

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Características antioxidantes de propóleos de diferentes orígenes geográficos

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

ALUMNO: Adrián Sánchez Hernández

TUTORA: M. Isabel Escriche Roberto

COTUTORA: Marisol Juan Borrás

Curso Académico: 2017/2018

VALENCIA, Julio 2018

Tipo Licencia: Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial–Sin Obra Derivada"



TÍTULO

Características antioxidantes de propóleos de diferentes orígenes geográficos

RESUMEN

En este trabajo se propone la determinación de la fracción fenólica y actividad antioxidante de 28 propóleos de distinto origen geográfico. Se analizó la cantidad de bálsamos de los distintos propóleos, también se cuantificó el contenido fenólico total y los flavonoides presentes. Por otro lado, se determinó la actividad antioxidante por distintos métodos: el método del DPPH, el ensayo del FRAP y la técnica del ABTS. Los propóleos de los diferentes países presentaron diferencias significativas en cuanto a la composición de la fracción fenólica, siendo los propóleos de Honduras los que menores cantidades de compuestos fenólicos presentaron, de la misma manera la actividad antioxidante no mostró diferencias significativas entre los distintos propóleos, salvo para propóleos de Honduras donde la actividad antioxidante también fue inferior. Por último se observó que para propóleos de España, procedentes de distintas zonas geográficas existían diferencias significativas en las características antioxidantes.

PALABRAS CLAVE

Propóleos, actividad antioxidante, flavonoides, flavononas, dihidroflavonoles, flavonas

TITLE

Antioxidant characteristics of propolis from different geographical origins

ABSTRACT

In this work we propose the determination of the phenolic fraction and antioxidant activity of 28 propolis of different geographical origin. The amount of balsams of the different propolis was analyzed, the total phenolic content and the flavonoids present were also quantified. On the other hand, the antioxidant activity was determined by different methods: the DPPH method, the FRAP test and the ABTS technique. The propolis of the different countries presented significant differences regarding the composition of the phenolic fraction, being the propolis of Honduras those that smaller amounts of phenolic compounds presented, in the same way the antioxidant activity did not show significant differences between the different propolis, except for propolis from Honduras where the antioxidant activity was also lower. Finally, it was observed that for propolis from Spain, from different geographical areas there were significant differences in the antioxidant characteristics.

KEY WORDS

Propolis, antioxidant activity, flavonoids, flavonones, dihydroflavonols, flavones

TÍTOL

Característiques antioxidants de pròpolis de diferents orígens geogràfics

RESUM

En este treball es proposa la determinació de la fracció fenòlica i activitat antioxidant de 28 pròpolis de distint origen geogràfic. Es va analitzar la quantitat de bàlsams dels distints pròpolis, també es va quantificar el contingut fenòlic total i els flavonoides presents. D'altra banda, es determine l'activitat antioxidant per distints mètodes: el mètode del DPPH, l'assaig del FRAP i la tècnica de l'ABTS. Els pròpolis dels diferents països van presentar diferències significatives quant a la composició de la fracció fenòlica, sent els pròpolis d'Hondures els que menors quantitats de compostos fenòlics van presentar, de la mateixa manera l'activitat antioxidant no va mostrar diferències significatives entre els distints pròpolis, excepte per a pròpolis d'Hondures on l'activitat antioxidant també va ser inferior. Finalment es va observar que per a pròpolis d'Espanya, procedents de distintes zones geogràfiques hi havia diferències significatives.

PARAULES CLAU

Pròpolis, activitat antioxidant, flavonoides, flavonones, dihidroflavonols, flavones

ALUMNO: Adrián Sánchez Hernández

TUTORA: M. Isabel Escriche Roberto

COTUTORA: Marisol Juan Borrás

VALENCIA, JULIO DEL 2018

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada"



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

Abreviatura	Nombre completo
EEP	Extracto etanólico de propóleo
°C	Grado centígrado
h	Horas
rpm	Revoluciones por minuto
µL	Microlitros
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
F-C	Folin-Ciocalteu
ppm	Partes por millon
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
ABTS	Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico
mM	Milimolar
M	Molar
G	Gramo
TEAC	Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox
P-G (2:1)	Pinocembrin-Galangin (2:1)
DNP	dinitrofenilhidrazina
n.s.	No significativo
s.d.	Desviación estándar
ANOVA	Análisis de la varianza

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Origen y propiedades del propóleo	1
1.2. Propiedades antioxidantes del propóleo.....	2
1.3. Métodos para la determinación de las características antioxidantes	4
1.3.1 Métodos para la cuantificación de flavonoides.....	6
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1. Muestras de propóleo.....	8
3.1.1. Preparación de las muestras de propóleo	8
3.2. Determinación del bálsamo (rendimiento).....	8
3.3. Determinación del contenido fenólico total.....	9
3.3.1. Ensayo de Folin-Ciocalteu	9
3.4. Determinación de flavonoides.....	9

3.4.1. Flavonas y Flavonoles.....	9
3.4.2. Flavononas y Dihidroflavonoles.....	10
3.5. Determinación de la actividad antioxidante.....	10
3.5.1. Ensayo del DPPH.....	10
3.5.2. Ensayo del FRAP.....	11
3.5.3. Ensayo del ABTS.....	11
3.6. Análisis estadístico.....	12
4. RESULTADOS.....	13
4.1. Curvas de cuantificación.....	13
4.2. Influencia del origen geográfico en los diferentes componentes de la fracción fenólica.....	14
4.3. Influencia del origen geográfico en la actividad antioxidante total.....	17
4.4. Influencia del origen geográfico español en la composición fenólica y actividad antioxidante total.....	18
5. CONCLUSIONES.....	20
6. REFERENCIAS.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de los flavonoides y sus derivados.....	3
Figura 2. Estructura general de flavonas y flavonoles.....	3
Figura 3. Ejemplos de flavononas.....	4
Figura 4. Estructura de Dihidroflavonoles.....	4
Figura 5. Estructura de los ácidos cinámicos.....	4
Figura 6. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.....	5
Figura 7. Estructura del ABTS+ antes y después de la reacción con el antioxidante.....	5
Figura 8. Curvas de calibrado.....	13
Figura 9. Diagramas box-whisker de la fracción fenólica por países.....	16
Figura 10. Resultados para la actividad antioxidante.....	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades y compuestos químicos del propóleo.....	2
Tabla 2: Muestras de propóleo procedentes de distintos orígenes geográficos.....	8
Tabla 3. Fracción fenólica de los EPP por países.....	15
Tabla 4. Valores medios por zona geográfica española para la determinación de los compuestos de la fracción fenólica y actividad antioxidante total de los distintos propóleos.....	19

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1	9
Ecuación 2	11
Ecuación 3	12

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen y propiedades del propóleo

La palabra propóleo proviene del griego *propolis*, PRO: “Delante de” y POLIS: “Ciudad”, lo que significa “delante de la ciudad”. Se trata de un producto de origen mixto, es decir tanto de origen animal como vegetal (Bonvehi et al., 1994), esto se debe a la participación de la abeja, la cual a partir de los exudados producidos por algunas partes de las plantas (yemas, corteza, ramas, frutos jóvenes, etc.) y mezclados con sus propias secreciones enzimáticas, polen y cera, constituyen lo que finalmente se conoce como el propóleo.

El propóleo tiene una coloración muy variable pudiendo ser marrón verdoso, marrón oscuro, verde oscuro, amarillo verdoso, castaño, rojizo e incluso negro, dependiendo de su origen geográfico y botánico (Mohammadzadeh et al., 2007). Es de sabor acre y amargo, su olor es dulce y muy aromático. Salamanca et al., (2000) analizaron una serie de propóleos que dio una idea a rasgos generales de la composición de estos, siendo: ceras 20-30%, resinas y bálsamos 40-50%, aceites etéreos o esenciales 5-10% y polen 4-5%. Datos similares fueron se obtuvieron mucho antes por Cizmarik y Matel en el año 1970.

A grandes rasgos, el propóleo se puede clasificar en dos tipos, propóleo tipo Brasil o propóleo tipo Europeo. El propóleo de tipo Brasil es rico en terpenoides y derivados prenilados de ácido p-cumárico (da Silva et al., 2006). Por el contrario la actividad biológica del propóleo de tipo europeo se debe principalmente a flavanonas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres (Bankova et al., 2002).

En la actualidad existen dos teorías que explican la formación y el origen de los propóleos, la primera teoría de Rosh, indica que el propóleo es recolectado por las abejas de más de quince días de edad, las cuales transforman las partículas resinosas en el propóleo, a través del movimiento de sus mandíbulas. La segunda teoría es la de Kustenmacher (1907), citado por Del Cueto (1994), que explica que el propóleo tiene como origen el residuo que queda tras procesar el polen por parte de las abejas nodrizas para alimentar a las crías. Por tanto se puede afirmar que el origen del propóleo es mixto, es decir proviene tanto de la digestión interna del polen como de la recolección externa de las resinas.

