178,9	0,004	0,001	0,006	0,002
Astilbina	10,75	448,9	150,9 / 285,0	n.c.	n.d.	n.d.	n.d.
Taxifolina	5,75	302,9	285,0 / 125,0	0,018	0,059	0,057	0,124
Ácido elágico	11,20	300,8	145,0 / 283,9	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Rt: tiempo de retención, ES: extracto etanólico global seco, PPi: propóleo de Pirque, PPU: propóleo de Pudahuel, PPe: Propóleo de Peñafior, FDPPe: Fracción D del PPe, n.d.: no detectado y n.c.: no cuantificado. Los valores en negrilla de la columna FDPPe corresponden a los compuestos que se concentraron producto del fraccionamiento.

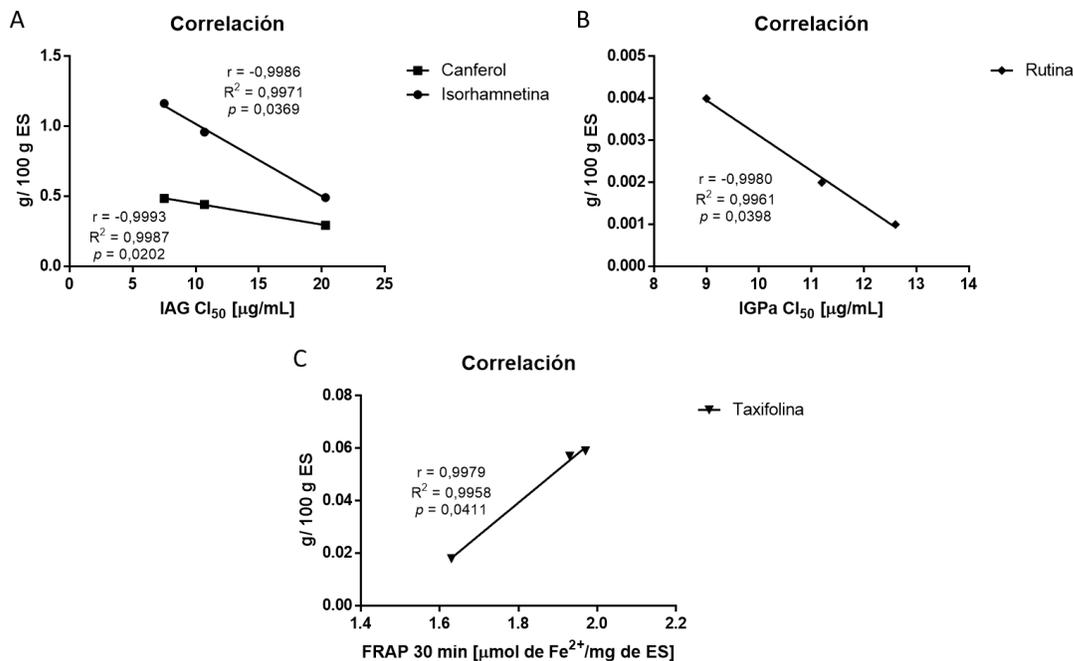


Figura 39: Correlación entre los compuestos cuantificados y actividades evaluadas.

IAG: inhibición de la α -glucosidasa, IGPa: Inhibición del glicógeno fosforilasa a, FRAP: Capacidad reductora del ion férrico, Cl₅₀: concentración inhibitoria del 50% de la actividad enzimática, ES: extracto etanólico global seco, r: coeficiente de correlación de Pearson y R²: coeficiente de determinación.

9.2. Análisis de identificación metabolómica

El análisis metabolómico realizado a los EEGs seleccionados y a la fracción D del EEG del PPe se llevó a cabo en modo positivo y modo negativo. Se cuantificaron de manera relativa los compuestos identificados mediante el área bajo la curva del pico que se relaciona directamente con la abundancia del metabolito en la muestra. La cuantificación se realizó tomando como referencia el área bajo la curva total de la fracción D del EEG del PPe, ya que fue el que mostro mayor área bajo la curva total.

La Tabla 20 muestra los 44 compuestos identificados por espectrometría de masas en modo positivo y la comparación con bases de datos mencionadas previamente, de los cuales 12 corresponden a flavonoles; cinco a flavonas, de las cuales una es un heterósido (*swertisin*); tres flavanonas; dos chalconas; tres isoflavonoides, de los



cuales dos son heterósidos (*ononin* y un hexósido de dihidroxiisoflavona); 10 cumarinas, donde sólo una se encuentra como heterósido (*scopolin*); siete ácidos fenólicos y 2 fenoles que no pueden ser clasificados en las familias anteriores.

El compuesto más abundante resultó ser la prenyletina (*prenyletin*), una cumarina presente en los EEGs del PPU (16,1 %) y PPE (17,6%), así como de la fracción FD (29,8%), mientras que la crisina (*chrysin*), una flavona, fue el compuesto más abundante en el EEG del PPI (20,2%). Cabe destacar que la crisina fue el compuesto con segunda mayor abundancia en el EEG del PPU (14,1%) y en la fracción FD (19,0%), mientras que la tectocrisina (*Techtochrysin*), derivado metilado de la crisina, lo fue en los EEGs del PPI (16,8%) y del PPE (13,4%).

Tabla 20: Compuestos identificados y cuantificados de forma relativa por LC-ESI-MS/MS en modo positivo

R _t [min]	[M+H] ⁺ m/z	PM [g/mol]	Nombre del compuesto	Abundancia relativa [%] EEG			
				PPI	PPU	PPE	FDPPe
Flavonoides							
- Flavonoles							
4,76	287,05575	286,04847	<i>Fisetin</i> *	n.d.	0,09	0,11	0,22
5,40	301,07117	300,06393	<i>Isokaempferide</i>	0,44	0,46	0,35	0,65
5,62	303,05035	302,04308	<i>Quercetin</i> *	0,52	1,17	1,03	2,52
5,79	595,15816	594,15089	<i>6"-p-coumaroiltrifolin</i>	1,70	1,44	1,06	2,81
5,97	317,06592	316,05871	<i>3-O-Methylquercetin</i>	1,48	1,89	2,00	4,31
6,07	347,07661	346,06934	<i>Axillarín</i>	0,03	0,23	0,26	0,59
6,54	287,05523	286,04795	<i>Kaempferol</i>	1,89	1,64	1,38	2,50
6,73	317,06559	316,05832	<i>Isorhamnetin</i> *	0,72	0,60	0,52	1,32
7,21	361,09145	360,08418	<i>jaceidin</i>	n.d.	0,03	0,18	0,44
8,54	271,06047	270,05319	<i>Galangin</i> *	6,64	4,97	1,90	3,72
8,95	315,08651	314,07923	<i>Kumatakenin</i> *	1,71	0,87	0,68	0,96
9,14	345,09691	344,08963	<i>Pachypodol</i>	0,46	0,37	0,25	0,51
- Flavonas							
6,63	301,06866	300,06138	<i>Scutellarein 4'-methyl ether</i>	0,05	0,12	n.d.	0,22
8,27	255,06597	254,05870	<i>Chrysin</i>	20,21	14,12	13,09	18,95
10,41	447,14678	446,13951	<i>Sweetisin</i> *	0,14	0,11	0,07	0,09
10,57	269,08131	268,07416	<i>Techtochrysin</i> *	16,77	10,68	13,35	8,69
11,51	323,13000	322,12272	<i>Prenyl dihydroxyflavone</i> *	0,04	0,06	0,06	0,05
- Flavanonas							
4,53	273,07634	272,06906	<i>3',4',7-Trihydroxyflavanone</i>	0,04	0,34	0,35	0,79
5,38	289,07120	288,06393	<i>Eriodictyol</i>	0,02	0,12	0,12	0,26
5,79	287,09181	286,08438	<i>Sakuranetin</i> *	6,03	5,11	4,09	9,33
- Chalconas							
5,36	257,08130	256,07402	<i>Isoliquiritigenin</i>	0,01	0,09	0,09	0,21
9,99	273,11290	272,10562	<i>2',6'-Dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone</i>	0,08	0,07	0,08	0,02
- Isoflavonoides							
5,66	417,11821	416,11093	<i>Dihydroxyisoflavone O-hexoside</i> *	0,33	0,32	0,20	0,12
8,06	357,13347	356,12619	<i>Prenyl tetrahydroxyisoflavanone</i> *	0,03	0,23	0,09	0,14
8,92	431,14841	430,14114	<i>Ononin</i> *	0,09	0,05	0,03	0,15
Cumarinas							
3,34	193,04913	192,04185	<i>Scopoletin</i>	0,01	0,01	0,01	0,03
3,76	223,06105	222,05380	<i>Isofraxidin</i>	0,05	0,46	0,53	1,04
4,14	223,06074	222,05374	<i>Fraxidin</i>	0,02	0,19	0,19	0,38
5,85	161,05964 ^a	178,06297	<i>Mellein</i>	0,66	0,41	0,42	0,91
6,93	209,04457	208,03730	<i>Fraxetin</i> *	n.d.	0,23	0,16	0,36
7,17	355,11599	354,10872	<i>Scopolin</i> *	0,05	0,10	0,08	n.d.
7,29	247,09657	246,08929	<i>Prenyletin</i>	2,61	16,06	17,58	29,82
9,56	231,10212	230,09484	<i>7-Prenyloxycoumarin</i> *	0,01	0,10	0,12	0,06
10,66	245,11782	244,11054	<i>Osthole</i>	0,20	n.d.	0,58	0,58
10,83	179,03408	178,02681	<i>Esculetin</i>	n.d.	0,14	0,21	0,18
Ácidos fenólicos							
3,83	177,05469 ^a	194,05807	<i>Isoferulic acid</i>	0,99	0,46	0,54	1,09
5,02	191,07057 ^a	208,07387	<i>3,4-Dimethoxycinnamic acid</i>	2,67	1,60	1,40	3,10
5,10	531,14835	530,14076	<i>5-caffeoyl-4-feruloylquinic acid</i>	0,03	n.d.	0,00	0,04
5,81	545,16388	544,15625	<i>4,5-Diferuloylquinic acid</i>	n.d.	n.d.	0,05	0,06
9,30	165,05453	164,04726	<i>P-Coumaric acid</i>	1,18	0,66	0,66	0,46



