

Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos

Guillermo Salamanca Grosso^{1*}, Ivonne L. Correa Carvajal¹ y Judith Principal²

¹ Grupo de Investigaciones Mellitopalínológicas y Propiedades Físicoquímicas de Alimentos, Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima, Colombia. *Correo electrónico: gsalaman@ut.edu.co

² Estación de Apicultura "Héctor Ochoa Zuleta" Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Tarabana, estado Lara. Venezuela

RESUMEN

Los flavonoides son compuestos químicos de origen botánico con marcada actividad biológica y han sido usados como marcadores de la calidad del propóleo. En este trabajo se presenta la metodología necesaria en la determinación cuantitativa de flavonoides totales usando dos métodos espectrofotométricos complementarios, basados en la reactividad diferencial del tricloruro de aluminio y 2-4 dinitrofenilhidrazina. Frente a flavonas, flavonoles y flavanonas las determinaciones se hicieron mediante espectrofotometría ultravioleta visible. Adicionalmente se evaluaron los índices de oxidación en un grupo de muestras de propóleos colombiano. Las determinaciones se realizaron sobre extractos alcohólicos usando etanol del 96% v/v (EEP). Las muestras fueron colectadas en los Departamentos de Arauca y Boyacá, en las zonas de vida de bosque húmedo tropical y seco montano bajo. Los índices de oxidación se determinaron siguiendo el test del permanganato de potasio en medio ácido. Las determinaciones para el contenido total de flavonoides variaron entre $7,50 \pm 0,01$ y $22,3 \pm 0,17\%$; los valores observados en el test de tricloruro de aluminio (flavonas y flavonoles) estuvieron entre $0,52 \pm 0,03$ y $3,25 \pm 0,04\%$ y para 2,4D (Flavanonas) entre $9,90 \pm 0,21$ y $11,78 \pm 0,26\%$ respectivamente. Los índices de oxidación observados en muestras con altos contenidos de flavonoides totales estuvieron por el orden de 2 a 10 segundos, demostrándose así la actividad antioxidante de las muestras analizadas y la calidad de los EEP de las zonas estudiada.

Palabras clave: propóleo, flavonoides, flavonas, flavonoles, flavanonas, determinación cuantitativa, métodos espectrofotométricos.

Flavonoid profile and oxidation indexes for some Colombian propolis

ABSTRACT

Flavonoids are chemical compounds of botanical origin with noticeable biological activity and have been used like markers of their quality properties. In this work we show the methodology for quantitative determination of total flavonoids, using two complementary spectrophotometric methods, based on the reactivity differential of aluminum trichloride and 2-4 dinitrophenylhydrazine. For flavonas, flavonoles and flavanonas the determinations were performed by ultraviolet visible methods. Additionally, oxidation indexes for Colombian samples were evaluated. The determinations were made on alcoholic extracts using ethanol of 96% v/v (EEP). The samples were collected at the Arauca and Boyacá Departments, in the tropical humid forest and dry mountain forest, respectively. The oxidation indexes were determined following the test of the permanganate of in acid media. Total content for flavonoids were 7.50 ± 0.01 to $22.3 \pm 0.17\%$ and using the trichloride test for flavones and flavanols, between 0.52 ± 0.03 and $3.25 \pm 0.04\%$. For 2,4D (Flavanones) results were 9.90 ± 0.21 and $11.78 \pm 0.26\%$ respectively. The oxidation index observed were 2 a 10 seconds, demonstrating their activity and quality.

Keywords: propolis, flavonoids, flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, quantitative determination, spectrophotometric method.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto de naturaleza compleja elaborado por las abejas a partir de resinas, aceites esenciales y polen que colectan en las zonas de vida donde realizan su actividad de pecoreo. En el proceso de recolección, transporte y almacenamiento a la colmena, adicionan sustancias enzimáticas y cera, de secreciones glandulares de la hipofaringe y glándulas cereras presentes en los esternitos del abdomen. Adicionalmente, puede añadir microelementos del entorno, donde el producto final es de consistencia viscosa, con tonalidades de color castaño, marrón, pardo, rojizo y verde, en algunos casos negro, según sea el origen botánico y geográfico (El Hady y Hegazi, 2002; Mohammadzadeh *et al.*, 2007).