Las abejas utilizan el propóleo para sellar agujeros y otros orificios de la colmena, así como para reparar las paredes de las celdas, aumentar la integridad de la colmena, aumentando la resistencia de cuadros, tabiques, etc., evitar movimientos o vibraciones de los panales, y para aislar la entrada de la colmena de los fenómenos meteorológicos adversos y protegerla de sus enemigos (Orantes Bermejo, 2006). También se emplea como sustancia embalsamante, de animales intrusos de la colmena que las abejas no pueden transportar fuera tras su neutralización, así se consigue evitar la descomposición de los intrusos y reducir la presencia de patógenos (Ghisalberti, 1978).

El ser humano a utilizado el propóleo desde la antigüedad, especialmente los egipcios lo utilizaban para momificar cuerpos (Makashvili, 1978). No fue hasta principio de los sesenta cuando se empezó a realizar un estudio científico de este producto (Fierro Morales, 2000). Desde entonces numerosas propiedades beneficiosas para el ser humano se le han atribuido como la capacidad antimicrobiana, anestésica, cicatrizante y antiinflamatoria (Peña, 2008; Sforcin et al., 2002). Existen otras propiedades, tales como su efecto antioxidante, inmunoestimulante, inmunomodulador (Sforcin et al., 2005). Debido a estas características, existen una serie de fármacos a base de propóleo para el tratamiento de quemaduras, faringitis, rinitis, gingivitis, infecciones de las vías urinarias y úlceras

(Barros et al., 2006), también se le atribuyen propiedades antisépticas y como bactericida bucal (Fierro Morales, 2000).

Medellín Pico R. et al., (2007) resume en la tabla 1, las actividades biológicas de los distintos componentes del propóleo.

Tabla 1. Propiedades y compuestos químicos del propóleo

PROPIEDAD	COMPUESTO QUÍMICO
Antioxidante	Flavonoides, ácido caféico y fenetil ester
Antimicótico	Pinocembrina, ácido acético y caféico
Antibacterial	Pinocembrina, Kaempferol y ácido caféico
Antiséptico	Ácido Benzóico
Antiviral	Ácido caféico, luteolina y quercetina
Antimutagénica	Ácido ferúlico, cinámico y coumárico
Inhibición de tumores	Ácido caféico, fenetil ester, quercetina y crisina
Anestésico local	Pinocembrina
Antihemorrágico	Flavonoides
Curación de heridas	Ácidos fenólicos y flavonoides
Efecto aglutinante	Ácido ferúlico
Aumenta la biosíntesis de proteínas	Arginina
Curación de úlceras gastroduodenales	Luteolina, apigenina, pinocembrina y galangina
Histaminopéptica	Quercetina
Antiinflamatorio	Flavonoides y ácido caféico
Espasmolítico	Quercetina y Kaempferide
Promueve desarrollo de colágeno	Ácido ferúlico

Una de las características más importantes de los propóleos es que poseen importantes propiedades antioxidantes, sus componentes son agentes que intervienen en los procesos de oxidación, con el fin de evitar, disminuir o retrasar los daños celulares oxidativos (Procházková et al., 2011).

1.2. Propiedades antioxidantes del propóleo

Actualmente se han podido identificar más de 200 compuestos distintos en un mismo propóleo, dando validez y versatilidad de el uso terapéutico de este (Park et al., 2002; Salazar, 2002).

La oxidación celular es un fenómeno de naturaleza bioquímica, fundamental para la vida pues participa en los procesos de obtención de la energía, el problema existe cuando hay un exceso de oxidación, aquí aparece la formación de radicales libres y un aumento del estrés oxidativo, lo cual se ha relacionado con la aparición de numerosas enfermedades (envejecimiento celular, aterosclerosis, cáncer, catarata senil, insuficiencia renal, diabetes mellitus, hipertensión arterial, cirrosis) (Elejalde, 2001).

Los componentes principales son compuestos fenólicos (Chaillou, 2005), estos compuestos constituyen mezclas complejas que contienen compuestos de diversos grupos estructurales, de los cuales se destacan los flavonoides y los ácidos fenólicos. Los más comunes en el propóleo son: apigenina, kaempferol, pinocembrina, galangina, quercetina y hesperidina.

Los flavonoides fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, son compuestos fenólicos derivados del benzo-γ-pirano, formados por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C, lo cual nos permite clasificarlos en distintos grupos (Martínez-Flórez et al., 2002).

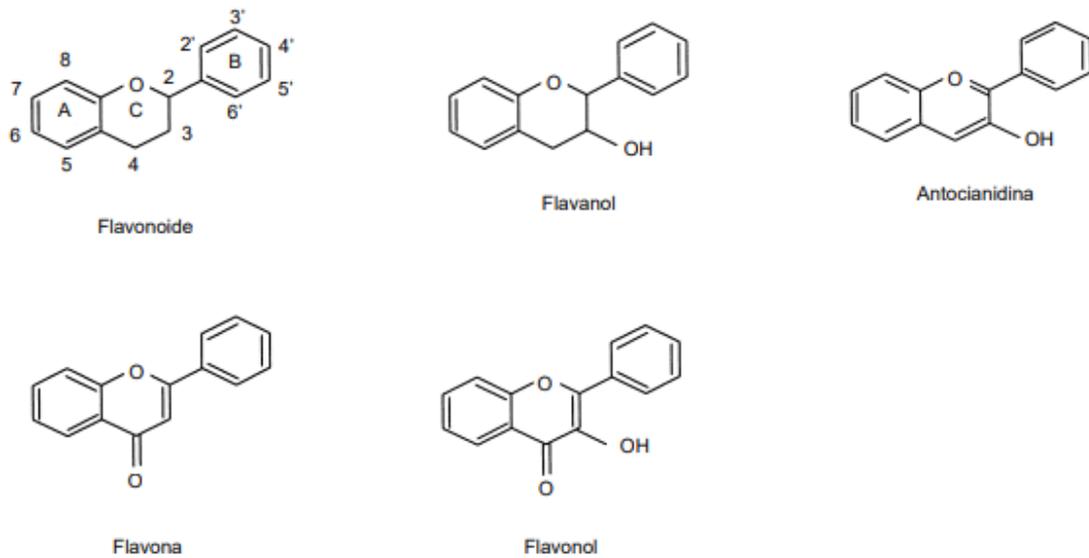


Figura 1. Estructura general de los flavonoides y sus derivados

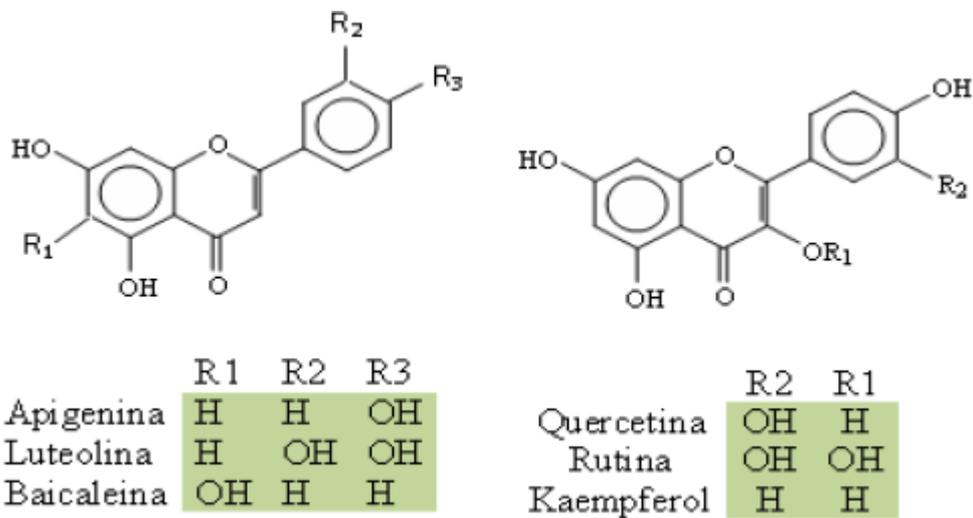


Figura 2. Estructura general de flavonas y flavonoles

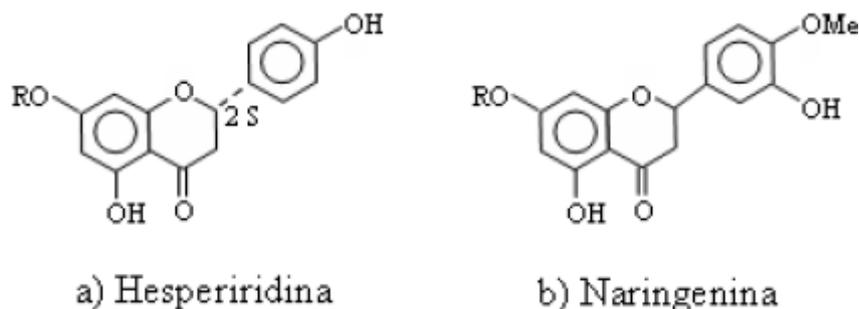


Figura 3. Ejemplos de flavononas

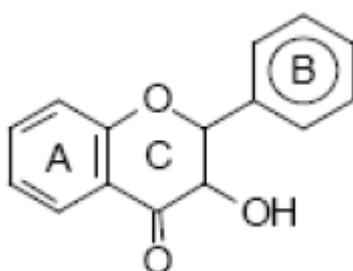


Figura 4. Estructura de Dihidroflavonoles

Los flavonoides tienen una estructura con un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, lo cual confiere unas excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, proporcionando así una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Harvesten, 1983; Pace-Asciak et al., 1995; Jang et al., 1997).