9,41	195,06525	194,05798	<i>Ferulic acid*</i>	0,16	0,13	0,12	0,11
9,75	163,07532	162,06804	<i>Methyl trans-cinnamic acid</i>	0,2	0,2	0,2	0,2
Fenoles							
3,02	153,15501	152,04773	<i>Vainillin*</i>	0,1	0,2	0,1	0,9
8,69	521,21840	520,21112	<i>Cypellocarpin C</i>	n.d.	0,7	0,5	1,1

Los compuestos fueron identificados comparando con la base de datos MassBank of North America, salvo que se diga lo contrario. * compuesto identificado por la base de datos MS-DIAL ^aIon molecular [M-H₂O+H]⁺. R_t: tiempo de retención, PM: peso molecular, n.d.: no identificado, EEG: extracto etanólico global, PPI: propóleo de Pirque, PPU: propóleo de Pudahuel, PPE: propóleo de Pénaflo, FDPPE: fracción D del EEG del PPE.

La Tabla 21 muestra los 78 compuestos identificados por espectrometría de masas en modo negativo y la comparación con bases de datos. De estos 78 compuestos 47 corresponden a flavonoides siendo: 15 flavonoles, de los cuales seis son heterósidos, además, seis geninas ya fueron identificadas por el análisis en modo positivo; 13 flavonas, una de ellas como heterósido y de las geninas sólo una ya había sido identificada por el modo positivo; 10 flavanonas, de las cuales dos son heterósidos y sólo una genina identificada previamente; tres flavanonoles; tres isoflavonoides de los cuales uno ya había sido identificado por modo positivo; dos auronas y una chalcona identificada previamente.

Además, se identificaron 16 ácidos fenólicos de los cuales tres ya habían sido identificados previamente; cinco cumarinas, de las cuales cuatro ya habían sido identificadas por modo positivo; un derivado estilbenoide y nueve fenoles que no pueden ser clasificados en las familias anteriores.

En este caso el compuesto más abundante resultó ser la genisteína (*genistein*) para los tres EEGs del PPI (15,2%), del PPU (10,1%) y del PPE (11,8%) y también para la fracción FD del EEG del PPE (11,8%). Sin embargo, el segundo compuesto más abundante para los EEGs de PPI, PPU y PPE, fue la pinocembrina (*pinocembrin*) con 14,6%, 8,7% y 8,3%, respectivamente; pero para la fracción FD corresponde a una aurona (*4',6-Dihydroxy-3'-methoxyaurone*) con 10,9%.



Tabla 21: Compuestos identificados y cuantificados de forma relativa por LC-ESI-MS/MS en modo negativo

R _t [min]	[M-H] ⁻ m/z	PM [g/mol]	Nombre del compuesto	Abundancia relativa [%] EEG			
				PPI	PPu	PPe	FDPPe
Flavonoides							
Flavonoles							
3,21	625,13734	626,14462	Myricetin-3-O-hexosyl(1-2)deoxyhexoside	0,022	0,003	0,002	n.d.
3,72	609,14523	610,15250	Rutin	0,046	0,006	0,011	n.d.
3,86	463,08830	464,09558	Quercetin-3-O-beta-D-galactoside	0,026	0,006	0,008	n.d.
4,18	593,15130	594,15858	3"-O-L-rhamnopyranosylastragalín	0,160	0,014	0,017	n.d.
4,27	623,15777	624,16505	Isorhamnetin-3-O-galactoside-6"-rhamnoside	0,027	n.d.	0,015	n.d.
4,33	447,09164	448,09891	Astragalín	0,170	n.d.	0,023	0,009
4,75	285,04012	286,04869	Fisetín	0,015	0,156	0,370	0,423
5,34	345,06118	346,06846	Limocitrín	0,015	0,082	0,113	0,185
5,62	301,03442	302,04203	Quercetin	1,518	2,372	2,585	4,148
5,97	315,05034	316,05871	3-methylquercetin	2,823	3,392	3,577	6,621
6,65	285,03972	286,04690	kaempferol	1,781	1,218	1,469	2,446
6,72	315,05026	316,05754	Isorhamnetin*	1,956	1,177	1,296	2,994
6,90	299,05592	300,06294	Isokaempferide*	3,628	1,875	1,553	3,753
7,47	315,05015	316,05833	Pinoquercetin	2,829	2,913	3,272	6,081
7,49	299,05525	300,06253	Kaempferol-4'-methyl ether	1,126	0,932	0,817	1,630
Flavonas							
2,69	593,15191	594,15919	Apigenin 6,8-digalactoside	0,007	0,010	0,029	n.d.
4,80	301,03609	302,04337	Tricetin	0,007	0,035	0,036	0,009
5,17	253,05048	254,05775	7,4'-Dihydroxyflavone	0,006	0,035	0,049	0,099
5,57	329,06551	330,07278	Tricin	0,261	0,153	0,138	0,167
5,78	315,04923	316,05650	Nepetin	0,013	0,033	0,036	0,061
6,07	345,06067	346,06795	5,7,3',4'-Tetrahydroxy-6,8-dimethoxyflavone	0,043	0,353	0,504	0,887
6,43	269,04489	270,05258	Apigenin	1,356	1,009	1,145	3,582
6,47	299,05573	300,06300	Sorbifolin	n.d.	0,286	0,333	0,630
7,07	329,06596	330,07421	Jaceosidin	1,560	1,215	1,533	3,084
8,28	253,04867	254,05594	Chrysin	4,818	2,181	2,468	4,802
8,45	283,06058	284,06785	Genkwanin	1,185	0,243	0,380	1,413
8,87	283,06076	284,06804	Acacatin	1,859	0,893	1,008	1,032
9,14	343,08008	344,08735	Nevadensin	0,072	0,044	0,039	0,070
Flavanonas							
3,21	563,14184	564,14912	Naringenin-6-C-hexoside-5-C-pentoside ⁹	n.d.	0,009	0,020	n.d.
5,34	255,06614	256,07342	Dihydroxy flavanone*	0,020	0,088	0,114	0,314
6,26	271,05966	272,06694	3',4',7-Trihydroxyflavanone	n.d.	n.d.	n.d.	1,418
6,53	711,21005	712,21733	Theaflavanoside II	0,010	0,023	n.d.	n.d.
6,62	299,08941	300,09668	Farrerol	0,344	0,271	0,329	0,680
6,68	269,08112	270,08840	Alpinetin	2,470	0,188	1,447	3,705
7,13	255,06631	256,07359	Liquiritigenin	0,008	0,057	0,084	0,146
7,26	301,07089	302,07816	Stembin	0,219	1,442	1,256	2,009
8,34	255,06564	256,07292	Pinocembrine	14,588	8,677	8,318	8,562
8,98	339,12502	340,13229	6-Prenylnaringenin	n.d.	0,028	0,018	0,019
Flavanonoles							
3,30	287,05623	288,06351	(-)-Fustin	0,008	0,044	0,094	0,141
3,79	303,05052	304,05812	Taxifolin*	0,060	0,316	0,345	0,539
4,57	287,05543	288,06270	Aromadendrin	0,612	0,311	0,425	0,724
Isoflavonoides							
7,43	355,11665	356,12393	Prenyl tetrahydroxy isoflavanone	0,029	0,030	0,033	0,065
8,05	355,11840	356,12568	Prenyl trihydroxy isoflavanone	0,029	0,250	0,119	0,133
8,50	269,04505	270,05176	Genistein	15,251	10,076	9,487	11,758
Auronas							
7,33	283,06042	284,0677	4',6-Dihydroxy-3'-methoxyaurone	6,869	5,599	5,244	10,915
7,46	339,12383	340,1311	Prenyl methoxy trihydroxy aurone derivated*	n.d.	0,049	0,032	0,062
Chalconas							
9,99	271,09759	272,10487	2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone	0,163	0,167	0,188	0,027
Ácidos fenólicos							
1,58	353,08822	354,09550	Chlorogenic acid	0,004	0,016	0,049	0,005
2,11	179,03473	180,04200	Trans-caffeic acid	0,739	0,445	0,477	0,701
2,66	337,09250	338,09978	Coumaroyl quinic acid*	n.d.	n.d.	0,004	n.d.
3,06	367,10367	368,11095	Feruloyl quinic acid*	0,002	0,002	0,008	n.d.
3,17	163,03983	164,04711	p-coumaric acid	1,230	0,946	1,098	1,881
3,64	193,05031	194,05759	Ferulic acid	0,205	0,149	0,155	0,267
3,84	193,05027	194,05754	isoferulic acid	0,373	0,208	0,242	0,411
4,07	121,02916	122,03644	Benzoic acid	0,116	0,187	0,156	0,153
4,24	137,02372	138,03100	4-Hydroxybenzoic acid	0,005	0,005	0,004	0,008
4,63	193,05104	194,05831	Trans-ferulic acid	0,013	0,022	0,026	0,083
5,02	207,06580	208,07308	3,4-Dimethoxycinnamic Acid	1,300	0,616	0,847	1,379
5,14	167,03464	168,04191	5-Methoxysalicylic acid	n.d.	0,012	0,012	0,035
5,25	177,05579	178,06307	4-Methoxycinnamic acid	n.d.	0,007	0,012	0,018
5,67	147,04381	148,05109	Trans-cinnamic acid	0,075	0,049	0,049	0,074
6,92	205,08837	206,09565	3-Prenyl-4-hydroxybenzoic acid	n.d.	0,011	0,042	0,036
8,27	179,03379	180,04107	Cis-caffeic acid	0,022	0,017	n.d.	0,020
Fenoles							
0,72	165,05543	166,06271	Isopeanol	0,007	0,024	0,011	0,007
1,49	137,02441	138,03168	Protocatechuic aldehyde	0,184	0,135	0,104	0,475
2,41	121,02937	122,03665	4-Hydroxybenzaldehyde	0,027	0,019	0,013	0,056
2,66	461,16617	462,17345	Verbascoside	0,008	n.d.	n.d.	n.d.
4,55	559,12371	560,13099	Fenol 1 ^b	n.d.	n.d.	0,027	0,045
7,02	433,12769	434,13497	Robustaside D	0,114	0,134	0,133	0,046
8,17	203,10737	204,11465	2-prenyl-4-acetylphenol	0,465	0,808	0,318	0,343
9,17	391,11919	392,12647	Fenol 2 ^c	0,167	0,025	0,100	n.d.
10,24	265,14770	266,15497	Zinniol	0,017	0,010	0,009	0,015