El producto presenta propiedades anti inflamatorias, inmunoestimulantes, hepatoprotectoras, carcinostáticas, antimicrobianas, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos y de regeneración tisular. Diversos trabajos han demostrado que el propóleo es una fuente natural de antioxidantes, que protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación. Sus propiedades antioxidantes se deben a su actividad anti radicalaria particularmente, frente a radicales alcoxi y en menor grado, a superóxido y al efecto inhibitor sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Farré *et al.*, 2004; Principal, 2005).

Los propóleos están constituidos fundamentalmente por flavonoides, derivados de esteres y ácidos fenólicos. Walker y Crane (1987) reportaron la presencia de 38 flavonas, 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinámico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos. Los métodos instrumentales de análisis actualmente han permitido identificar entre 150 y 180 compuestos distintos en un mismo producto, demostrándose la variabilidad y complejidad del producto, que han dado validez y versatilidad de uso terapéutico (Hegazi y El Hady, 2001; Park *et al.*, 2002; Salamanca, 2002; Murat *et al.*, 2002).

Por su consistencia y estructura, los propóleos pueden clasificarse en dos grupos, los de naturaleza fluida y los balsámicos-oleorresinosos. Los primeros presentan una fracción importante de agentes volátiles, mientras que en los balsámicos predomina la consistencia densa, con bajo contenido de volátiles, susceptibles de polimerización y con frecuencia se percibe el aroma de las plantas en forma concentrada; en general son sustancias viscosas, semisólidas y cauchosas. En general, el propóleo presenta una consistencia variable, dependiendo de su origen y condiciones térmicas; se presenta como un material duro a los 15°C y se torna más maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión varía entre 60 a 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C (Salamanca *et al.*, 2004).

En principio se podría establecer una clasificación para los propóleos en función de su origen biogeográfico, tomando como referencia los contenidos de flavonoides y ésteres fenólicos observados en las muestras europeas y americanas, pero aun la información es incompleta. Las muestras asociadas al género *Populus spp.* contienen mezclas de agliconas flavónicas, ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres. En muestras rusas se han detectado agliconas de flavonas y en muestras brasileras se han encontrado principalmente derivados del ácido p-cumárico (Souza *et al.*, 2002; Murat *et al.*, 2002). El aroma en algunos casos es parecido al de su origen botánico, siendo amargo, picante y hasta astringente (Burdock, 1998; Salamanca, 2005).

La cuantificación de flavonoides en productos naturales y en particular en muestras de propóleo, usualmente se hace mediante cromatografía de capa fina (Didry *et al.*, 1990), análisis calorimétrico (Nagy y Grancai, 1996), cromatografía de gases (Christov y Bankova, 1992), cromatografía de gases acoplada a masas GC/MS (Bankova *et al.*, 1987) y cromatografía líquida de alta eficiencia (Vennat *et al.*, 1995). Los métodos por cromatografía de gases y de alta eficiencia aportan información definitiva en la caracterización de las muestras, pero presentan limitaciones importantes debido a los costos del equipamiento y la participación de personal con formación específica en el área instrumental. En

cambio, los métodos espectrofotométricos permiten cuantificar flavonoides con estructuras similares y son convenientes y apropiados en las determinaciones de rutina, aunque presenten limitaciones en la sensibilidad y especificidad. Las flavonas y flavonoles, desde el punto de vista reactivo, forman complejos estables con el tricloruro de aluminio y son susceptibles de analizar mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (Mabry *et al.*, 1970); entre tanto, las flavanonas y flavanonoles reaccionan mejor con el 2,4-Dinitrofenilhidrazina (Nagy y Grancai, 1996), situación que ha sido evaluada por Chang *et al.* (2002) y Kosalec *et al.* (2004), en la estimación de flavonoides totales en propóleos de Taiwán y Croacia.

