

CONTENIDO DE FLAVONOIDES, FENOLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS COLECTADOS EN GUANAJUATO, MÉXICO

M. S. Hernández-Zarate, M. R. Abraham-Juárez, A. Cerón-García A. J. Gutiérrez-Chávez, D. A. Gutiérrez Arenas y F. Avila-Ramos^{*}.

Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. ^{*} Departamento de Agronomía. Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. ^{*} ledifar@hotmail.com

RESUMEN:

El propóleo es una sustancia resinosa colectada por las abejas de diferentes árboles y plantas. El objetivo de la investigación fue determinar el contenido de flavonoides y fenoles totales, así como la capacidad antioxidante de los propóleos colectados en diferentes regiones de Guanajuato, México. El contenido total de flavonoides vario de 13.2 a 379.2 mg EQ por g de propóleos, el contenido total de fenoles fue de 68.8 a 500.9 mg EAC g de propóleos. Los extractos de propóleos (EP) mostraron variable actividad antioxidante determinada con el radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) de 39.8 a 54.4 ET por g de propóleos. Los propóleos con alto contenido de flavonoides y fenoles no mostraron el mayor efecto para cambiar el color del radical DPPH. Los resultados sugieren que los propóleos de Guanajuato son abundantes e flavonoides y compuestos fenólicos con actividad antioxidante variable.

ABSTRACT:

Propolis is a resinous substance collected by honeybees from various trees and plant sources. The aim of this research was to determine flavonoid and phenolic contents, as well as antioxidant properties of propolis from different regions of Guanajuato, Mexico. Total flavonoid content of propolis samples ranged from 13.2 to 379.2 mg QE while total phenolic content was from 68.8 a 500.9 mg AC g. The propolis samples exhibited various antiradical activity measured towards DPPH(·) from 39.8 a 54.4 equivalents of Trolox by g of propolis. Samples of propolis with high level of flavonoids or phenols not exhibiting changed in radical DPPH. The results suggest that propolis of Guanajuato have a lot compounds of flavonoids and phenols with antioxidant activity changeful.

Palabras clave: Actividad antioxidante, antioxidantes naturales, DPPH·.

Key words: Antioxidant activity, DPPH·, natural antioxidants.

Área: Desarrollo de nuevos productos.

INTRODUCCIÓN

Los propóleos son gomas producidas por las abejas a partir de exudados resinosos de árboles y arbustos. Las abejas los usan como pastas antibióticas para proteger a sus crías durante su desarrollo, para tapar las grietas de la colmena, regular la humedad y la temperatura de su nido. Debido a su origen la composición química de los propóleos es variable, se han identificado más de 240 sustancias en los propóleos, muchas con propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes (Huang *et al.*, 2014).

La actividad de los radicales libres junto con factores físicos y químicos son los responsables del envejecimiento celular y condiciones patológicas como: enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, artritis, enfermedad de Párkinson y Alzheimer (Vera-Ramirez *et al.*, 2011). Los antioxidantes pueden servir como factores defensivos contra los radicales libres en el cuerpo. Enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa son el sistema principal que se opone a la oxidación (Lei *et al.*, 2007); pero si la producción de radicales libres supera la capacidad del sistema enzimático, existe una segunda línea de defensa que son las vitaminas que pueden ayudar a prevenir y/o moderar la acción. Por ejemplo, la vitamina C y E pueden eliminar los radicales libres, se oxidan e inactivan (McCay, 1985).

Los flavonoides y los compuestos fenólicos son los ingredientes más abundantes de los propóleos. Ambos compuestos han demostrado su capacidad para remover a los radicales libres, pueden proteger a los lípidos y la vitamina C de ser destruidos en el proceso oxidativo. Debido a su efecto los propóleos ganaron popularidad y se adicionan a bebidas, alimentos, cosméticos, incluso en chicles o pastas dentales. Por su amplio espectro, propiedades biológicas y usos que se le pueden dar al propóleo hay interés mundial en investigar sus propiedades. Algunas investigaciones mencionan que la concentración de flavonoides y fenoles en el propóleo lo hacen un excelente antioxidante capaz de remover radicales libres en el organismo (Vongsak *et al.*, 2015).