Cumarinas							
2,76	207,02967	208,03695	Fraxetin	0,124	0,915	0,942	1,223
3,40	161,02364	162,03092	Umbelliferone	n.d.	0,002	0,003	0,008
3,54	191,03456	192,04184	Scopoletin	0,016	0,055	0,098	0,173
3,76	221,04559	222,05287	Isoraxidin	0,007	0,068	0,074	0,150
7,29	245,08139	246,08867	Prenyletin	1,094	4,304	5,538	7,045
Estilbenoides							
4,84	417,11985	418,12712	Stilbenoid derivated hexoside ^d	0,141	n.d.	0,014	0,000

Los compuestos fueron identificados comparando con la base de datos MassBank of North America, salvo que se diga lo contrario. * compuesto identificado por la base de datos MS-DIAL. R: tiempo de retención, PM: peso molecular, n.d.: no identificado, EEG: extracto etanólico global, PPI: propóleo de Pirque, PPU: propóleo de Pudahuel, PPE: propóleo de Peñaflo, FDPPE: fracción D del EEG del PPE.

a: 8-[3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one

b: [4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-[2,4,6-trihydroxy-3-(4-hydroxybenzoyl)phenyl]oxan-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate

c: (E)-1-[3-[(2,3-dihydroxyphenyl)methyl]-2,4-dihydroxy-6-methoxyphenyl]-3-phenylprop-2-en-1-one

d: [3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl] 2,4-dihydroxy-6-[(E)-2-phenylethenyl]benzoate

Dadas las diferencias cualitativas en los tipos de compuestos y las diferencias cuantitativas por cuantificación relativa, los datos se sometieron a un análisis de componente principal cuya gráfica se observa en la Figura 40. A partir de estos análisis se puede determinar la proximidad que tienen los EEGs y la fracción en cuanto a su composición.

El gráfico de la Figura 40-A muestra como los EEGs del PPU y PPE se solapan indicando una composición relativamente similar, de hecho, son los puntos más cercanos, mientras que el EEG de PPI se aleja de ellos dando cuenta de una mayor diferencia en la composición. Esto podría explicar la similitud en el comportamiento de los ensayos de capacidad antioxidantes que muestran tanto el EEG del PPU como del PPE. De igual forma la fracción D, aunque deriva del EEG del PPE, se diferencia significativamente en cuanto a su composición encontrándose al otro extremo del análisis de componentes principales. En la figura 40-B se observa el mismo comportamiento, esta vez con más datos, debido a la cantidad de compuestos identificados por el modo negativo, pero manteniéndose las conclusiones de similitud de los EEGs del PPU y del PPE.

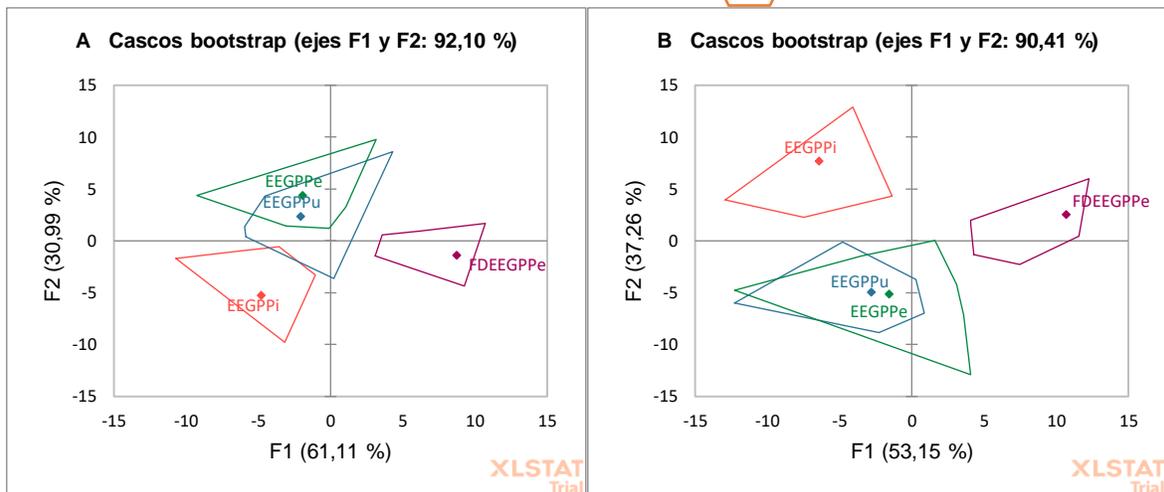


Figura 40: Análisis de componentes principales para los datos obtenidos por análisis metabólico en modo positivo y modo negativo.

A. Análisis de componentes principales con datos obtenidos por metabolómica en modo positivo. B. Análisis de componentes principales con datos obtenidos por metabolómica en modo negativo F1: componente principal uno, que explica un porcentaje de la variabilidad; F2: componente principal dos, que explica un porcentaje distinto de la variabilidad adicional (en conjunto explican un porcentaje acumulado de la variabilidad total). EEGPPi: extracto etanólico global del propóleo de Pirque, EEGPPu: extracto etanólico global del propóleo de Pudahuel, EEGPPe: extracto etanólico global del propóleo de Peñafior y FDEEGPpe: fracción D del extracto etanólico global del propóleo de Peñafior.

Las diferencias establecidas por los compuestos presentes en los EEGs responden a las diferencias geográficas y climáticas de las zonas desde donde provienen los propóleos, entre otros factores como la flora circundante a las colmenas y la flora que visitan las abejas con mayor frecuencia. No debe ser casualidad que las localidades de Pudahuel y Peñafior se encuentren más cercanas y posicionadas al oeste de la provincia de Santiago, mientras que la localidad de Pirque más al sureste de la provincia de Santiago (Figura 41), reflejando las diferencias de los factores antes mencionados en la composición de los propóleos aquí estudiados.

En resumen, de los seis EEGs de propóleos provenientes de distintas localidades que inicialmente fueron caracterizados y estandarizados, se priorizaron tres con el objetivo de minimizar los factores que influyen la composición química. De los tres EEGs provenientes de las localidades de la RM, el EEG del PPe fue el único en cumplir con todos los criterios de calidad de la norma argentina IRAM-INTA 15935-1, además de ser el EEG con el mayor CFT y CFF, este último de gran interés

para las actividades inhibitorias de enzimas del control glicémico y antioxidante. Sumado a esto, el EEG del PPe junto al EEG del PPU mostraron la mejor capacidad antioxidante por neutralización de radicales alcoxilos. Considerando ambas actividades, el EEG del PPe es el más idóneo como materia prima para la manufactura de productos farmacéuticos para el tratamiento de patologías que cursen con hiperglicemia y estrés oxidativo, así como en el descubrimiento de nuevos compuestos con dichas actividades, por lo tanto, fue seleccionado para el fraccionamiento y purificación parcial de compuestos. Los ensayos de inhibición enzimática de las fracciones permitieron establecer que la fracción FD del EEG del PPe presenta la mayor actividad inhibitoria frente a ambas enzimas del control glicémico (α -glucosidasa y glicógeno fosforilasa a) y que los compuestos mayoritarios identificados y cuantificados corresponden en gran medida a flavonoides del tipo flavonol como por ejemplo la isorhamnetina y canferol.