Los flavonoides, desde el punto de vista estructural, corresponden a un sistema de 3 anillos fusionados en una secuencia de carbonos que presenta un heterociclo central en una estructura $C_6C_3C_6$, que ha sido discutida ampliamente por su estabilidad y reactividad (Amić *et al.*, 2003; Asres *et al.*, 2006). Estos compuestos suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos, condición que facilita su clasificación y reactividad frente respecto del tricloruro de aluminio y 2,4D. El uso de estos compuestos en la determinación de flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonas se encuentra bien documentado. En el primer caso se genera un complejo estable con un máximo de absorción a 415 nm (Jurd, 1962), que es sensible frente a apigenina, crisina y luteonina, así como en los flavonoles rutina, morina, quercetina, miricetina, kaempferol, quercitina y galangina. Las flavonas naringenina, naringina y hesperidina no presentan absorción importante con el tricloruro de aluminio, pero son activas con 2,4D con máximos de absorción a 495 nm. Las isoflavonas no presentan absorción a 415 y 495 nm (Chang *et al.*, 2002). La necesidad de cuantificar estos compuestos en propóleos comerciales es cada vez más frecuente, debido al incremento y desarrollo de preparados comerciales a base de propóleos. En consecuencia ha sido necesario acudir a las directrices establecidas en los manuales de buenas prácticas de manufactura, que permitan el aseguramiento inicial en la compra de materias primas para la elaboración de nuevos productos. Considerando las necesidades de los comercializadores de propóleos, se ha planteado el uso de dos técnicas complementarias: una de ellas con tricloruro de aluminio y 2,4 Dinitrofenilhidrazina (2,4D), como método de rutina para la cuantificación de flavonoides totales, flavonas flavonoides y flavanonas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y solventes

Todos los reactivos usados en este trabajo fueron de grado analítico. Etanol, metanol, acetato e hidróxido de potasio, ácido sulfúrico, cloruro de aluminio y 2,4 dinitrofenilhidrazina se compraron en la compañía Merck (Alemania), estándares de Naringenina y Quercetina se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Equipos

Se uso una centrifuga universal 0-4000 rpm, para la remoción de material insoluble luego de las operaciones de extracción en la obtención de EEP. Agitador mecánico y unidad Spectronic Génesis 5 Milton Roy, en celdas de 10 mm de cuarzo y programas SoftCard de control.

Muestras de propóleo

Se colectaron 8 muestras de propóleo crudo en el Departamento de Boyacá con una zona de vida de bosque seco montano bajo, con predominio de clima frío (13 a 14°C) a una altitud entre 2.400 y 2.800 msnm, en las siguientes localidades: Belén: 05°59'31" N y 72°55'00" E., 1.310 mm/año, Santa Rosa de Viterbo 05°57'20" N y 72°57'01" E. 764 mm/año, Cerinza: 05°57'28" N y 72°57'00" E. 1.055 mm/año, Cucaita: 05°32'45" N y 73°27'26" E. 760 mm/año, Nobsa: 05°46'24" N y 72°56'54" E y 760 mm/año; Paipa: 05°47'04" N y 73°06'47" E. 944 mm/año; Combita: 05°37'48" N y 73°19'48" E. 920 mm/año. Se incorporó además una muestra colectada en el Departamento de Arauca (Tame: 06°27'44" N y 71°44'20" E. 2.100 mm/año), en una zona de vida de bosque húmedo tropical con 28°C. Finalmente se usaron dos muestras de referencia remitidas a la Universidad del Tolima, desde la región de Mendoza (Argentina), para un total de 10 que se analizaron por triplicado. Éstas se acondicionaron convenientemente en recipientes estériles y herméticos de vidrio ámbar, que se mantuvieron de manera individual en refrigerador a 5°C, hasta el momento de la extracción.