En cuanto a los ácidos fenólicos presentes en el propóleo, se agrupan en el grupo del ácido cinámico y sus derivados.

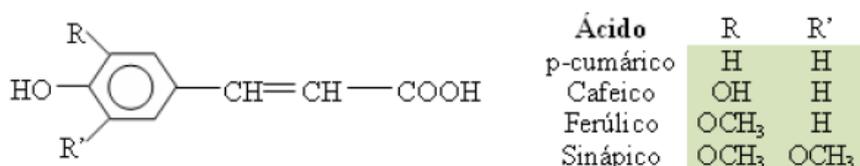


Figura 5. Estructura de los ácidos cinámicos

1.3. Métodos para la determinación de las características antioxidantes

La actividad antioxidante de un propóleo, consiste en evaluar de forma indirecta el contenido fenólico total, actualmente se realiza por distintos métodos entre los que podemos encontrar el ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C), que es un método muy utilizado en el ámbito agroalimentario, por su simplicidad y por ser un procedimiento estandarizado (Singleton et al., 1999). Este ensayo mide la capacidad de los componentes del propóleo con acción antioxidante, para reducir el reactivo de Folin (ácido fosfomolibdico/fosfotungstico) el cual inicialmente tiene una coloración amarilla y al reducirse pasa a una tonalidad azul, la cual puede ser monitorizada espectrofotométricamente.

Otro método muy utilizado, es el ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo). El DPPH es un radical libre estable que tiene un color característico violeta en solución metanólica, siendo su máximo de absorbancia a 517 nm. Cuando el DPPH reacciona con un sustrato dador de H^+ (antioxidante) el color violeta va desapareciendo. Este desvanecimiento se puede monitorear espectrofotométricamente, utilizándose para medir las propiedades antioxidantes.

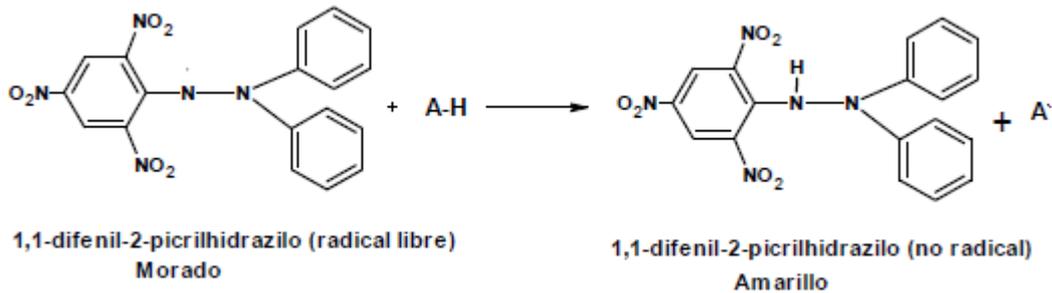


Figura 6. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante

De una forma similar a la anterior encontramos el ensayo del ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) que constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas (Re et al., 1999). Este método se fundamenta en la generación del radical catión ABTS en su forma estable, el cual posee una coloración azul, dicha coloración se va desvaneciendo en presencia de antioxidantes y puede ser monitoreada para calcular la actividad antioxidante de una muestra.

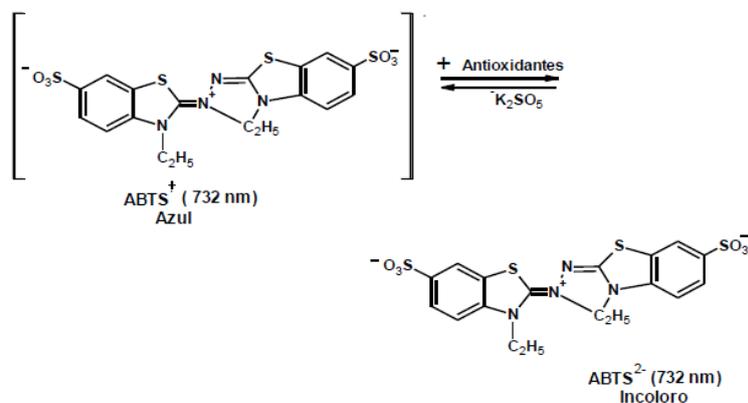


Figura 7. Estructura del ABTS^{·+} antes y después de la reacción con el antioxidante

También encontramos el ensayo del FRAP (ferric reducing/antioxidant power), que es un método empleado en la evaluación de la capacidad antioxidante de una muestra y está directamente relacionado, con la capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{3+}) presente en un complejo con la TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) hasta la forma ferrosa (Fe^{2+}). En presencia de antioxidantes el Fe^{3+} presente en el complejo formado con el TPTZ, pasa a su forma reducida (Fe^{2+}) y forma un complejo de color azul que tiene un máximo de absorbancia a 593 nm (Restrepo et al., 2009).

Tanto el ensayo de Folin-Ciocalteu como el ensayo del FRAP, son métodos de transferencia de electrones, en los que se supone que la capacidad de reducción del propóleo es una medida directa de

su capacidad antioxidante mediante una reacción colorimétrica redox (Serra y Lacalle, 2010). Los otros métodos mencionados para determinar la actividad antioxidante, son métodos más indirectos porque miden la inhibición de radicales libres los cuales dependen de las especies reactivas utilizadas.

Actualmente la capacidad antioxidante de una muestra se puede evaluar por cualquiera de los métodos nombrados anteriormente, entre otros, sabiendo que el resultado del contenido de fenoles (actividad antioxidante) es totalmente dependiente de la sustancia de referencia que utilizemos para realizar la curva de calibrado (Popova et al., 2004; Woisky y Salatino, 1998).

1.3.1 Métodos para la cuantificación de flavonoides

Los distintos estudios existentes señalan que la actividad antioxidante principal de los propóleos es debida a los flavonoides (Menezes, 2005), por ello la relación flavonoides-efecto biológico de los propóleos revela el interés de cuantificar estos constituyentes (Bruschi *et al.*, 2003).

Los procedimientos espectrofotométricos son ampliamente utilizados para determinar los flavonoides totales en propóleos. Sin embargo no se pueden determinar los flavonoides totales con un solo método.

Las flavonas y flavonoles son capaces de formar un complejo estable con el cloruro de aluminio, produciéndose un corrimiento batocrómico con intensificación de la absorbancia a 425-428 nm, que puede ser cuantificado por el método del cloruro de aluminio (Chang et al., 2002). En cambio la determinación de flavanonas y dihidroflavonoles, se basa en la capacidad de estos compuestos de reaccionar con el 2,4 DNP para formar 2,4 dinitrofenilhidrazonas, compuestos que son coloreados y que poseen un máximo de absorbancia a 495 nm (Chang et al, 2002).

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo ha sido evaluar la influencia del origen geográfico del propóleo en su fracción fenólica y actividad antioxidante.

Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Cuantificar la fracción fenólica desde el punto de vista del contenido fenólico total y flavonoides (flavonas-flavonoles y flavononas-dihidroflavonoles) en propóleos de diferentes procedencias geográficas.
- Cuantificar la actividad antioxidante total (aplicando diferentes métodos) en propóleos de diferentes procedencias geográficas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras de propóleo

Un total de 28 muestras de propóleos procedentes de distintos orígenes geográficos, fueron utilizadas para la realización de los distintos análisis. Las muestras se conservaron a -18°C , evitando en la medida de lo posible su contacto con la luz incluso durante el momento de su análisis.

En la tabla 2 se indica la codificación utilizada para cada una de las muestras, así como su lugar de procedencia.