Los flavonoides y compuestos fenólicos contenidos en el propóleo han sido reportados como los responsables de su efecto biológico y actividades farmacológicas. Para conocer el contenido total de fenoles y flavonoides en propóleos existen métodos colorimétricos usados para estimar su contenido de compuestos activos y para calcular su capacidad antioxidante. El objetivo de la investigación fue medir los flavonoides y compuestos fenólicos, así como su poder antioxidante con técnicas colorimétricas. El contenido de flavonoides vario de 13.2 a 379.2 mg EQ por g de propóleos, el contenido de fenoles vario de 68.8 a 500.9 mg EAC g de propóleos. La actividad antioxidante de los EEP vario de 39.8 a 54.4 ET por g de propóleos con el radical DPPH·, el ensayo (FRAP·) también mostro variación de 50 a 2000 ET por g de propóleos. Los propóleos con alto contenido de flavonoides y fenoles no mostraron el mayor efecto antioxidante con el radical DPPH·o en el ensayo FRAP. Los resultados sugieren que los propóleos de Guanajuato tienen gran cantidad de flavonoides y fenoles con poder antioxidante, pero su contenido es muy variable de acuerdo a su origen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los propóleos

Las muestras de los propóleos fueron colectadas de colonias de abejas melíferas ubicadas en 11 Municipios y 25 localidades del Estado de Guanajuato (Cuadro 1). Los propóleos se colectaron durante los meses de junio-agosto de 2015 con el

método de raspado, se almacenaron en congelación (-20 °C) hasta usarlos (- 20 días).

Preparación de los extractos de propóleos

Se colocó 1 g de propóleos en 25 mL de metanol al 80% en agitación constante durante 48 h (20 °C). La muestra obtenida se almacenó a -20 °C durante 24 horas para filtrarse dos veces; la primera a 0.40 μ y la segunda a 0.20 μ . Los extractos de los propóleos (EP) obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta utilizarse (-10 días).

Contenido de flavonoides por el método de cloruro de aluminio

Se colocaron 50 μ l de los EP en 950 μ l de metanol al 80%, de la solución obtenida 500 μ l se mezclaron con 100 μ l de nitrato de aluminio $AlCl_3$ al 10%, más 100 μ L 1 molar de acetato de potasio (CH_3CO_2K) y 4 mL de metanol al 80%. La mezcla se dejó reposar durante 40 min a 20° C para medir la absorbancia de la reacción a 415 nm. El contenido de flavonoides se expresó en mg equivalentes de quercetina por g de propóleos (mg QE g de propóleo). La curva estándar se realizó con una concentración de 0 - 1 mg de quercetina ($r^2 = 0.9973$).

Contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Se disolvieron 10 μ L de EP en 0.5 mL de Folin-Ciocalteu 2M (5 mL en 45 mL de H_2O), más 2 mL de una solución de Na_2CO_3 (1 g en 100 mL de H_2O). La mezcla se dejó reposar durante 2 h a 20° C para medir la absorbancia de la reacción a 765 nm. El contenido de fenoles se expresó en mg equivalentes de ácido cafeínico por g de propóleos (mg AC g de propóleos). La curva estándar se realizó con una concentración de 0 - 500 μ g/mL de ácido cafeínico ($r^2 = 0.9974$). Capacidad antioxidante por el método de eliminación del radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot). Se preparó una solución de DPPH \cdot (7.5 mg/100 mL) en metanol al 80% con agitación constante durante 10 min. Se adicionaron 10 μ l de los EP en 1,990 μ l de la solución DPPH \cdot , se agitó vigorosamente la muestra y se dejó reposar durante 30 m a 20 °C para medir la absorbancia de la reacción a 517 nm. La actividad anti radical se expresó en equivalentes de Trolox por g de propóleos. La curva estándar se realizó con una concentración de 0 – 25 μ g de Trolox® ($r^2 = 0.9953$).

Capacidad antioxidante por el radical DPPH \cdot

Se preparó una solución de DPPH \cdot (7.5 mg/100 mL) en metanol al 80% en agitación constante durante 10 min. Se adicionaron 10 μ l de los EP en 1990 μ l de la solución DPPH \cdot , se agitó vigorosamente la muestra y se dejó reposar durante 30 m a 20 °C para medir su absorbancia a 517 nm. La actividad anti radical se expresó en equivalentes de Trolox por g de propóleos (ET por g de propóleos). La curva estándar se realizó con una concentración de 0 – 25 μ g de Trolox® ($r^2 = 0.9953$), como control positivo de utilizó BHT.