Extractos etanólicos (EEP)

Los extractos de propóleos, fueron preparados como se indica a continuación: 20 g de muestra cruda, se

extrajeran con 30 mL de etanol del 96% (v/v), por 48 h a 25°C empleando un sistema mecánico de agitación continua; se realizó centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos para remover el material suspendido no soluble. Los extractos finales, se conservaron en frascos ámbar a 5°C.

Determinaciones con 2,4D

Un patrón de (\pm)-Naringenina fue usado como estándar de referencia. 20 mg del patrón, fue disuelto en metanol, las concentraciones finales fueron 500, 1.000 y 2.000 μ /mL. Un mililitro de cada disolución estándar se hizo reaccionar con 2 mL de 2,4D al 1% y 2 mL de metanol a 50°C por 50 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla fue disuelta con 5 mL de hidróxido de potasio al 1% en metanol del 70%, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, 1 mL de la mezcla fue tomado, mezclado con 5 mL de metanol y centrifugado a 1.000 rpm., durante 10 minutos para remover el precipitado. El sobrenadante fue colectado y ajustado a 25 mL. Las determinaciones analíticas se realizaron a 495 nm. Un mililitro del EEP se hizo reaccionar con 2,4D, con el propósito de estimar el contenido de flavanonas.

Determinaciones con $AlCl_3$

Un patrón de Quercetina fue usado para realizar la curva de calibración. 10 mg del reactivo, fueron disueltos en etanol al 80% y posteriormente, diluidos a 25, 50, 100 μ /mL. Las disoluciones de los estándares 0,5 mL, fueron mezclados con 1,5 mL de etanol del 95%, 0,1 mL de cloruro de aluminio del 10%, 0,1 mL de acetato de potasio 1 M y 2,8 mL de agua destilada. Después fueron incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, la absorbancia de la mezcla de reacción fue medida a 415 nm. Para el blanco la cantidad de cloruro de aluminio del 10% fue sustituido por agua destilada. Análogamente, 0,5 mL de EEP en 100 ppm, se hicieron reaccionar con cloruro de aluminio para la determinación del contenido de flavonas y flavonoles.

Oxidación

En la determinación de las propiedades antioxidantes, se tomaron 2 mL de EEP, los cuales se mezclaron con 48 mL de agua destilada. En un tubo de ensayo limpio y seco previamente enjuagado con mezcla sulfocrómica, se midió 0,5 mL del diluido de EEP,

0,5 mL de agua destilada y 1 mL de ácido sulfúrico al 20%. Todos los tubos se sometieron a refrigeración en baño de hielo a 18 a 20°C. Haciendo uso de una micropipeta de 50-200 μ L, se adicionaron 50 μ L de solución de permanganato de potasio (0,1 N), estandarizada frente a oxalato de sodio, a continuación, se puso en marcha un cronómetro, que permitió estimar el tiempo en cual la solución ácida de permanganato es reducida, condición que se fija con la evolución a iones manganeso (Mn^{2+}), con el registro del tiempo de la desaparición del color. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Las determinaciones de flavonas y flavonas-flavonoles, así como los índices de oxidación, se midieron por triplicado siguiendo la metodología descrita en cada caso como se indicó; las comparaciones entre los valores medios observados se hicieron empleando la prueba t de Student, con un nivel de confianza del 95%. Las curvas de calibración para los patrones de (\pm)-Naringenina y Quercetina se ajustaron siguiendo la metodología de mínimos cuadrados previa optimización y verificación de los coeficientes de correlación. Se realizaron análisis de varianza y se aplicó el test de Kruskal-Wallis, como prueba de hipótesis nula de igualdad entre los promedios de las determinaciones analíticas. Finalmente se realizó un análisis de conglomerados para las observaciones a través de estructura Euclídea, usando el método de Pérez (2002), para establecer las características de las muestras por similitud. Se usó el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los contenidos de flavonas, flavonoles, flavanonas y flavonoides totales presentes en las muestras de propóleo crudo colectado en las zonas mencionadas, así como las muestras de referencia argentinas, se muestran en el Cuadro 1, donde igualmente se han incluido los índices de oxidación típicos observados. En la estimación de la curva de calibración para flavanonas, se observó un coeficiente de correlación apropiado ($r^2 = 0,998$, (\pm)-Naringenina) y para flavonas y flavonoles ($r^2 = 0,999$ sobre Quercetina).