Tabla 2: Muestras de propóleo procedentes de distintos orígenes geográficos

Origen	Código	Origen	Código
España (Valencia)	E1	Rumanía	R5
España (Gestalgar)	E2	Rumanía	R6
España (Sierra Mariola)	E3	Rumanía	R7
España (Barxeta)	E4	Rumanía	R8
España (Montroy)	E5	Rumanía	R9
España (Sierra Mariola)	E6	Honduras	H1
España (Valencia)	E7	Honduras	H2
España (Valencia)	E8	Honduras	H3
España (Ayora)	E9	Brasil	B1
España (Valencia)	E10	Brasil	B2
Rumanía	R1	China	C1
Rumanía	R2	China	C2
Rumanía	R3	Lituania	L1
Rumanía	R4	Ucrania	U1

3.1.1. Preparación de las muestras de propóleo

Para el análisis de las características antioxidantes de los propóleos se realizó una extracción etanólica de los principios activos de los propóleos. La extracción se realizó siguiendo el método de doble ultrasonificación descrito por Escriche y Juan-Borras (2018), con ciertas modificaciones. Se pesaron dos gramos de propóleo finamente triturado y se mezclaron con 30 mL de una solución etanólica al 70% (70:30 etanol:agua). Esta solución se llevó a ultrasonificación durante 30 minutos y se centrifugó durante 5 minutos (5000 rpm a 5°C), el sobrenadante se recogió del residuo por filtración (Whatman 3). Se hizo una segunda extracción con el residuo y ambos sobrenadantes (primera y segunda extracción) se recogieron en un matraz volumétrico y se aforó hasta 100 mL con la solución etanólica al 70%.

3.2. Determinación del bálsamo (rendimiento)

Una forma de estandarizar cuantitativamente los compuestos fenólicos presentes en un propóleo, consiste en calcular su rendimiento, ya que los propóleos crudos contienen algunas impurezas como pueden ser ceras, restos de abejas, suciedad... Los propóleos con mayor contenido en resinas y bálsamos son los que presentan un mayor contenido en componentes biológicamente activos (Banskota et al., 2001).

El cálculo del porcentaje de bálsamo presente en los propóleos nos da información de la cantidad de componentes fenólicos que hay presentes en el EEP, de esta forma un alto porcentaje de bálsamo nos indicará que la cantidad de ceras y sustancias no solubles es baja (Popova et al., 2007). El porcentaje de bálsamo se calculo de acuerdo con este autor, para ello 2 mL de cada EPP se llevaron a sequedad hasta peso constante, el porcentaje de bálsamo presente en el extracto etanólico se calculó como la relación existente entre la masa de la fracción soluble en etanol y el peso del propóleo crudo, de acuerdo con la ecuación 1.

$$\%Balsamo = \left(\frac{\text{masa soluble extraida del extracto}}{\text{masa de propoleo crudo}} \right) * 100$$

Ecuación 1

3.3. Determinación del contenido fenólico total

3.3.1. Ensayo de Folin-Ciocalteu

El ensayo se realizo de acuerdo a lo descrito por Cicco et al. (2009), con alguna modificación, donde 100 µL de EEP fueron mezclados con 1900 µL de agua bidestilada (sistema Milli Q) y 100 µL del reactivo de F-C (Scharlab; Barcelona, España). Pasados exactamente 2 minutos, se adicionaron 800 µL de carbonato sódico (Scharlau; Barcelona, España) al 5% (p/v), el blanco se preparo igual sustituyendo el EEP por etanol al 70%. Tras homogenizar la mezcla mediante un vortex, se incubo a 40°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se enfrió rápidamente en hielo para detener la reacción y a continuación se midió la absorbancia a 760 nm, haciendo uso de un espectrofotómetro (Helios Alpha UV-Vis). Una mezcla de pinocembrina-galangina (2:1) (Sigma–Aldrich; St. Louis, MO, USA) fue utilizada para elaborar la curva patrón, para un rango de concentraciones de 0 a 300 mg/L.

3.4. Determinación de flavonoides

3.4.1. Flavonas y Flavonoles

El contenido de flavonas y flavonoles se determino por el método colorimétrico del cloruro de aluminio descrito por Chang et al (2002). Cada EEP se mezcló con 1.5 mL de etanol al 96%, 0.1 mL de cloruro de aluminio (Panreac; Barcelona, España) al 10% (p/v) en etanol, 0.1 mL de acetato de potasio (Panreac; Barcelona, España) 1M y 2.8 mL de agua bidestilada. La mezcla, se incubo a temperatura

ambiente durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 415 nm haciendo uso de un espectrofotómetro (Helios Alpha UV-Vis). Se realizó un blanco, sustituyendo el EEP por agua destilada.

Para realizar la curva patrón, se utilizó quercetina (Sigma–Aldrich; St. Louis, MO, USA) a distintas concentraciones (10, 25, 50, 100 mg/L), utilizando como disolvente una solución etanólica al 70%.

3.4.2. Flavononas y Dihidroflavonoles

Para la determinación, se utilizó método descrito por Nagy y Grancai (1996) con algunas modificaciones. Se hizo reaccionar 1 mL de cada EEP, con 2 mL de DNP (Alfa Aesar, Kandel, Alemania) al 1% (1 g de 2,4-D, 2 mL de ácido sulfúrico al 96% y diluido hasta 100 mL con metanol) y 2 mL de metanol. La mezcla se mantuvo a 50 °C durante 50 minutos, después de enfriar a temperatura ambiente se añadió 5 ml de hidróxido potásico al 1% (p/v) en metanol al 70% y se incubó durante 2 minutos. A continuación se cogió 1 mL y se mezcló con 5 mL de metanol, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se aforó hasta 25 mL con metanol. La absorbancia se midió a 495 nm. Se realizó un blanco sustituyendo el EEP por agua destilada.

Para calcular el contenido total en flavononas y dihidroflavonol se preparó una curva de calibrado con una serie de diluciones de naringenina (Sigma–Aldrich; St. Louis, MO, USA) (500, 1000, 2000, 3500, 4000 mg/L) preparadas en metanol. El resultado se expresó como g de naringenina por 100 gramos de bálsamo.

Todos los ensayos descritos se realizaron por triplicado. Cuando la señal respuesta del EEP sobrepasaba el rango de concentraciones de las diferentes curvas de cuantificación, se realizaban las diluciones pertinentes.

3.5. Determinación de la actividad antioxidante

3.5.1. Ensayo del DPPH

El ensayo se llevó a cabo como describe Brand-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones. Diariamente se preparó una solución de 6.5×10^{-5} M de DPPH (Alfa Aesar; Kandel, Alemania) en metanol la cual se protegió en todo momento de la luz en un frasco topacio. A continuación se mezclaron 3 mL de la solución de DPPH con 0.75 mL de cada EEP, haciendo un blanco con metanol. Las mezclas fueron homogenizadas, haciendo uso de un agitador vortex y posteriormente se incubó a 25°C durante una hora en la oscuridad. Pasado este tiempo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro (Helios Alpha UV-Vis) a 517 nm. Los resultados fueron convertidos a porcentaje de inhibición relativo el cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo con la ecuación 2.

$$\%Inhibición = \%I = \frac{A - A_1}{A} * 100$$

Ecuación 2

A= Absorbancia del blanco

A₁= Absorbancia de la muestra

3.5.2. Ensayo del FRAP

El ensayo FRAP, se realizó de acuerdo con el procedimiento utilizado por Serra y Lacalle (2010). Brevemente, el reactivo FRAP, se preparó diariamente: 2.5 mL del reactivo TPTZ (Labkem; Barcelona, España) 10 mM en HCl 40 mM, 2.5 ml de FeCl₃ x 6H₂O (Labkem; Barcelona, España) y 25 mL de un tampón de acetato sódico (Scharlau; Barcelona, España) 0.25M. Se mezcló 0.4 mL de cada EEP con 3.6 mL de reactivo FRAP, posteriormente se incubó la mezcla a 37°C durante 10 minutos y seguidamente, tras enfriar a temperatura ambiente se midió su absorbancia a 593 nm (Helios Alpha UV-Vis). El blanco fue preparado sustituyendo la misma cantidad del extracto de propóleo por etanol al 70%. Para la recta de calibrado se usó una solución acuosa de FeSO₄x7H₂O en un rango de concentraciones de 200, 400, 800 y 1000 µM. Finalmente el resultado se expresó como µmol de Fe₂ sulfato/ g balsamo. Se realizaron las diluciones pertinentes del EEP para que se ajustaran a la recta de calibración.

3.5.3. Ensayo del ABTS

La capacidad de eliminación de radicales libres por el método del ABTS se realizó según lo descrito por Re et al. (1999), con alguna modificación.

Se preparó una solución acuosa de ABTS (Molekula; Munchen, Alemania) 7 mM y una solución de persulfato de potasio (Panreac; Barcelona, España) 140 mM. El radical ABTS⁺ se formó añadiendo a la disolución inicial de ABTS, el persulfato de potasio hasta una concentración final de 2.45 mM. Dicha mezcla se dejó reaccionar durante 12-16 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente. Se diluyó el radical con etanol hasta conseguir una absorbancia de 0.70 (±0.02) a 734 nm (Helios Alpha UV-Vis). A continuación se mezcló 20 µL del EEP con 1980 µL de la solución de ABTS⁺ y la absorbancia se midió después de 5 minutos, se realizó un blanco sustituyendo el EEP por etanol.

El porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺ se calculó de acuerdo con la ecuación 3.

Los resultados fueron expresados como la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), en µmol Trolox/g balsamo. Para ello se preparó una curva de calibrado sustituyendo el extracto de propóleo por una solución de Trolox con un rango de concentraciones de 0, 250, 500, 1000, 1500, 2000 µM en etanol.

$$\%Inhibicion\ ABTS^+ = \left(\frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right) * 100$$

Ecuación 3

Abs_{muestra}= absorbancia de la mezcla tras realizar el ensayo

Abs₀= absorbancia del ABTS⁺

3.6. Análisis estadístico

Se aplicó un análisis simple de la varianza simple para el factor “origen geográfico” de cada uno de los parámetros analizados (determinación de: bálsamos, contenido fenólico, flavonoides y actividad antioxidante total), con el fin de evaluar la existencia de diferencias estadísticas a un nivel significativo $\alpha=0,05$. El programa estadístico empleado para este estudio fue Statgraphics Centurion XVI (statpoint. Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Curvas de cuantificación

Para llevar a cabo la cuantificación del contenido fenólico total (Folin-Ciocalteu), flavonoides (flavonas-flavonoles y flavononas-dihidroflavonoles) y actividad antioxidante (ABTS y FRAP) en los distintos propóleos estudiados, el primer paso fue realizar las oportunas curvas de calibrado (figura 8).

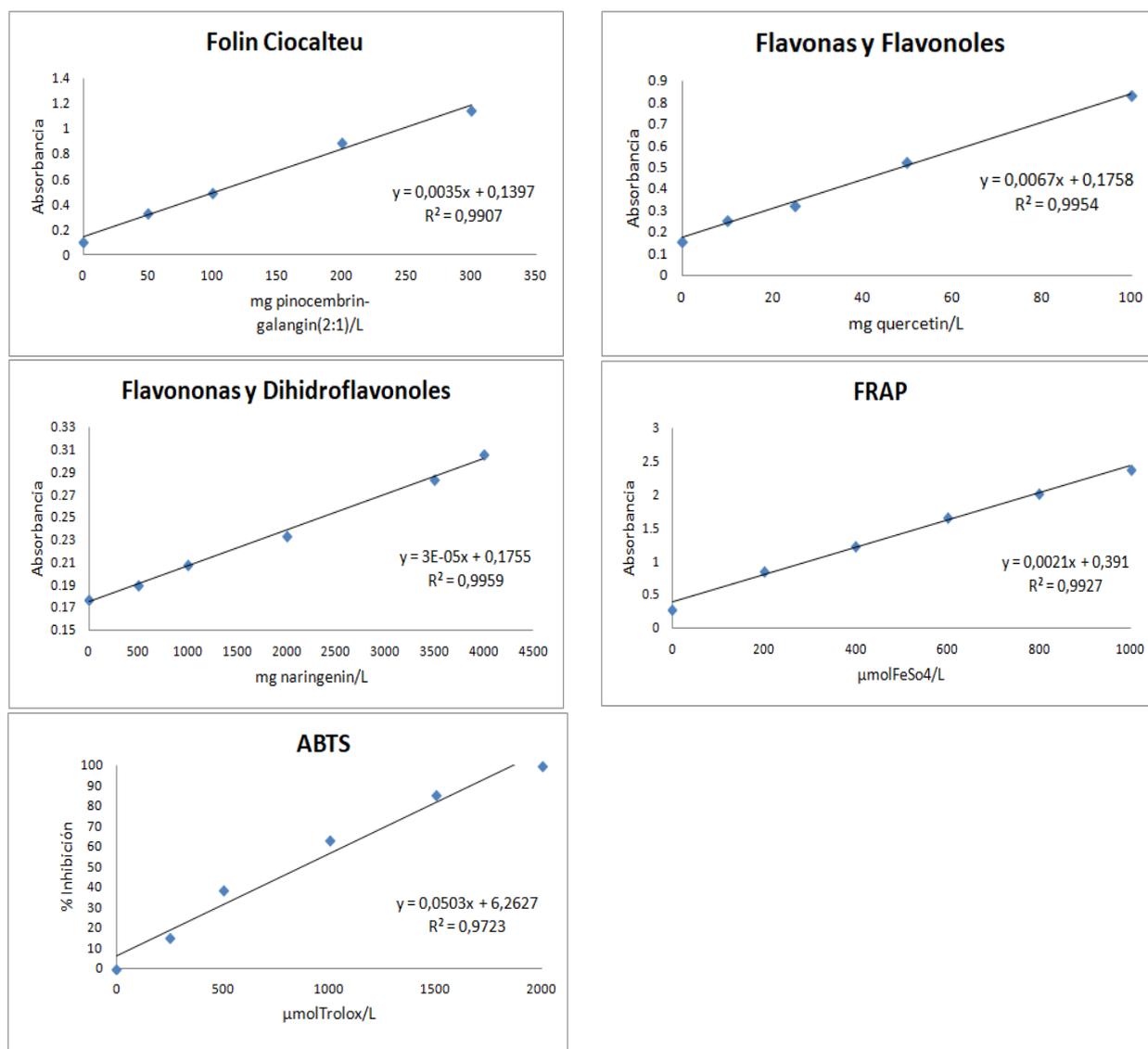


Figura 8. Curvas de calibrado obtenidas para la cuantificación del contenido fenólico total (Folin-Ciocalteu), flavonoides (flavonas-flavonoles y flavononas-dihidroflavonoles) y actividad antioxidante (ABTS y FRAP).

En cada caso se empleó la correspondiente sustancia de referencia tal y como se ha explicado en material y métodos. En concreto se utilizaron: mezcla de pinocembrina-galangina (2:1) para el contenido fenólico; flavonol quercetina para flavonas-flavonoles; flavonona naringenina para flavononas-dihidroflavonoles. De la misma manera para la evaluación de la actividad antioxidante total

por el método FRAP, la curva patrón se realizó con FeSO_4 , mientras que para el método del ABTS^+ (expresado como TEAC) se empleó como referencia el Trolox.

Los valores de R^2 oscilaron entre 0.9723 y 0.9959 lo cual indica la buena linealidad de los diferentes métodos empleados y por lo tanto idoneidad de las rectas para realizar las correspondientes cuantificaciones.

4.2. Influencia del origen geográfico en los diferentes componentes de la fracción fenólica

En la tabla 3 se muestra el contenido fenólico total y flavonoides (flavonas-flavonoles y flavononas-dihidroflavonoles), expresados como gramos de compuesto por 100 gramos de bálsamo. Para cada país se muestran los valores medios, la desviación estándar así como el valor máximo y mínimo obtenido. También se muestran los resultados del ANOVA (F-ratio pValor) y los grupos homogéneos.

El valor medio del contenido en bálsamo de los propóleos osciló entre 33.1 de Ucrania y 54.5 g/100g de Rumanía. El ANOVA no mostro diferencias significativas debido a la dispersión de los datos, resultante de la variabilidad de las muestras en algunos países; por ejemplo para España los datos del bálsamo oscilaron entre 20.6 y 78.4 g/100g y para Rumanía entre 27.7 y 81.8 g/100g.

En cuanto al contenido medio de fenoles totales los resultados más elevados los obtuvo Ucrania (58.7 g/100g), China (43.4 g/100g), seguido de España (32.6 g/100g) y Rumania (28.3 g/100g), siendo el menor el de Honduras (11.3 g/100g). Valores similares fueron obtenidos en el estudio realizado por Escriche y Juan-Borras (2018) en muestras de propóleo procedentes de España (33.0 g/100g), Rumania (31.5-34.9 g/100g) y Honduras (9.9 g/100g).

El mismo comportamiento, al observado para el contenido medio de fenoles totales, se aprecia para flavonas y flavonoles con valores de 17.8, 17.7, 8.1 y 4.6 g/100g para Ucrania, China, España y Rumanía respectivamente. De nuevo, Honduras mostró el menor valor en estos compuestos (0.4 g/100g). Con lo que respecta a flavononas y dihidroflavonoles, la tendencia anteriormente observada se mantiene para Ucrania (39.9 g/100g), China (17.8 g/100g) y España (8.6 g/100g). En este caso, Brasil mostro un contenido mayor (6.5 g/100g) que Rumania (5.9 g/100g), el menor valor fue nuevamente mostrado por los propóleos de Honduras (0.7 g/100g). En estudios similares Chang et al. (2002) obtuvo en flavonas-flavonoles y flavononas-dihidroflavonoles, valores similares para propóleos de Brasil (3.26 y 7.12 g/100g, respectivamente) e inferiores en propóleos de China (5.37 y 10.03 g/100g, respectivamente).