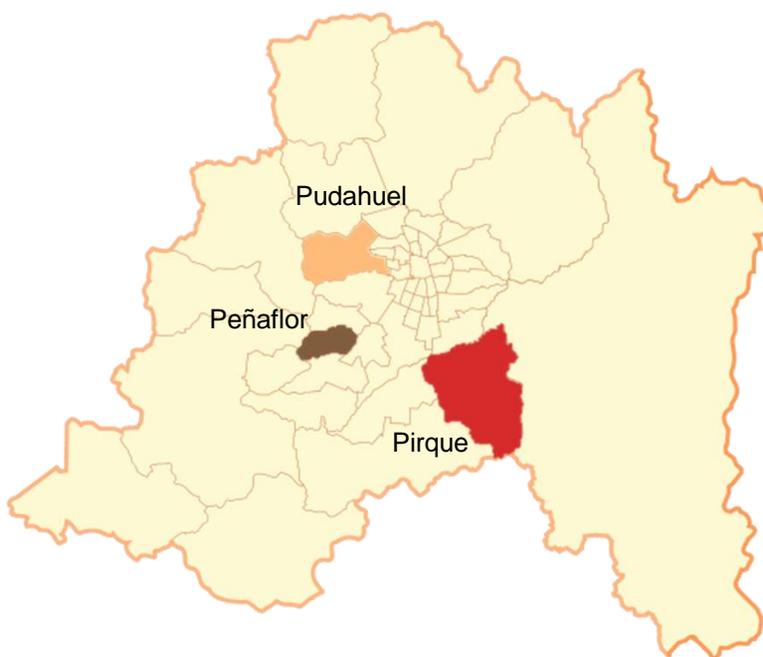


Figura 41: Localidades de Pirque, Pudahuel y Peñaflores

CONCLUSIONES

Por los resultados antes expuesto y las conclusiones que se mencionan a continuación, la hipótesis de este estudio es aceptada, debido a que:

- I. El extracto etanólico global del propóleo de Peñafior presentó el mayor contenido de flavonas y flavonoles importante para la actividad biológica del propóleo y su potencial en la búsqueda de nuevos compuestos activos.
- II. El propóleo de la localidad de Peñafior fue el único que cumplió con todos los criterios de calidad según la norma argentina IRAM-INTA 15935-1, destacando como una materia prima de calidad para la manufactura de productos farmacéuticos, alimenticios o cosméticos.
- III. Todos los extractos etanólicos globales inhiben la actividad de las enzimas α -glucosidasa y glicógeno fosforilasa a *in vitro*, siendo el del propóleo de Peñafior el más potente frente a α -glucosidasa y reportándose por primera vez esta actividad inhibitoria frente a la enzima glicógeno fosforilasa a.
- IV. Todos los extractos etanólicos globales mostraron buena capacidad antioxidante, destacando el extracto etanólico global del propóleo de Peñafior, lo que confiere no solo un potencial inhibidor en enzimas de control glicémico, sino que también una capacidad antioxidante que puede hacer frente a patologías que cursen con estrés oxidativo, como la diabetes.
- V. La fracción D del extracto etanólico global del propóleo de Peñafior presentó la mayor actividad inhibitoria *in vitro* frente a las enzimas α -glucosidasa y glicógeno fosforilasa a, al igual que el extracto etanólico global del cual procede y cuya composición se caracteriza por la alta presencia de flavonoides del tipo flavonol como isorhamnetina y canferol.

BIBLIOGRAFÍA

ABLAT, A., Mohamad, J., Awang, K., Shilpi, J. A., & Arya, A. (2014). Evaluation of antidiabetic and antioxidant properties of *Brucea javanica* seed. The Scientific World Journal, 2014, 786130-786130.

AGIUS, L. (2015). Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. Mol Aspects Med, 46, 34-45.

AGUIRRE, M. C., Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Letelier, M. E., Cassels, B. K., Silva, X., Alegría, S. & Negrete, R. (2006). Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14(16), 5673-5677.

AL-DALLEN, S. M., Chavez R., T., Martínez S., G., Ferreira B., E., & León F., O. S. (2004). El Equilibrio Redox en la Diabetes y sus Complicaciones. Acta Farmacéutica Bonaerense, 23(2), p231-p242.

ALEJANDRO-ESPINOSA, M., Jaramillo Fierro, X., Ojeda Riascos, S., Malagón Aviles, O., & Ramírez Robles, J. (2013). Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador. Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, 12(1), 59-68.

ALARCÓN, E., Campos, A. M., Edwards, A. M., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2008). Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. Food Chemistry, 107(3), 1114-1119.

ALVEAR, M., Santos, E., Cabezas, F., Pérez-San Martín, A., Lespinasse, M., Veloz, J. (2021) Geographic Area of Collection Determines the Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Three Extracts of Chilean Propolis. Plants. 10, 1543.

ANTONIO, C. M. M., & Tânia, S. F. (2017). Isolated Compounds from Natural Products with Potential Antidiabetic Activity – a Systematic Review. Current Diabetes Reviews, 13, 1-71.

AOI, W., Hosogi, S., Niisato, N., Yokoyama, N., Hayata, H., Miyazaki, H., Kusuzaku, K., Fukuda, T., Fukui, M., Nakamura, N & Marunaka, Y. (2013). Improvement of insulin resistance, blood pressure and interstitial pH in early developmental stage of insulin resistance in OLETF rats by intake of propolis extracts. Biochem Biophys Res Commun, 432(4), 650-653.

BANKOVA, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol, 100(1), 114-117.

BARRIENTOS, L., Herrera, C. L., Montenegro, G., Ortega, X., Veloz, J., Alvear, M., Cuevas, A., Saavedra, N., & Salazar, L. A. (2013). Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Brazilian journal of microbiology. 44(2), 577–585.

BARTH, O. M., Dutra, V. M. L., & Justo, R. L. (1999). Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil meridional. Ciência Rural, 29, 663-667.

BERTRAMS, J., Müller, M., Kunz, N., Kammerer, D., & Stintzing, F. (2013). Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. Journal of Applied Botany and Food Quality 86, 143 – 153.

BETANCES-SALCEDO, E., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., & González-Martín, M. I. (2017). Flavonoid and Antioxidant Capacity of Propolis Prediction Using Near Infrared Spectroscopy. Sensors, 17(7), 1647.

BOGDANOV, S. (2016). The Propolis Book, 1, 20.

BOGDANOV, S. (2016). The Propolis Book, 2, 42.

BOLLEN, M., Keppens, S., & Stalmans, W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. Biochemical Journal, 336(Pt 1), 19-31.

BRIDI, R., Montenegro, G., Nuñez-Quijada, G., Giordano, A., Fernanda Morán-Romero, M., Jara-Pezoa, I., Speisky, H., Atala, E. & López-Alarcón, C. (2015). International Regulations of Propolis Quality: Required Assays do not Necessarily

Reflect their Polyphenolic-Related In Vitro Activities. *Journal of Food Science*, 80(6), C1188-C1195.

BRUNETON J. (2001). *Farmacognosia: Fitoquímica, Plantas Medicinales*. 2ª ed. Zaragoza, Acribia S.A. 1100p.

CASTALDO, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, S1-S6.

CASTRO Galdámez, Consuelo Belén. (2014). *Actividad antioxidante, perfil de compuestos fenólicos y calidad de propóleos de la Región Metropolitana, Chile (Doctorado en Ciencias Farmacéuticas) Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 139p.*

CASTRO, C., Mura, F., Valenzuela, G., Figueroa, C., Salinas, R., Zuñiga, M. C., Torres, J. L., Fuguet, E. & Delporte, C. (2014). Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. *Food Research International*, 64, 873-879.

CHANDRAN, R. P., Kumar, S. N., Manju, S., Kader, S. A., & Kumar, B. S. D. (2015). In Vitro α -Glucosidase Inhibition, Antioxidant, Anticancer, and Antimycobacterial Properties of Ethyl Acetate Extract of *Aegle tamilnadensis* Abdul Kader (Rutaceae) Leaf. *Appl Biochem Biotechnol*, 175(2), 1247-1261.

CHANG, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.

CODARIO, R. A. (2011). *Type 2 diabetes, Pre-Diabetes, and the Metabolic Syndrome*, 2th Edition. USA, Philadelphia, Pennsylvania. 367p.

DA SILVA FROZZA, C. O., Garcia, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., Ferreira Padilha, F., Kömmling Seixas, F., Collares, T., Borsuk, S., Dellagostin, O. A., Pêgas Henriques, J. A. & Roesch-Ely, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant, and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 137-142.

DORTA, E., Aspée, A., Pino, E., González, L., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2017). Controversial alkoxy and peroxy radical scavenging activity of the tryptophan metabolite 3-hydroxy-anthranilic acid. Biomedicine & Pharmacotherapy, 90, 332-338.

DORTA, E., Fuentes-Lemus, E., Aspée, A., Atala, E., Speisky, H., Bridi, R., Lissi, E. & López-Alarcón, C. (2015). The ORAC (oxygen radical absorbance capacity) index does not reflect the capacity of antioxidants to trap peroxy radicals. RSC Advances, 5(50), 39899-39902.

FIGUEROA-BENAVIDES, C., Matos, M. J., Peñaloza-Amion, M., Veas, R., Valenzuela-Barra, G., Zapata, G., Delogu, G., Uriarte, E., Santana, L., Olea-Azar, C. & Delporte, C. (2018). Targeting α -(1,4)-Glucosidase in Diabetes Mellitus Type 2: The Role of New Synthetic Coumarins as Potent Inhibitors. Current Topics in Medicinal Chemistry, 18(27), 2327-2337.

FREIRES, I. A., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2016). A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. Eur J Med Chem, 110, 267-279.