El análisis de varianza para el contenido de flavonas y flavonoles entre grupos y para el total de muestras

Cuadro 1. Equivalentes de Quercetina (flavonas y flavonoles), Naringenina (flavanonas) y flavonoides totales en muestras de propóleo colombiano.

Origen	Localidad	Flavonas y Flavonoles	%		Índice de oxidación S
			Flavanonas	Flavonoides Totales	
Boyacá	Combita	0,63 ± 0,02ab	11,8 ± 0,26fg	12,4 ± 0,08jk	4,98
	Cerinza	0,79 ± 0,01cd	6,70 ± 0,05	7,50 ± 0,01	117
	Santa Rosa	0,52 ± 0,03ba	4,90 ± 0,06	5,30 ± 0,01	19,2
	Paipa	2,82 ± 0,06	9,90 ± 0,21	12,7 ± 0,03kj	3,28
	Cucaita	3,25 ± 0,04	19,1 ± 0,40	22,3 ± 0,17	2,12
	Belén	0,90 ± 0,03dc	5,40 ± 0,17	6,30 ± 0,03	27,2
	Nobsa	1,97 ± 0,20	8,80 ± 0,08	10,8 ± 0,03	3,98
Arauca	Tame	1,42 ± 0,03e	18,8 ± 0,40hi	20,2 ± 0,17lm	112
Argentina	Argentina1	3,94 ± 0,08	11,5 ± 0,17gf	15,4 ± 0,06	1,60
	Argentina2	2,60 ± 0,01	17,5 ± 0,25ih	20,1 ± 0,06ml	1,60

analizadas indica diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores medios observados. El test de rangos múltiples indica que existe similitud entre las muestras de propóleos colectadas en las localidades de Combita y Santa Rosa, Belén y Cerinza. El contenido más alto para estos compuestos determinados a través del complejo con tricloruro dealuminio correspondió a las muestras de Paipa (2,82%) y Cucaita con (3,25%) y los más bajos en las muestras de Santa Rosa (0,52%) y Combita (0,63%). Los propóleos de mayor similitud a los argentinos han sido los de Paipa y Cucaita. Los valores individuales para estos flavonoides en todos los casos son inferiores a los reportados por Kosalec *et al.* (2004), pero comparables a los brasileros y taiwaneses, y menores que los chinos.

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de medias entre las muestras analizadas ($P < 0,0007$). En el caso de las flavanonas determinadas con el reactivo 2,4D, se ha encontrado similitud entre los propóleos de Combita y una de las muestras argentinas, con 11,8 y 11,5%, respectivamente, Tame y el segundo argentino con prevalencia ligeramente mayor para el total de flavanonas en el propóleo colombiano. No se presentaron diferencias significativas entre los valores medios de las determinaciones ($P < 0,05$), respecto de éste parámetro la muestra de Cucaita reveló ser la mayor del grupo. El test de Kruskal-Wallis indica que no hay igualdad de medias observadas para el

contenido de flavanonas. Las muestras taiwanesas contienen entre 17,6 a 21,8% de flavanonas y en los brasileros solo 7,12%, mientras que las de Dakova (Croacia) muestran promedios desiguales según sea la zona de origen, con 16,2 y 12,1% para las muestras del oeste y este, respectivamente, aunque se observan rangos relativamente amplios.