El resultado obtenido tras realizar el ANOVA mostró diferencias significativas para estas tres fracciones (fenoles totales, flavonas-flavonoles y flavononas-dihidroflavonoles), con respecto al factor origen geográfico. Para una mejor visualización de estas diferencias en la figura 9 se muestran los diagramas de box-whiskers, resultantes de dicho ANOVA. Estos diagramas muestran, para cada parámetro analizado, los valores medios, las medianas, el 50% de los datos (en gris) y los límites superior e inferior. Según se desprende de la figura 9, la mayor dispersión observada es para España y Rumanía, lo cual es lógico, ya que en ambos casos se dispuso de una mayor cantidad de muestras.

Tabla 3. Fracción fenólica de los EPP por países. Valores expresados como g por cada 100g de bálsamo. El valor se expresa como media (desviación estándar), así como el valor máximo y mínimo obtenido en cada uno de los análisis. También se muestran los resultados del ANOVA (F-ratio pValor) y los grupos homogéneos. Los valores seguidos por las mismas letras no difieren estadísticamente entre sí en un nivel de significación del 5%.

PAIS	Bálsamo (g/100g)		Fenoles totales (g/100g)		Flavonas y Flavonoles (g/100g)		Flavononas y dihidroflavonoles (g/100g)	
	Media (desviación)	Max/min	Media (desviación)	Max/min	Media (desviación)	Max/min	Media (desviación)	Max/min
España	49.4 (19.1)	78.4/20.6	32.6 (11.4) ^d	69.2/12.7	8.1 (4.9) ^b	16.7/0.8	8.6 (3.5) ^c	14.9/3.9
Rumanía	54.5 (15.2)	81.8/27.7	28.3 (4.9) ^c	36.8/19.2	4.6 (2.3) ^a	8.5/2.0	5.9 (3.0) ^b	12.7/1.8
Honduras	45.0 (13.4)	56.0/27.2	11.3 (4.6) ^a	18.9/5.1	0.4 (0.1) ^a	0.5/0.4	0.7 (0.4) ^a	1.5/0.3
Brasil	44.7 (5.6)	50.6/37.5	20.8 (5.9) ^b	27.4/14.9	2.5 (2.0) ^{ab}	4.0/1.1	6.5 (0.3) ^{bc}	7.0/6.1
China	52.3 (1.9)	55.0/49.9	43.4 (8.0) ^e	53.7/34.2	17.7 (1.7) ^c	18.9/16.5	17.8 (5.9) ^d	24.9/12.3
Lituania	53.2 (3.2)	55.4/49.5	19.9 (0.7) ^{abc}	55.4/49.5	3.9 (0.1) ^{ab}	4.0/3.8	1.5 (0.2) ^a	1.7/1.4
Ucrania	33.1 (0.8)	34.2/32.7	58.7 (12.4) ^f	61.4/55.4	17.8 (0.1) ^c	18.0/17.8	39.9 (1.5) ^e	41.6/38.8
ANOVA								
F _{ratio}	1.11		19.62		7.68		74.20	
pValor	0.3643		0.0000		0.0002		0.0000	

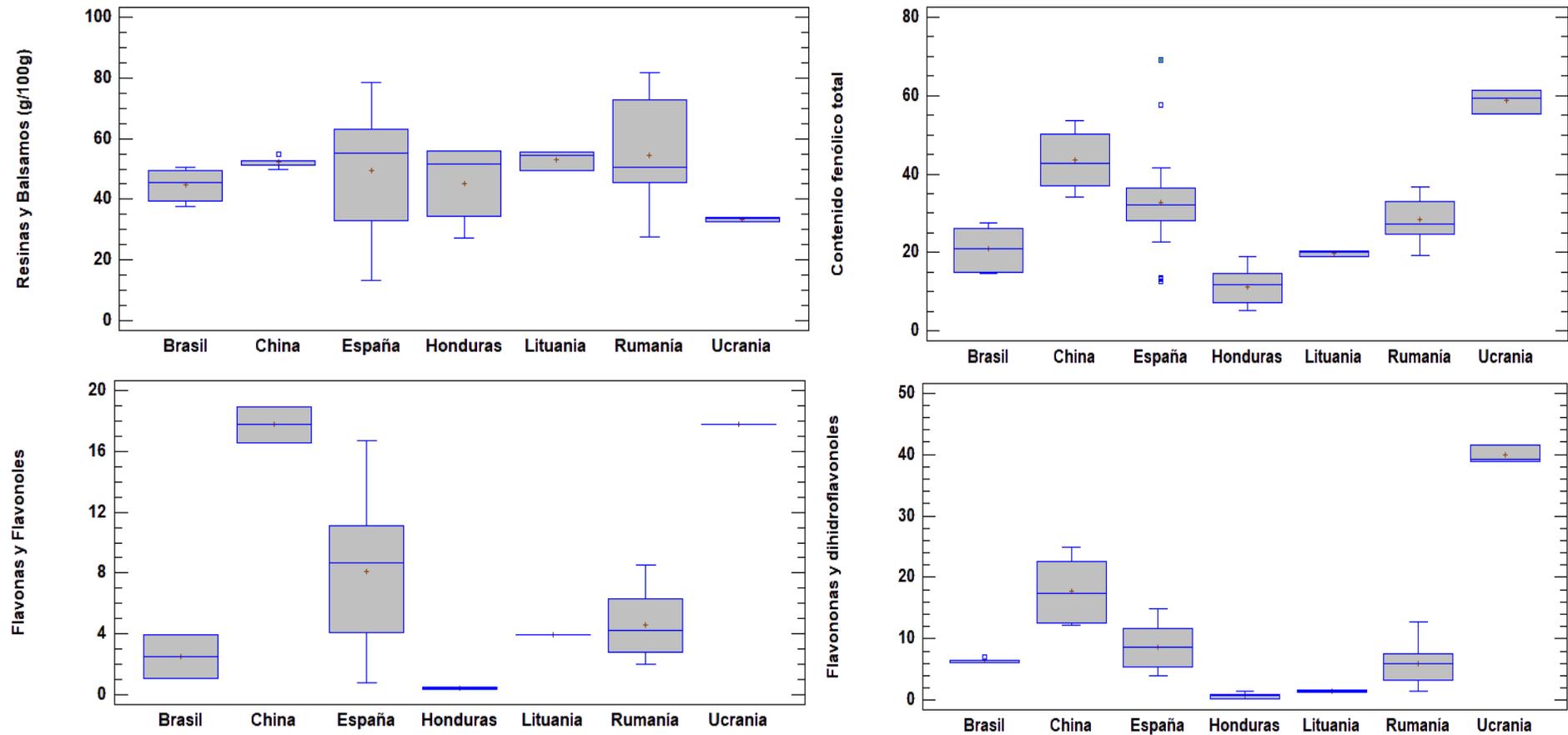


Figura 9. Diagramas box-whisker de la fracción fenólica por países.

4.3. Influencia del origen geográfico en la actividad antioxidante total

En la figura 10 se muestran los resultados medios y desviación estándar (barras de error) obtenidos, para la actividad antioxidante (cuantificada en los propóleos de los diferentes países) expresada como porcentaje de inhibición relativa del radical DPPH⁺ y ABTS⁺, así como TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g}$ de balsamo) y FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ de bálsamo). La figura también muestra los grupos homogéneos resultantes del ANOVA realizado para el factor país.

El porcentaje medio de inhibición del radical DPPH⁺, osciló entre un mínimo de 52.0% en los propóleos de Honduras y un valor máximo medio de 79.9%, sin diferencias significativas para el resto de países. El mismo comportamiento se observa en relación al radical ABTS⁺ con un porcentaje mínimo de inhibición del 54.0% para Honduras y un máximo de 73.6% para España, sin diferencias significativas para el resto de países. Como era de esperar, los resultados obtenidos por ambos métodos son similares, aunque se observa una ligera discrepancia de los resultados obtenidos por ambos métodos para algunos países. La discrepancia entre los resultados obtenidos por ambos procedimientos, ha sido anteriormente reportada por otros autores (Serra y Lacalle, 2011 ; Prior et al., 2005). Estos afirmaron que los radicales pueden reaccionar de forma diferente en algunos casos, dependiendo de la naturaleza química y física del antioxidante.