Análisis estadístico

Las muestras se analizaron con la prueba-*t* y un análisis de varianza de una vía. La comparación múltiple con la prueba Tukey. Los valores de P menores de 0.05 se aceptaron como significativos utilizando el programa estadístico SAS para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de flavonoides

La cantidad de flavonoides en los propóleos vario de 13.2 a 379.2 mg EQ g de Propóleos. Las muestras del Acebuche⁽²¹⁾ y León⁽²⁵⁾ presentaron la mayor cantidad ($P \leq 0.05$) seguidas de la muestras del Copal⁽¹⁴⁾ y Los Galvanes⁽²⁹⁾, la menor cantidad se encontró en las muestras de Valle de Santiago⁽⁶⁾, Monte Valerio⁽⁸⁾, El Acebuche⁽¹⁹⁾ y Maravillas⁽²⁰⁾ ($P \leq 0.05$) (Cuadro 1). (Lagouri *et al.*, 2013) reportan variación de 8.3 a 188.0 mg por g de propóleos de flavonoides en diferentes áreas de China, la India, Macedonia e Irán. (Laskar *et al.*, 2010) reportan valores máximos de 200 mg por g de propóleos en EUA, Brasil, Tailandia y Nueva Zelanda. La variación obtenida en los propóleos de Guanajuato fue mayor, pero su contenido de flavonoides supero en 40% a los propóleos reportados (200 vs 379.2 mg EQ por g de propóleos). La variación de flavonoides se atribuye al tipo de plantas localizadas en la región donde las abejas colectan las gomas de las plantas. Los resultados confirman la variación de los flavonoides en los propóleos, incluso con vegetación y clima similar (mezquital) pero con muestras colectadas en mayor altura (<1900 vs >2000 msnm) la cantidad de flavonoides en los propóleos incremento.

Contenido de fenoles

La cantidad de fenoles vario de 68.8 a 500.9 mg AC g de propóleos. Las muestras del Copal⁽¹⁴⁾ y El Acebuche⁽²¹⁾ presentaron la mayor cantidad ($P \leq 0.05$) seguidas de las muestras de Cerro Blanco⁽⁹⁾ y León⁽²⁵⁾. La menor cantidad se encontró en las muestras de Valle de Santiago⁽⁶⁾, Mesa de San Agustín⁽⁷⁾, Monte Valerio⁽⁸⁾ y Jaral de Berrio⁽²⁶⁾ ($P \leq 0.05$) (Cuadro 1). (Lagouri *et al.*, 2013) reportan fenoles de 42.9 a 329.0 mg por g de propóleos en algunas zonas de China, Macedonia y Portugal. (Lagouri *et al.*, 2013) en la India reportan cantidades inferiores a 160 mg por g de propóleos. La variación obtenida en los propóleos de Guanajuato fue mayor, pero sus valores superaron en 35% a propóleos de diferentes países.

Capacidad antioxidante por el método del radical DPPH·

La actividad antioxidante se encontró en un rango de 39.8 a 54.4 ET g de propóleos. Los propóleos de las muestras de Jaral de Berrio⁽²⁶⁾ y San Isidro Calera⁽³⁰⁾ presentaron actividad antioxidante similar al BHT pero superior al promedio ($P \leq 0.05$), la menor actividad la presentó la muestra del Terrero⁽²²⁾ ($P \leq 0.05$) (Figura 1). El DPPH· es un radical estable de color morado que cambia a color amarillo al captar radicales de los antioxidantes evaluados (Kumazawa *et al.*, 2004). La actividad antioxidante de los propóleos se reportó como equivalentes de Trolox por g de propóleos. El Trolox es una análogo de la vitamina E soluble en agua, la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) es una medida de la fuerza antioxidante basado en Trolox. Todas los extractos de propóleo mostraron capacidad

antioxidante superior a 40 TEAC, 17 muestras superaron 47.5 TEAC y las muestras 26 y 30 superaron los 53 TEAC con efecto similar al BHT (Figura 1). Como referencia se utilizó BHT con 57 TEAC. Los EP que presentaron capacidad antioxidante similar al BHT no fueron los más abundantes en fenoles y flavonoides (Cuadro 1). En diferentes investigaciones se ha observado correlación entre la cantidad de flavonoides y fenoles sobre la capacidad antioxidante en DPPH· (Lagouri *et al.*, 2013) en la investigación tal efecto no se observó. Esto puede explicarse pues la cantidad de fenoles y flavonoides en muchas ocasiones no refleja la actividad antioxidante de los extractos de los propóleos, por lo tanto se deben realiza ensayos de oxidación para determinar su efecto (Sulaiman *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Municipio, localidad de colecta, flavonoides y fenoles contenidos en los EP.