GIACCO, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res, 107(9), 1058-1070.

GIAMPIERI, F., Quiles, J. L., Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. J., Orantes-Bermejo, F. J., Alvarez-Suarez, J. M. & Battino, M. (2021). Bee Products: An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry.

HAYES, J.M., Kantsadi, A.L. & Leonidas, D.D. (2014). Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. Phytochem Rev 13, 471–498.

HERNÁNDEZ, S. M., Lazo, S. C., Junod, M. J., Arancibia, M. J., Flores, S. R., Valencia, A. E. y Valenzuela, V. E. (2005) Características organolépticas y fisicoquímicas de propóleos de la Provincia de Ñuble, VIII Región-Chile. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 55, 374-380.

HERRERA, C. L., Alvear, M., Barrientos, L., Montenegro, G., & Salazar, L. A. (2010). The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp. Ciencia e investigación agraria, 37, 75-84.

HOU, W., Li, Y., Zhang, Q., Wei, X., Peng, A., Chen, L., & Wei, Y. (2009). Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as alpha-glucosidase inhibitors. Phytother Res, 23(5), 614-618.

HYUN, T. K., Eom, S. H., & Kim, J.-S. (2014). Molecular docking studies for discovery of plant-derived α -glucosidase inhibitors. Plant Omics, 7(3), 166-170.

IDF, Internacional diabetes federation (2021) IDF Diabetes atlas, 10a edición. 135p

ISIDOROV, V. A. & Nazaruk, J. (2017). Gas chromatographic-mass spectrometric determination of glycosides without prior hydrolysis. Journal of Chromatography A, 1521, 161-166.

IRAM-INTA. (2008). Norma IRAM-INTA 15935-1 Productos del Noreste Argentino. Parte I: Propóleos en bruto. Primera edición.

JAKOBS, S., Fridrich, D., Hofem, S., Pahlke, G., & Eisenbrand, G. (2006). Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. Molecular Nutrition & Food Research, 50(1), 52-57.

JONES, G. D. (2014). Pollen analyses for pollination research, acetolysis. Journal of Pollination Ecology, 13(21), 2014, pp 203-217.

KASPRZAK, M. M., Erxleben, A., & Ochocki, J. (2015). Properties and applications of flavonoid metal complexes. RSC Advances, 5(57), 45853-45877.

KATO, A., Nasu, N., Takebayashi, K., Adachi, I., Minami, Y., Sanae, F., . . . Nash, R. J. (2008). Structure-Activity Relationships of Flavonoids as Potential Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. J Agric Food Chem, 56(12), 4469-4473.

KIM, Y., Keogh, J. B., & Clifton, P. M. (2016). Polyphenols and Glycemic Control. Nutrients, 8(1), 17.

KITAMURA, H., Naoe, Y., Kimura, S., Miyamoto, T., Okamoto, S., Toda, C., Shimamoto, Y., Iwanaga, T. & Miyoshi, I. (2013). Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice: Possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue. Adipocyte, 2(4), 227-236.

KUMAZAWA, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chemistry, 84(3), 329-339.

LEE, E. S., Uhm, K. O., Lee, Y. M., Han, M., Lee, M., Park, J. M., Suh, P., Park, S. & Kim, H. S. (2007). CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells. Biochem Biophys Res Commun, 361(4), 854-858.

LI, Y. Q., Zhou, F. C., Gao, F., Bian, J. S., & Shan, F. (2009). Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase. J Agric Food Chem, 57(24), 11463-11468.

LÓPEZ-ALARCÓN, C., & Lissi, E. (2006). A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals. Free Radical Research, 40(9), 979-985.

LORDAN, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., & Ross, R. P. (2013). The alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. Food Chem, 141(3), 2170-2176.

LÜ, J.-M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 14(4), 840-860.

MARTIN, W. H., Hoover, D. J., Armento, S. J., Stock, I. A., McPherson, R. K., Danley, D. E., Stevenson, R. W., Barrette, E. J. & Treadway, J. L. (1998). Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose *in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(4), 1776-1781.

MINSAL, Ministerio de salud de Chile. (2010). Guía clínica: diabetes mellitus tipo 2. Santiago, 75p. (Serie guías clínicas MINSAL).

MONTENEGRO, G., Mujica, Á., Peña, R.C., Gómez, M., Serey, I., & Timmermann, B.N. (2004). Similitude pattern and botanical origin of the chilean propolis. *Phyton*.

MUÑOZ, O., Peña Raúl, C., Ureta, E., Montenegro, G., & Timmermann Barbara, N. (2000). Propolis from Chilean Matorral Hives. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 56, 269-270.

MUÑOZ, O., Peña Raúl, C., Ureta, E., Montenegro, G., Caldwell, C., & Timmermann Barbara, N. (2001). Phenolic Compounds of Propolis from Central Chilean Matorral. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 56, 273-277.

MURA Mardones, Francisco Antonio. (2016). Estudio de la actividad antioxidante y potencial capacidad citotóxica en células leucémicas de la línea HL-60 de nuevos compuestos derivados de ácido hidroxicinámico (Doctorado en Química). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 165p.

NAGY, L., Márton, J., Vida, A., Kis, G., Bokor, É., Kun, S., Gönczi, M., Docsa, T., Tóth, A., Antal, M., Gergely, P., Csóka, B., Pacher, P., Somsák, L., and Bai, P. (2018) Glycogen phosphorylase inhibition improves beta cell function. *British Journal of Pharmacology*, 175: 301– 319.

NAKAMURA, S., Takahira, K., Tanabe, G., Muraoka, O. & Nakanishi I. (2012) Homology Modeling of Human Alpha-Glucosidase Catalytic Domains and SAR Study of Salacinol Derivatives. *Open Journal of Medicinal Chemistry*, 2(3), pp. 50-60.

NINA, N., Quispe, C., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., Feresín, G. E., Lima, B., Leiva, E., & Schmeda-Hirschmann, G. (2015). Antibacterial Activity, Antioxidant Effect and Chemical Composition of Propolis from the Región del Maule, Central Chile. *Molecules*, 20(10), 18144-18167.

NURUL ISLAM, M., Jung, H. A., Sohn, H. S., Kim, H. M., & Choi, J. S. (2013). Potent alpha-glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. Arch Pharm Res, 36(5), 542-552.

OLADAYO, M. I. (2016). Nigerian propolis improves blood glucose, glyated hemoglobin A1c, very low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein levels in rat models of diabetes. J Intercult Ethnopharmacol, 5(3), 233-238.

OU, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. J Agric Food Chem, 49(10), 4619-4626.

PACHECO, A., Daleprane, J. B., Freitas, V. S., Ferderbar, S., Hirabara, S., Cuevas, A., Saavedra, N., Curi, R., Abdalla, D. S.P. & Salazar, L. A. (2011). Efecto del Propóleos Chileno sobre el Metabolismo de Glucosa en Ratones Diabéticos. International Journal of Morphology, 29, 754-761.

PALOMINO GARCÍA, L. R., Martínez Galán, J. P., García Pajón, C. M., Gil González, J. H. & Durango Restrepo, D. L. (2010). Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el municipio de la unión (antioquia, colombia). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 63(1), 5373-5383.

PANDEY, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2(5), 270-278.

PEÑA-CERDA, M., Arancibia-Radich, J., Valenzuela-Bustamante, P., Pérez-Arancibia, R., Barriga, A., Seguel, I., García, L. & Delporte, C. (2017). Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. Food Chemistry, 215, 219-227.

PETELINC, T., Polak, T., Demšar, L. & Jamnik P (2013) Fractionation of phenolic compounds extracted from propolis and their activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. PLOS ONE 8(2): 8p.

POPOVA, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. and Bogdanov, S. (2004), Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. Phytochem. Anal., 15: 235-240.

POPOVA, M., P., Bankova, V., S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G., Luigi, & Sabatini, A.-G. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. Apidologie, 38(3), 306.

PRIOR, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. J Agric Food Chem, 53(10), 4290-4302.

RASOULI, H., Hosseini-Ghazvini, S. M.-B., Adibi, H., & Khodarahmi, R. (2017). Differential [small alpha]-amylase/[small alpha]-glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. Food & Function, 8(5), 1942-1954.

RISTIVOJEVIC, P., Trifkovic, J., Andrić, F., & Milojković-Opsenica, D. (2015). Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. Natural Product Communications.10 (11), 1869-1876.

RUBILAR, M., Jara, C., Poo, Y., Acevedo, F., Gutierrez, C., Sineiro, J., & Shene, C. (2011). Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): sources of antioxidant compounds and alpha-Glucosidase/alpha-Amylase inhibitors. J Agric Food Chem, 59(5), 1630-1637.

SFORCIN, J. M. (2016). Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. Phytotherapy Research, 30(6), 894-905.

SIMONE-FINSTROM, M. & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honeybees. Apidologie 41, 295–311.

SINGLETON, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16(3), 144-158.

TESLA, R., Bonfigli, A.R., Genovese, S., De Nigris, V. & Ceriello, A. (2016). The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complications. Nutrients, 20;8(5):310.

TREADWAY, J. L., Mendys, P., & Hoover, D. J. (2001). Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. Expert Opinion on Investigational Drugs, 10(3), 439-454.

UEDA, M., Hayashibara, K., & Ashida, H. (2013). Propolis extract promotes translocation of glucose transporter 4 and glucose uptake through both PI3K- and AMPK-dependent pathways in skeletal muscle. Biofactors, 39(4), 457-466.