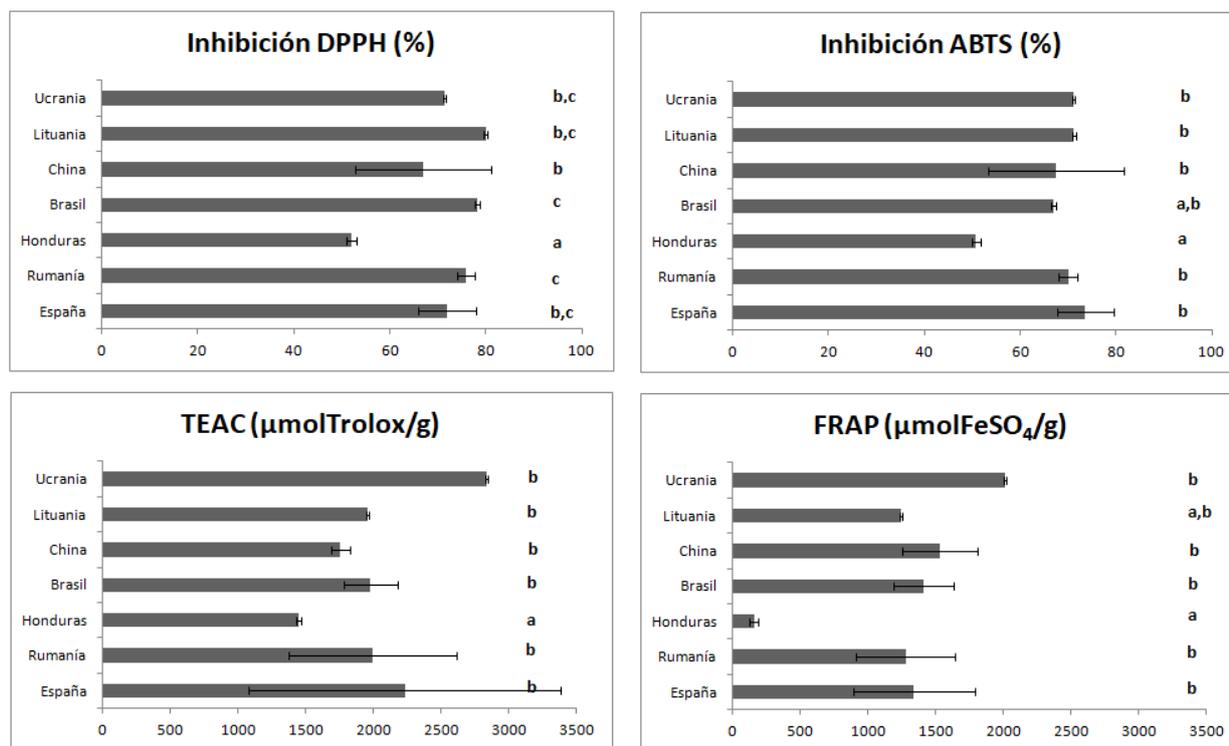


Figura 10. Resultados medios y desviación estándar (barras de error) obtenidos, para la actividad antioxidante (cuantificada en los propóleos de los diferentes países) expresada como porcentaje de inhibición relativa del radical DPPH⁺ y ABTS⁺, así como TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g}$ de balsamo) y FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ de bálsamo). La figura también muestra los grupos homogéneos resultantes del ANOVA realizado para el factor país.

Como anteriormente se ha comentado el porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺ se puede expresar como capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC). En este caso, nuevamente Honduras difiere significativamente de los demás. Observando en detalle los valores medios, se aprecia que mientras el valor máximo para el ABTS⁺ correspondía a España, para el TEAC no fue así. Esto se debe al hecho de que para el TEAC, los valores se expresaron en relación al bálsamo de las muestras (rendimiento del propóleo). Sin embargo, el cálculo del porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺ no permite tener en cuenta dicho rendimiento del propóleo. Debido a que los propóleos analizados contenían muchas diferencias en su contenido en impurezas, y por lo tanto en su rendimiento, en algunos casos los valores expresados de ambas maneras no son proporcionales.

En relación a los resultados del FRAP, como era de esperar la capacidad antioxidante obtenida para los diferentes propóleos, tuvo un comportamiento semejante al TEAC. Ya que ambos métodos, aunque expresados en distintas unidades, tienen en cuenta el rendimiento de los propóleos. En este caso Honduras presento nuevamente el valor mínimo (157 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$) y para el resto de países no hubo diferencias significativas, con un valor medio máximo de (2,014 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$) para Ucrania.

4.4. Influencia del origen geográfico español en la composición fenólica y actividad antioxidante total

Las muestras de España suponían en este estudio más de un tercio del total de muestras de los propóleos analizadas y de ellas se conocía exactamente su procedencia geográfica. Por este motivo, se decidió evaluar más en detalle, la influencia de la zona de recolección. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 4. No hubo diferencias significativas para el bálsamo, aunque los valores oscilaron entre 34.4 g/100 g en Montroy y 65.8 g/100 g en Gestalgar. Estas diferencias son debidas fundamentalmente a la época de recolección del propóleo y a las prácticas apícolas (por las impurezas con cera, restos de abejas, madera, etc.).

En relación a los parámetros analizados, solo se apreciaron diferencias significativas para el contenido fenólico total, las flavononas-dihidroflavonoles, así como para el porcentaje de inhibición del radical DPPH⁺.

Los propóleos de Valencia (39.7 g/100g), Barxeta (39.3 g/100g) y Sierra Mariola (29.5 g/100g), fueron los que mayor contenido medio fenólico total presentaron, y los de Montroy (13.1 g/100g) los que menor contenido tuvieron. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Kumazawa et al. (2013) en propóleos recolectados en diferentes áreas de Andalucía (España), cuyos valores medios de fenoles totales oscilaron entre 3.1 y 36.4 g/100g de propóleo crudo.

El mayor contenido en flavonas y flavonoles lo presentaron los propóleos de Barxeta (11.1 g/100g), Ayora (8.5 g/100g) y Valencia (8.1 g/100g), y los mayores de flavononas y dihidroflavonoles los propóleos de Barxeta (14.1 g/100g), S. Mariola (10.1 g/100g) y Valencia (8.4 g/100g). Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Betances-Salcedo et al. (2017) en propóleos de Galicia y Castilla y León, (0.8-5.8 g/100g). Sin embargo, el contenido en flavononas y dihidroflavonoles fue ligeramente superior en este estudio (14.5-4.8 g/100g) al obtenido por estos mismos autores (0.3-8.1 g/100g).

El porcentaje medio de inhibición del radical DPPH⁺, osciló entre un mínimo de 62.3% en los propóleos de Ayora y un máximo de 76.8% para Barxeta. Con relación al radical ABTS los valores menores de

inhibición se obtuvieron para las muestras de Montroy (66.3%) y los más altos fueron para los propóleos de Barxeta (76.1 %). Estos resultados son concordantes con Kumazawa et al. (2013) en propóleos procedente de Andalucía (España), para los cuales la inhibición del radical DPPH⁺ fue de 23.0-83.7%, mientras que para la inhibición del radical ABTS⁺ fue de 23.7-43.6%.

Los propóleos originarios de Sierra Mariola tuvieron el mayor valor de TEAC (3058 $\mu\text{mol Trolox/g}$), y de FRAP (1480 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$). Resultados inferiores fueron obtenidos por Serra y Lacalle (2011) en propóleos originarios del País Vasco (España) en cuanto al TEAC (560-1,430 $\mu\text{mol Trolox /g}$) y muy superiores (2,312–4,669 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$) respecto al ensayo del FRAP.

Origen	Resinas (g/100g)	Fenoles totales (g/100g)	Flavonas y flavonoles (g/100g)	Flavononas y dihidroflavonas (g/100g)	Inhibición DPPH (%)	Inhibición ABTS (%)	TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol Fe}_2\text{sulfato/g}$)
Ayora	59.0 (1.3)	28.5 (0.7)	8.5 (2.1)	4.8 (0.7)	62.3 (1.4)	68.9 (1.0)	1,567 (203)	1,160 (21)
Barxeta	48.0 (1.3)	39.3 (1.8)	11.1 (4.1)	14.5 (0.3)	76.8 (0.6)	76.1 (1.1)	2,214 (530)	1,405 (254)
Gestalgar	65.8 (3.2)	27.6 (1.8)	4.1 (1.1)	4.9 (0.6)	69.9 (1.2)	68 (0.1)	1,419 (125)	948 (123)
Montroy	34.4 (1.2)	13.1 (0.4)	0.8 (0.1)	7.8 (1.6)	68.4 (1.1)	66.3 (2.0)	3,044 (1030)	1,077 (141)
S.Mariola	40.9 (19.4)	29.5 (5.8)	7.6 (6.8)	10.1 (2.6)	75.3 (1.7)	72.7 (6.1)	3,058 (1029)	1,480 (150)
Valencia	56.2 (16.3)	39.7 (11.9)	8.1 (4.9)	8.4 (3.0)	68.3 (1.6)	74.5 (2.4)	2,239 (1319)	1,459 (120)
ANOVA								
Fratio	2.62	5.69	6.92	6.99	24.67	0.49	0.27	0.19
pValor	0.0501	0.0013	0.6028	0.0004	0.0042	0.7716	0.9076	0.9498

Tabla 4. Valores medios por zona geográfica española para la determinación de los compuestos de la fracción fenólica y actividad antioxidante total de los distintos propóleos. Se muestra el valor medio y la desviación estándar de cada parámetro analizado, así como los resultados del ANOVA (Fratio y pValor).