El contenido de flavones de los propóleos colombianos en algunos casos es comparable con los reportados por Chang *et al.* (2002) y Kosalec *et al.* (2004). Respecto de flavonoides totales, por los dos métodos empleados de manera complementaria, se observó un rango entre 5,30% (Santa Rosa) y 22,3% (Cucaita). Los resultados indican que hay un mayor contenido de flavonas, flavonoles y flavanonas en los EEP de Cucaita y Tame. Las muestras de EEP Argentinas (Mendoza) resultaron comparables con las colombianas. Como en las determinaciones globales para flavonas y flavonoles con $AlCl_3$ y flavanonas con 2,4D hay diferencias significativas ($P < 0,05$).

En cuanto a los índices de oxidación de los EEP, se observó que algunas muestras presentan tiempos reducidos frente al permanganato de potasio en medio ácido, cuyos valores se recogen en el Cuadro 1. Estas variaciones pueden asociarse con el tipo de compuestos presentes en los extractos analizados, que no necesariamente contienen flavonoides. En este sentido, Souza *et al.* (2002) han encontrado ácido canféico y ésteres que le confieren propiedades

diferentes a los propóleos. Igualmente, Graças *et al.* (2002) y Evandro *et al.* (2002) identificaron sesquiterpenoides, nerodiol y cinamato de metilo en muestras brasileras, los cuales modificarían la respuesta esperada del índice de oxidación y que bien valdría estudiar en las muestras con tiempos de oxidación atípicos observadas. Como referencia se suelen considerar valores hasta de 22 segundos como criterio comercial de calidad (Salamanca, 2002).

Los valores observados en la caracterización de propóleos colombianos muestran algunos índices de similitud entre los EPP, permitiendo encontrar características análogas entre sí. El análisis de conglomerados revela grupos de EEP similares para las muestras de Combita, Santa Rosa y Belén, un segundo grupo conformado por muestras de Paipa, Nobsa y Argentina1, y adicionalmente otro grupo compuesto por los extractos de Cucaita, Tame y Argentina2, como se ilustra en la Figura 1.

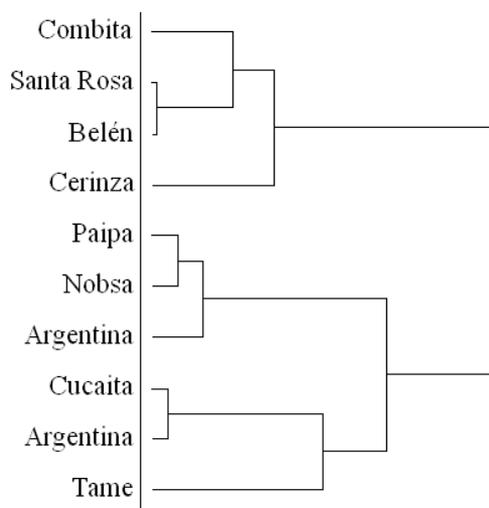


Figura 1. Estructura del análisis de conglomerados para los extractos etanólicos de propóleos colombianos en virtud al contenido de flavonas, flavonoles, flavanonas y tiempos de oxidación.

Los resultados globales observados en las muestras analizadas, deriva de las diferencias en la y diversidad de la flora predominante en cada una de las zonas biogeográficas donde se ha colectado las muestras. En el sector de Santa Rosa, la flora predominante es

Eucalipto (*Eucalyptus* spp), Tunacón (*Miconia squamulosa* Smith Triana), Encenillo (*Weinmania tomentosa* D.) y Acacia (*Acacia decurrens* Willd), mientras que en Belén y Cerinza predomina el bosque nativo donde se destacan el Encenillo y el Tunacon. En Paipa, la Feijoa (*Feijoa sellowiana* D) y Eucalipto son las principales especies establecidas en la proximidad de los apiarios, a diferencia de Nobsa donde solo predominan Eucaliptos. El Retamo (*Cytissus monspessulanus*), Ayuelo, Raque y Eucalipto es la oferta de exudados y resinas para las abejas de Combita, que es análoga a la existente en Cucaita donde adicionalmente se observan árboles de pino (*Pinus spp*), Retamo, Raque y Hayuelo (*Dodonea viscosa* L. Jacq) que es propia de la consociación de bosque seco montano bajo.