VALENZUELA Barra, Gabriela María José (2015) Comparación de la actividad antiinflamatoria y composición química de propóleos provenientes de la región metropolitana de Santiago, Chile (Doctorado en Ciencias Farmacéuticas) Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 144p.

VALENZUELA-BARRA, G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., de Las Heras, B., Hortelano, S. & Delporte, C. (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Region Metropolitana de Santiago, Chile. J Ethnopharmacol, 168, 37-44.

WAGNER, H., & Blandt, S. (1996). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas (Second ed.): Springer.

XIAO, J., Kai, G., Yamamoto, K., & Chen, X. (2013). Advance in dietary polyphenols as alpha-glucosidases inhibitors: a review on structure-activity relationship aspect. Crit Rev Food Sci Nutr, 53(8), 818-836.

YIN, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W. (2014). α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. Food Science and Human Wellness, 3(3-4), 136-174.

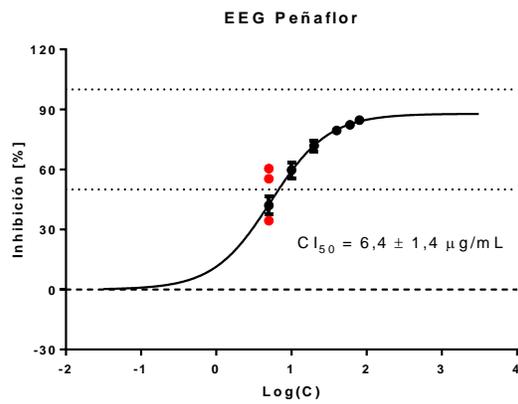
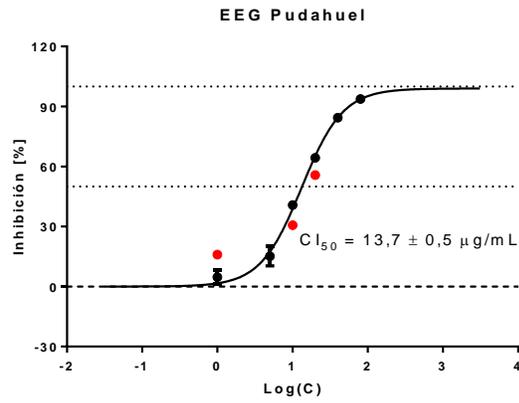
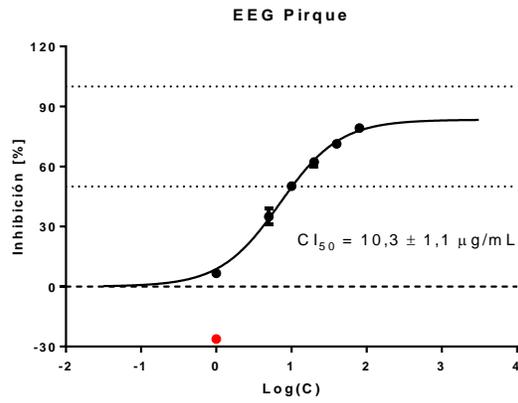
ZHANG, H., Wang, G., Beta, T., & Dong, J. (2015). Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 587383.

ZHANG, J., Shen, X., Wang, K., Cao, X., Zhang, C., Zheng, H. & Hu, F. (2016) Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of *Baccharis propolis* and *Eucalyptus propolis* in RAW64.7 cells. Pharmaceutical Biology, 54:10, 2220-2235.

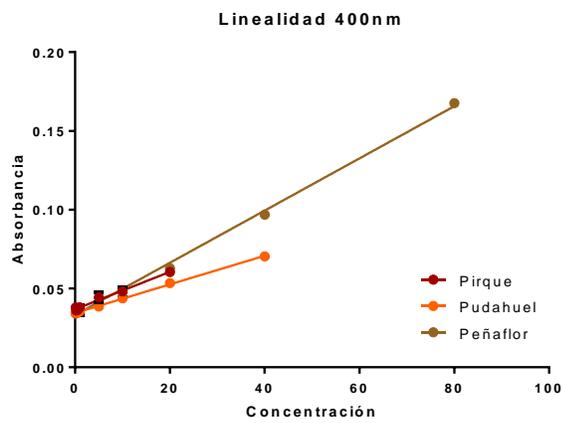
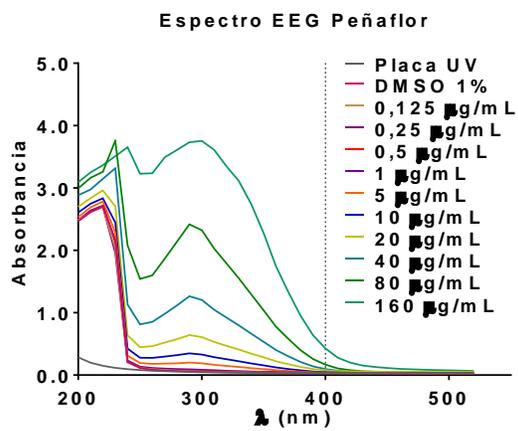
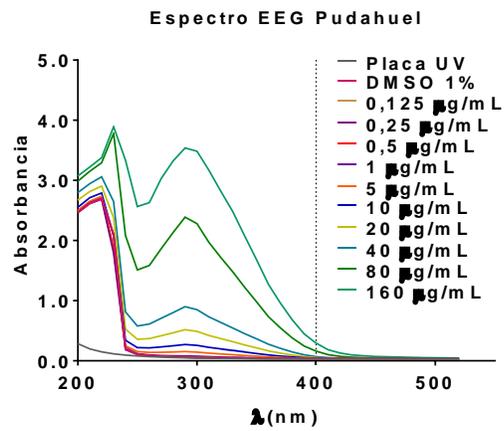
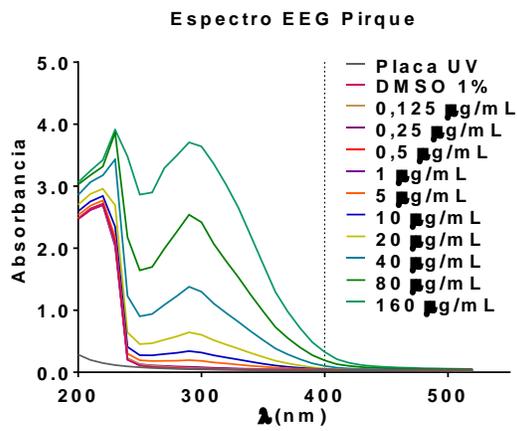
ZHAO, J. Z., Chen, X.-W., Wang, X.-B., & Quan-Xi. (2009). α -glucosidase inhibitory constituents from *Toona sinensis*. Chemistry of natural compounds, 45(2), 244-246.

ANEXOS

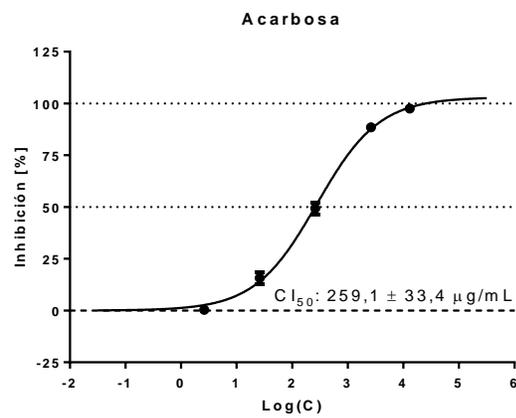
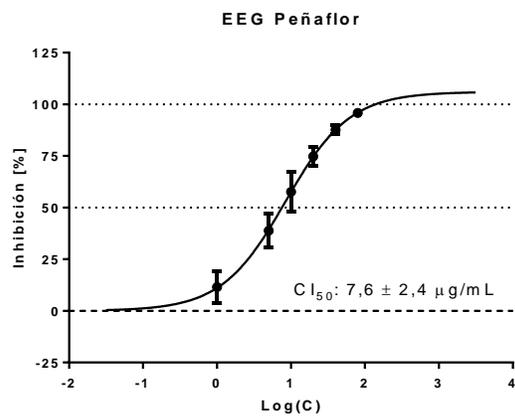
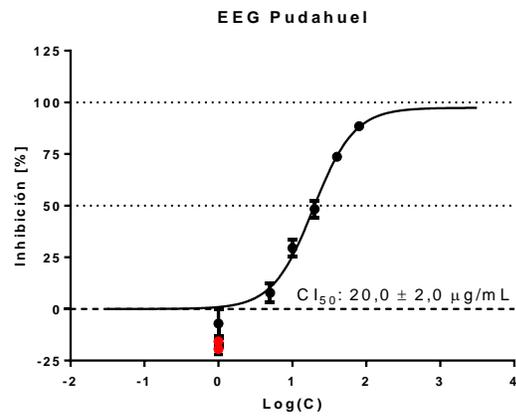
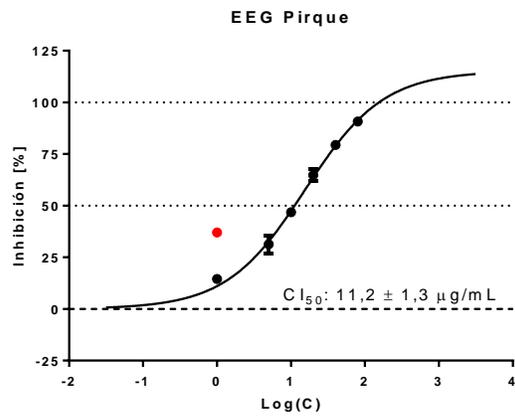
Anexo 1: Curvas concentración-respuesta de inhibición de la alfa-glucosidasa y DMSO 8%