5. CONCLUSIONES

- La buena linealidad, demostrada a partir de las R^2 de las de los diferentes métodos empleados, permitió una adecuada cuantificación de la fracción fenólica y de la actividad antioxidante de los propóleos estudiados.
- El contenido en bálsamo de los propóleos, como medida de las impurezas de las muestras, no fue significativamente distinto entre países, aunque los valores medios oscilaron entre 33.1 g/100g para Ucrania y 54.5 g/100g para Rumanía.
- Los componentes mayoritarios de la fracción fenólica (fenoles totales, flavonas-flavonoles y flavononas-dihidroflavonoles) fueron significativamente distintos entre países. Honduras mostró siempre el menor valor, mientras que Ucrania, en general, los valores más altos.
- La actividad antioxidante total, independientemente del método o expresión de los resultados, fue significativamente menor para Honduras, en relación al resto.
- Los métodos para la determinación de la capacidad antioxidante mediante técnicas de captación de radicales libres (DPPH⁺, ABTS⁺) dependerán de la naturaleza química del propóleo.
- Las muestras españolas analizadas han puesto de manifiesto que dentro de un mismo país existen diferencias significativas entre zonas de procedencia, lo que demuestra la influencia del origen botánico en las características antioxidantes e los propóleos.

6. REFERENCIAS

Bankova V , Popova M , Bogdanov S , Sabatini AG , (2002). *Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. Z Naturforsch 57c:530–533.*

Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S, (2001). *Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytother Res 15:561–571.*

Barros, M.Sousa, J.Bastos, J.Andrade, (2006). *Effect of Brazilian greenpropolis on experimental gastric ulcers in rats. J. Ethnopharmacol, DOI:10.1016/j.*

Benzie IF, Strain JJ, (1996). *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. Anal Biochem 239:70–76.*

Betances-Salcedo E, Revilla I, Vivar-Quintana AM, Gonzalez-Martin MI (2011). *Flavonoid and Antioxidant Capacity of Propolis Prediction Usingnear Infrared Spe.*

Bonvehí JS, Coll FV, Jorda RE, (1994). *The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. J Am Oil Chem Soc 71:529–532.*

Bonvehi JS, Coll FV, (2000). *Study on propolis quality from China and Uruguay. Z Naturforsch 55c:778–784.*

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, (1995). *Use of freeradical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm WissensTechnol 28:25–30.*

Bruschi, M, Franco S. y Gremiao M, (2003). *Application of HPLC Method for analysis of propolis extract. Journal of Liquid chromatography y related technologies, 26 (14): 2399-2409.*

Chaillou L, (2005). *Propóleos de Santiago del Estero. Características físicas y químicas. Actividad antibacteriana y antioxidante. Identificación y cuantificación de flavonoides. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero.*

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Cherm JC, (2002). *Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal 10:178–182.*

Cicco N., M.T. Lanorte, M. Paraggio, M. Viggiano, V. Lattanzio, (2009). *A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts Microchemical Journal, 91, pp. 107-110.*

Cizmarik, J. y Matel, I. 1970. Examination of the chemical composition of propolis. *Experiencia*, 26: 713.

Da Silva JF, Sourza MC, Ramalho Matta SR, Ribeiro de Andrade M, Nova Vidal FV, (2006). *Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. Food Chem 99:431–435.*

Del Cueto, D. J. 1994. Propóleos, el oro púrpura de las abejas. *Vida apícola*, 66:137-138. Buenos Aires. Argentina.

Elejalde Guerra JI, (2001). *Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes.* *An. Med. Interna (Madrid) [online]*, vol.18, n.6 [citado 2018-06-22], pp.50-59.

Escriche Isabel y Juan-Borras, (2018). *Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis.* *Food Research International* 106 (2018) 834–841

Fierro Morales W, (2000). *Capacidad antioxidante de los polifenoles del propóleos.* *Congreso Internacional sobre Propóleos. Buenos Aires. Argentina (75-85).*

Ghisalberti, E L, (1978). *Propolis: A Review.* *Bee World*, 60: 59-84.

Havsteen B: Flavonoids, (1983). *A class of natural products of high pharmacological potency.* *Biochem Pharmacol*, 32:1141-1148.

Jang M, Cai L, Udeani GO y cols, (1997). *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.* *Science*, 1997, 275:218-221.

Kumazawa S, Serra Bonvehí J, Torres C, Mok-Ryeon A y Orantes BermejoFJ (2013). *Chemical and Functional Characterisation of Propolis Collected from East Andalusia (Southern Spain).* DOI 10.1002/pca.2439.

Lima B, Tapia A, Luna I, Fabani MP, Schmeda-Hirschmann G, Podia NS, Wunderlin DA, Feresin GE, (2009). *Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina).* *J Agric Food Chem* 57:2691–2698.

Makashvili Z A, (1978). *From history of propolis. In Remarkable hive products: propolis. Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use therapeutics.* *Apimondia Standing Commission on Beekeeping technology and equipment, Bucarest.*

Martínez Flórez S, González Gallego J M, Culebras Tuñón MJ, (2002). *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.* *Nutrición Hospitalaria*, 17: 271-278.

Medellin Pico R, Correa B, Perez A, (2007). *Los Beneficios del propóleos.* *FMVZ-UNAM. Apitec N° 60.*

Menezes H, (2005). *Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas.* *São Paulo. Arq. Inst. Biol.*, 72 (3): 405-411.

Mohammadzadeh S , Mohammad S, Manoochehr Hamedi S, Amanzadeh Y, Sadat- Ebrahimi S y Seyed Nasser Ostad NS, (2007). *Antioxidant power of Iranian propolis extract.* *Food Chemi*, 103: 729–733.

Molina Úbeda R, (2000). *Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas.* *Mundi-Prensa Libros. p. 32.*

Nagy M, Grancai D, (1996). *Colorimetric determination of flavanones in propolis.* *Farmacia* 51:100–101.

N.S. Seyed Nasser Ostad. 2007. *Antioxidant power of Iranian propolis extract.* *Food Chemi.*, 103: 729–733.

Orantes Bermejo FJ, (2006). *Los Propóleos en Andalucía. Grupo de Cooperación Columela - Asociación Provincial de Apicultores de Granada. Proyecto C/99/006.*

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G y Goldberg DM, (1995). *The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. Clin Chim Acta, 235:207-219.*

Park Y, Alencar S, Scamparini A, Aguilar C, (2002). *Propolis produced in south Brazil, Argentine and Uruguay: Phytochemical evidence for the plant origin. Cienc. Rural, 32 (6): 997-1003.*

Peña RC, (2008). *Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Cien.Inv. Agr., 35(1): 17-26.*

Peres W, (1994). *Radicais Livres em níveis biológicos. Ed. Universidade Católica de Pelotas, Brasil, 1994, 49-81.* **Popova, VS Bankova, S. Bogdanov, I. Tsvetkova, C. Naydenski, G.L.Marcazzan, AG Sabatini, (2007).** *Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin A pidologie, 38, pp. 306-311.*

Popova Milena, Vassya Bankova, Daniela Butovska, Valentin Petkov, Boryana Nikolova-Damyanova, Anna Gloria Sabatini, Gian Luigi Marcazzan and Stefan Bogdanov, (2004) *Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis. Phytochem. Anal. 15, 235–240.*

Prior LR, Wu X, Schaih K (2005) *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 53:4290–4302.*

Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N, (2011). *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia. 82, 513-523.*

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26:1231–1237.*

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

Salamanca Grosso G, (2000). *El sistema de control y puntos críticos en la extracción y beneficios de propóleos. Actas del Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires. Argentina. Pp: 57 – 65.*

Salazar M, (2002). *Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos del propóleos sobre Echerichia Coli y Staphylococcus aureus. Memorias del XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Colombia. pp. 69-70.*

Serra Bonvehí Josep, Lacalle Gutiérrez Arrate, (2011). *Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). J Am Oil Chem Soc 88:1387–1395.*

Singleton SL y Rossi JA, (1999). *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic., 16(1): 144-158.*

Sforcin J, Novelli E, Funari S, (2002). *Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. J Venon. Anim. Toxins, 8 (2): 244-254.*

Sforcin J, Orsi R, Bankova V, (2005). *Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. J Ethnopharmacol 98: 301-305.*

Singleton VL, Orthofer RO, Lamuela-Raventos RM, (1999). *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Methods Enzymol; 299: 152–178.*

Woisky RG y Salatino A, (1998). *Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apicultural Research, 37 (1998), pp. 99-105.*

Zuleta A, Esteve M, Frigola A, (2009). *ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chemistry; 114: 310-3.*