Es importante señalar que las muestras colectadas en Argentina corresponden al centro oeste de la república, cerca de la cordillera de los Andes, a 600 msnm, donde predominio son suelos áridos y clima continental, pero abundante riego artificial o deshielo de cordillera, inviernos rigurosos y verano cálido, donde hay presencia de álamos (*Populus* sp.) y sauces (*Salix* sp.) considerados como fuentes de resinas para la elaboración de propóleos por parte de *Apis mellifera*. La oferta floral de sector de Tame es más amplia y diversa, pues los apiarios se han establecido en la consociación de bosque húmedo tropical, se distingue el Bototo (*Cochlospermum vitifolium*), Chaparro (*Curatella americana* L.), Ceiba (*Ceiba pentadra* L.), Caucho (*Ficus elastica* Roxburg), Guayabo (*Psidium* sp), Mango (*Mangifera indica* L.), Ocobo (*Tabebuia rosea*) y Totumo (*Crescentia cujete* L.), entre otros.

CONCLUSIONES

El potencial y actividad biológica de los flavonoides presentes en muestras de propóleos usados en la preparación de productos de interés farmacéutico, los deja en posibilidad para ser determinados cuantitativamente. El trabajo permitió la evaluación e implementación de un método espectrofotométrico para la determinación de flavonas, flavanonas y flavonoles, presentes en propóleos colombianos y estimar sus índices de oxidación. Los resultados observados, muestran diferencias significativas entre las muestras, variaciones que están en función del origen biogeográfico y que se expresan a través del contenido de flavonoides totales con diferentes tiempos de oxidación. La técnica evaluada es simple y

el tiempo necesario no supera los 40 minutos, siempre y cuando se hayan realizado los EPP con suficiente anterioridad. Los métodos espectrofotométricos complementarios con Tricloruro de aluminio y 2,4-Dinitrofenilhidrazina exhiben sensibilidad, especificidad y selectividad en este tipo de cuantificaciones. En el primer caso se forman complejos de color amarillo formados específicos para flavonas y flavanoles (3,5-hidroxiflavonas y 3,5-hidroxiflavanoles) y en el segundo complejos de flavanonas con grupos hidroxilo en la posición C₅ como es el caso de genisteína, hesperetina y (±)-naringenina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a los evaluadores del artículo por sus aportes y sugerencias. De igual manera agradecemos al Comité Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima.

LITERATURA CITADA

- Amić D., D. Davidović-Amić, D. Bešlo y N. Trinajstić. 2003. Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat. Chem. Acta*, 76: 55–61.
- Asres K., A. Seyoum y K. F. Fathy Kandeel El-Fiky. 2006. Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochem.*, 67: 2058-2070.
- Bankova V., A. Dyulgerov, S. Popov y N. Marekov. 1987. A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z. Naturforsch. C. Biosci.*, 42: 147-151.
- Burdock G. 1998. A Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.*, 36: 347–363.
- Chang C. C., M. H. Yang, H. M. Wen y J. C. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.*, 10: 178-182.
- Christov R. y V.S. Bankova. 1992. Gas chromatographic analysis of underivatized phenolic constituents from propolis using an electron-capture detector. *J. Chromatogr.*, 623: 182-185.
- Didry N., L. Dubreuil y M. Pinkas. 1990. New procedure for direct bioautographic TLC assay as applied to a tincture of *Ranunculus bulbosus*. *J. Ethnopharmacol.*, 29, 283-290.
- Evandro A., E. A. Nascimento, S. A. Morais, R. Chang, D.C. Reis y R. K. Lima. 2002. Análise Preliminar da Própolis de Santa Bárbara, MG. Memórias 25 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, Minas Gerais. Brasil.
- Farré R., I. Frassetto y A. Sánchez. 2004. Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, 45: 21-43.
- Graças A., L. Cito, M.H. Chaves, J.A. Dantas Lopes, C.R. Oliveira Farias y M.S. Sousa da Silva. 2002. Triterpenóides de Própolis de Castelo do Piauí. Memórias 25a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, Minas Gerais. Brasil.
- El Hady F. y A. Hegazi. 2002. Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east Nile delta propolis. *Z. Naturforsch.*, 57: 386-394.
- Hegazi A. y F. El Hady. 2001. Egyptian propolis: 1 Antimicrobial activity and chemical composition of upper Egypt propolis. *Z. Naturforsch.*, 56: 82-88.
- Jurd L. 1962. Spectral properties of flavonoids compounds. *En Geissman T.A. (Ed.) The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Pergamon Press. pp. 107-155.
- Kosalec M., M. Bakmaz, S. Pepeljnjak y S.V. Kne. 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.*, 54: 65-72.
- Mabry T. J., K.R. Markham y M.B. Thomas. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag. New York.
- Marucci M.C., F. Ferreres, C. García-Viguera, V.S. Bankova, S.L. Castro, A.P. Dantas, P.H. Valente