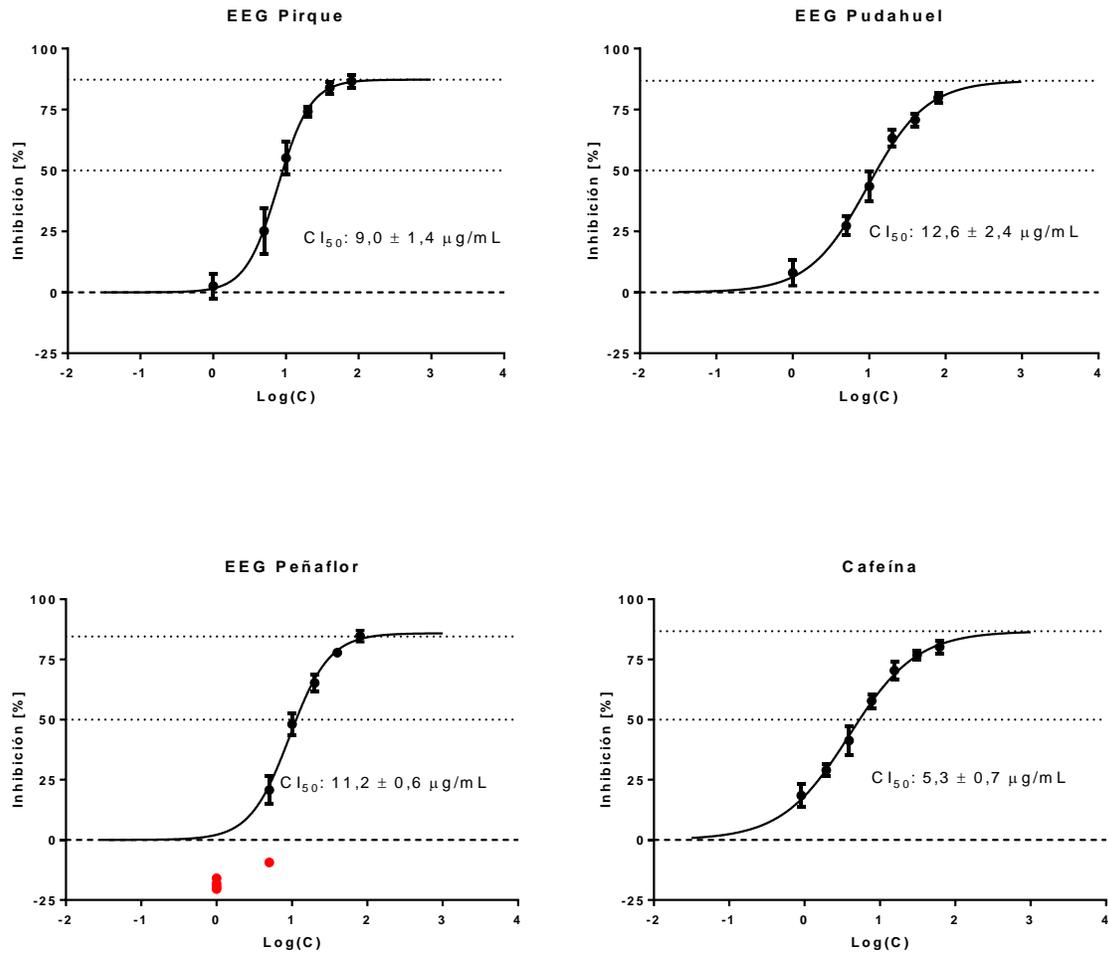
Anexo 2: Espectros UV-Visible de los EEG de propóleos y rangos lineales a 400 nm



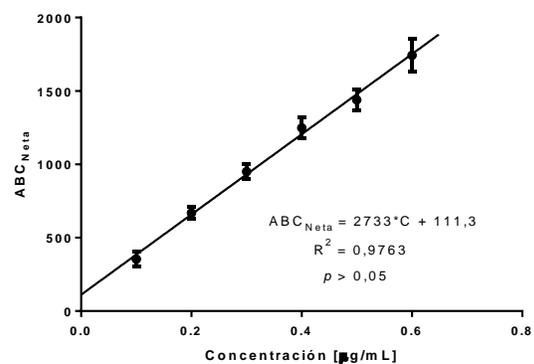
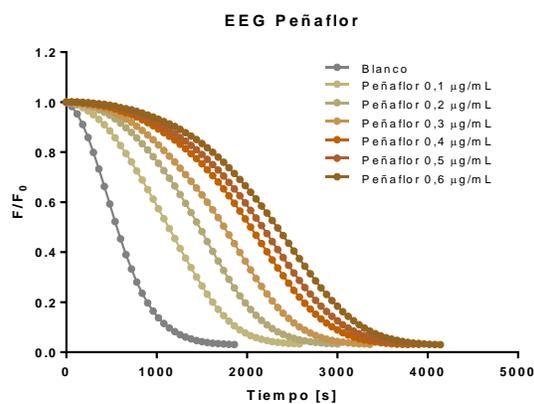
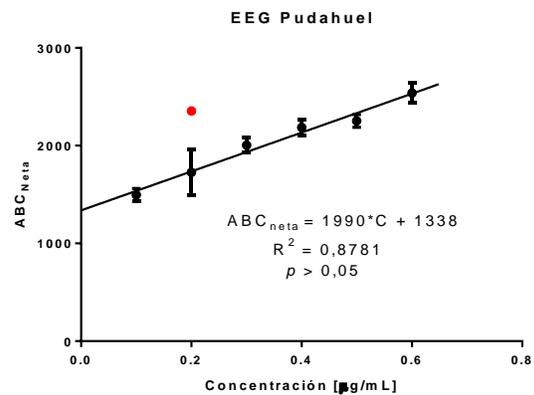
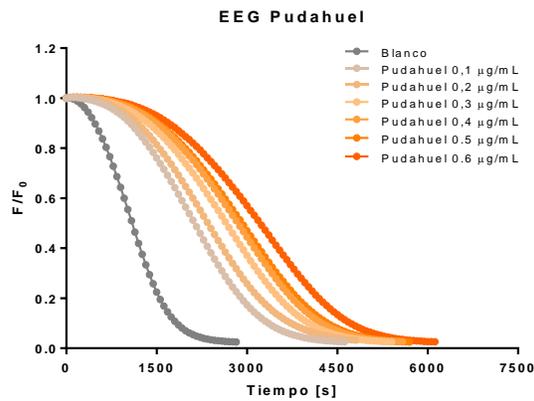
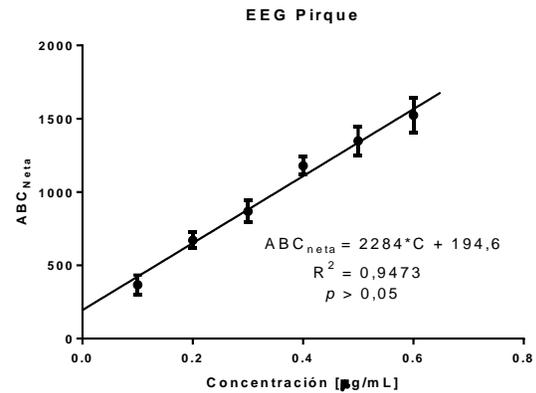
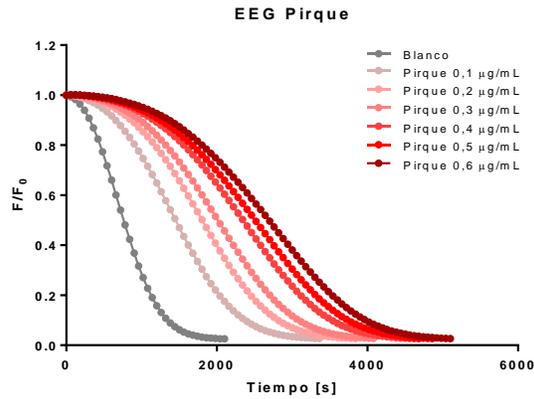
Anexo 3: Curvas concentración-respuesta de inhibición de la alfa-glucosidasa y DMSO 1%