Municipio	Localidad	Flavonoides ¹ (mg/g de EP)	Fenoles ² (mg/g de EP)
Cortázar	San Isidro Calera ⁽³⁰⁾	130.3 ± 16.3	105.1 ± 2.0
	Dolores Hidalgo ⁽⁴⁾	150.8 ± 42.8	178.8 ± 12.1
	Cerro Blanco ⁽⁹⁾	218.3 ± 16.2	418.1 ± 44.8b
Dolores Hidalgo	Cerro Blanco ⁽¹⁰⁾	110.3 ± 6.1	206.7 ± 11.6
	Adjuntas del Río ⁽¹³⁾	177.7 ± 9.2	412.6 ± 6.6
	La Regadera ⁽²⁷⁾	220.3 ± 11.5	329.5 ± 10.5
Irapuato	La Regadera ⁽²⁸⁾	243.2 ± 3.9	316.8 ± 6.8
	El Copal ⁽¹⁴⁾	232.3 ± 16.4b	493.2 ± 21.7a
León	Santa Rita ⁽¹⁶⁾	165.0 ± 6.0	347.7 ± 26.3
	San Cristóbal de las Casas ⁽¹⁸⁾	88.3 ± 18.4	292.8 ± 17.2
	Capellanía de Loeria ⁽²⁴⁾	181.9 ± 3.0	183.7 ± 10.2
Purísima del Rincón	León ⁽²⁵⁾	347.0 ± 19.8a	438.2 ± 5.2b
	El Manso ⁽¹⁵⁾	125.7 ± 6.2	342.2 ± 15.1
	El Barrial ⁽¹⁷⁾	123.9 ± 7.9	230.3 ± 9.8
Romita	San Pedro ⁽²⁾	62.6 ± 21.4	139.4 ± 14.7
	San Clemente ⁽³⁾	70.6 ± 14.8	219.3 ± 7.0
San Felipe	Maravillas ⁽²⁰⁾	26.1 ± 2.9c	207.9 ± 5.2
	Jaral de Berrio ⁽²⁶⁾	98.3 ± 2.8	94.0 ± 5.9c
San Miguel Allende	Los Galvanes ⁽²⁹⁾	269.2 ± 41.2b	376.9 ± 18.8
Silao	Las Maravillas ⁽¹⁾	153.0 ± 21.3	172.1 ± 9.2
	La Noria ⁽⁵⁾	87.9 ± 9.6	200.5 ± 15.2
	El Acebuche ⁽¹⁹⁾	22.2 ± 5.3c	239.4 ± 19.5
Tarimoro	El Acebuche ⁽²¹⁾	379.2 ± 44.1a	500.9 ± 15.9a
	El Terrero ⁽²²⁾	131.4 ± 7.3	152.0 ± 8.2
	El Terrero ⁽²³⁾	161.4 ± 5.3	153 ± 16.2
Valle de Santiago	Valle de Santiago ⁽⁶⁾	21.7 ± 7.6c	81.1 ± 6.6c

Mesa de San Agustín ⁽⁷⁾	30.6 ± 10.8	68.8 ± 3.6c
Monte Valerio ⁽⁸⁾	13.2 ± 1.7c	81.8 ± 5.5c
Monte Valerio ⁽¹¹⁾	100.8 ± 9.5	211.9 ± 9.6
El Gavilán ⁽¹²⁾	160.8 ± 8.1	412.2 ± 13.9

¹El contenido total de flavonoides se obtuvo por el método colorimétrico de ALCL₃. ²El contenido total de fenoles se obtuvo por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.

^{a,b,c}Medias con diferente letra subíndice dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$). Las mediciones se realizaron cinco veces, las medias y las desviaciones estándar se indican.

BIBLIOGRAFÍA

- Huang S, Shang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. 2014. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* 19:19610–19632.
- Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84:329–339.
- Lagouri V, Prasianaki D, Krystalli F. 2013. Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Greek Propolis Extracts. *International Journal of Food Properties* 17:511-522.
- Laskar RA, Ismael SK, Nayan R, Naznin AB. 2010. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry* 122:233–237.
- Lei XG, Cheng WH, McClung JP. 2007. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annual review of nutrition* 27:41–61.
- McCay PB. 1985. Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Annual review of nutrition* 5:323–40.
- Sulaiman GM, Sammarrae A, Ad'hiah AH, Zacchetti M, Frapolli R, Bello E, Erba E, D'Incalci M, Bagnati R. 2011. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food and chemical toxicology* 49:2415–2421.
- Vera-Ramirez L, Sánchez-Rovira P, Ramírez-Tortosa MC, Ramírez-Tortosa CL, Granados-Principal S, Lorente JA, Quiles JL. 2011. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 80:347–368.
- Vongsak B, Kongkiatpaiboon S, Jaisamut S, Machana S, Pattarapanich C. 2015. *In vitro* alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 25:445–450.