- y N. Paulino. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.*, 74: 105–112.
- Mohammadzadeh S., S. Mohammad, M. Manoochehr Hamedi, Y. Amanzadeh, S. Sadat- Ebrahimi y N.S. Seyed Nasser Ostad. 2007. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem.*, 103: 729–733.
- McMurry J. 1992. *Organic Chemistry*. Third ed. Cole Publishing Company. New York.
- Mirzoeva O. K., R.N. Grishanin y P.C. Calder. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.*, 152: 239-246.
- Muñoz O., R. Peña, E. Ureta, G. Montenegro, C. Caldwell y B. Timmermann. 2001. Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. *Z. Naturforsch.*, 56: 273-277.
- Murat K., K. Serdar y K. Semra. 2002. GC/MS Analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z. Naturforsch.*, 57: 905-909.
- Nagy M. y D. Grancai. 1996. Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie*, 51: 100-101.
- Nieva M.I., M.I. Isla, N.G. Cudmani, M.A. Vattuone y A.R. Sampietro. 1999. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol.*, 68: 97–102.
- Park Y., S. Alentar y C. Aguiar. 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 2502-2506.
- Pérez C. 2002. *Estadística Práctica con Statgraphics*. Prentice Hall. Pearson education. Madrid.
- Principal J. 2005. El propóleo: Perspectivas terapéuticas en la medicina humana y veterinaria. *Memorias I Congreso Internacional de Apicultura de los Andes. III Convención de Apicultores*. Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Venezuela. pp. 57-60.
- Salamanca G.G. 2002. Origen naturaleza y características de los propóleos. *Memorias XVI Seminario Americano de Apicultura*. Secretaria de Agricultura Pesca y Alimentación. México. pp. 101-110.
- Salamanca G.G., C. Ramírez y L. Rubiano. 2004. Contenido mineral de los propóleos colectados en algunas zonas biogeográficas colombianas. *Rev. Inst. Univer. Chocó*, 20: 79-85.
- Salamanca G. 2005. Propiedades nutricionales y apiterapéuticas de los productos de la colmena. *Memorias I Congreso Internacional de Apicultura de los Andes. III Convención de Apicultores*. Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Venezuela. pp. 5-14.
- Souza R., M. Souza y J. Mendes. 2002. Análise de extratos aquosos e etanólicos de própolis por cromatografia líquida de alta eficiência. *Memórias 25 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*.
- Vennat B., A. Argouet-Grand, D. Gross y A. Pourrat. 1995. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids and identification of phenolic acids from a propolis extract. *J. Pharmacie Belgique*, 50: 438-444.
- Walker P. y E. Crane. 1987. Constituents of propolis. *Apidologie*, 18: 327-334.
- Wu P. y L. Ye. 2000. Determination of effective components in propolis. *Wei Sheng Yan Jiu.*, 29: 123-124.