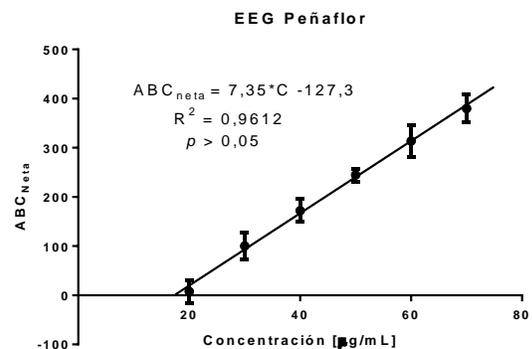
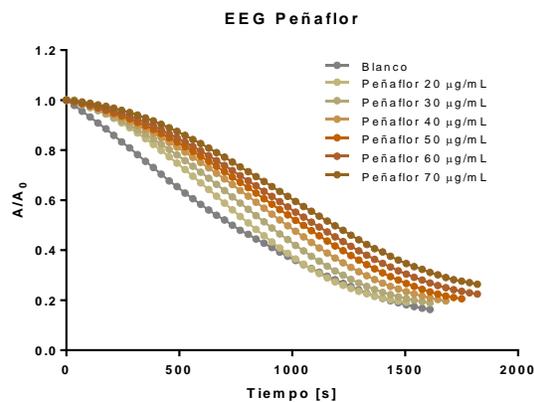
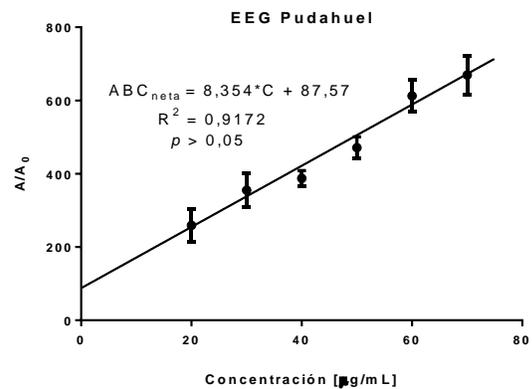
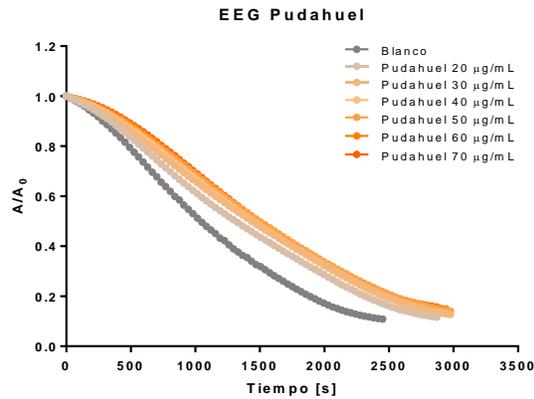
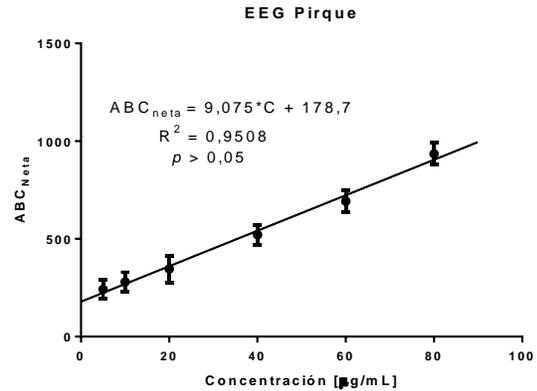
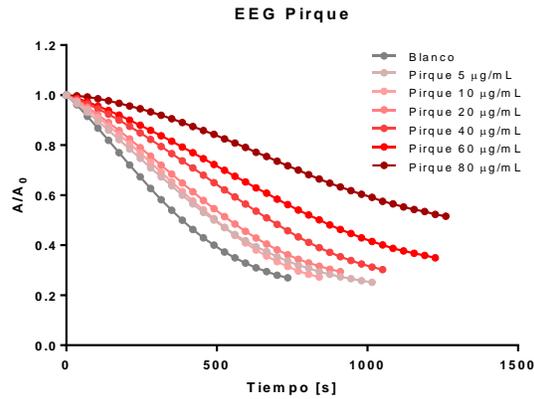
Anexo 4: Curvas concentración-respuesta de inhibición de glicógeno fosforilasa a (GPa)



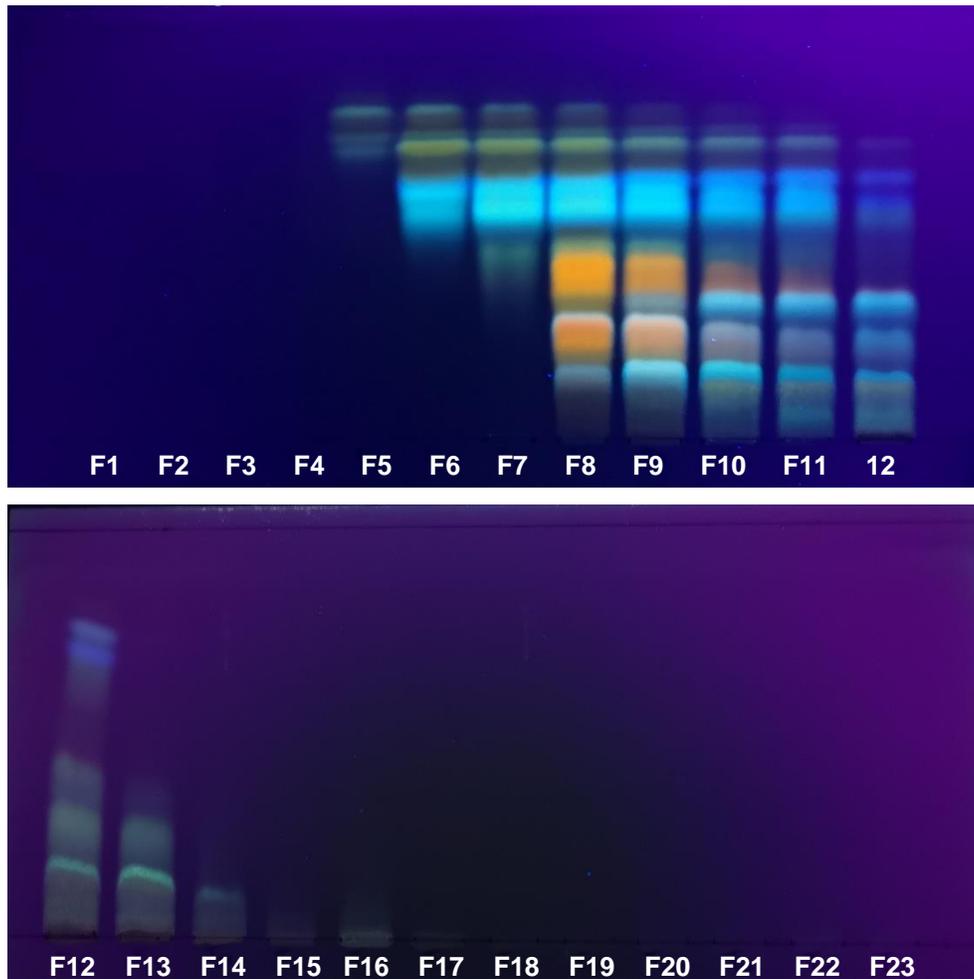
Anexo 5: Curvas intensidad de fluorescencia vs tiempo y ABC vs concentración (ORAC-FI)



Anexo 6: Curvas intensidad de fluorescencia vs tiempo y ABC vs concentración (ORAC-RPG)



Anexo 7: CCF de las fracciones del extracto etanólico global del propóleo de Peñaflor.



Cromatofolio de gel de sílice, fase móvil: hexano, acetato de etilo y ác. Acético (60:40:1) a 365 nm con NP/PEG.

Anexo 8: Espectros UV-Vis de los 12 patrones contrastados con los EEGs y fracción seleccionados.



Anexo 9: Curvas de calibración de patrones para cuantificación por LC-ESI-MS/MS

Compuesto	Curva	R ²
Ácido gálico	$Y = 9,848 \cdot 10^6 \cdot X - 2,641 \cdot 10^8$	0,9781
Ácido ferúlico	$Y = 3,171 \cdot 10^7 \cdot X - 3,468 \cdot 10^8$	0,9975
Ácido clorogénico	$Y = 3,420 \cdot 10^7 \cdot X - 3,754 \cdot 10^8$	0,9987
Ácido sinápico	$Y = 1,187 \cdot 10^7 \cdot X - 5,833 \cdot 10^7$	0,9960
Ácido cafeico	$Y = 6,748 \cdot 10^7 \cdot X - 3,405 \cdot 10^8$	0,9964
Ácido cumárico	$Y = 5,488 \cdot 10^7 \cdot X - 1,769 \cdot 10^8$	0,9941
Ácido 3-hidroxibenzoico	n.d.	n.d.
Rutina	$Y = 1,017 \cdot 10^7 \cdot X - 2,524 \cdot 10^8$	0,9857
Crisina	n.d.	n.d.
Quercetina	$Y = 2,172 \cdot 10^7 \cdot X - 1,421 \cdot 10^8$	0,9981
Ácido abscísico	n.d.	n.d.
Luteolina	n.d.	n.d.
Ácido vanílico	n.d.	n.d.
Canferol (1)	$Y = 1,536 \cdot 10^9 \cdot X - 1,776 \cdot 10^7$	0,9966
Apigenina (1)	$Y = 2,754 \cdot 10^9 \cdot X - 1,832 \cdot 10^7$	0,9944
Resveratrol (1)	$Y = 1,241 \cdot 10^9 \cdot X + 2,088 \cdot 10^7$	0,9778
Miricetina (1)	$Y = 8,895 \cdot 10^9 \cdot X - 3,023 \cdot 10^8$	0,9908
Isorhamnetina (1)	$Y = 3,861 \cdot 10^9 \cdot X - 1,318 \cdot 10^8$	0,9893
Quercitrina (1)	$Y = 1,403 \cdot 10^{10} \cdot X - 1,873 \cdot 10^8$	0,9786
Ácido criptoclorogénico (1)	$Y = 1,859 \cdot 10^{10} \cdot X - 2,374 \cdot 10^8$	0,9977
Astilbina	n.d.	n.d.
Taxifolina (1)	$Y = 1,414 \cdot 10^{10} \cdot X - 2,773 \cdot 10^8$	0,9973
Ácido elágico	n.d.	n.d.

n.d.: no determinada/o