



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## *PERFIL FENÓLICO DE PROPÓLEOS DE DIFERENTES ORÍGENES GEOGRÁFICOS*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA  
CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTAR

ALUMNO/A: Patricia García Argente

TUTOR/A ACADEMICO: Isabel Escriche Roberto

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Marisol Juan Borrás

*Curso Académico: 2017-2018*

VALENCIA, FECHA 14/09/2018

# PERFIL FENÓLICO DE PROPÓLEOS DE DIFERENTES PAÍSES GEOGRÁFICOS

Patricia García Argente<sup>1</sup>, Isabel Escriche Roberto<sup>1</sup>.

## RESUMEN

El propóleo es una sustancia resinosa producida por las abejas, con importantes propiedades farmacológicas, debidas en parte a su contenido en compuestos fenólicos. El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización del perfil fenólico (por HPLC con detector UV) de 31 muestras de propóleo crudo procedentes de diferentes países (España, Rumania, China, Honduras, Lituania, Brasil y Ucrania). La práctica totalidad de los 15 compuestos fenólicos identificados (agrupados en 5 familias: hydroxycinnamic acids, flavonols, isoflavone, flavones, flavonones) han mostrado diferencias significativas entre países. Los valores superiores de concentración de compuestos fenólicos los han presentado las muestras de España y Rumania y, los menores valores las muestras de Honduras. El estudio detallado de las muestras de España (de las que se conocían 9 procedencias geográficas distintas), mostró en algunas contenidos especialmente altos de pinocembrin y chrysin. Del estudio se puede concluir que la composición fenólica del propóleo depende fundamentalmente de la ubicación geográfica de la colmena y, por lo tanto, de características climáticas y botánicas.

PALABRAS CLAVE: propóleo, perfil fenólico.

## RESUM

El propóleo és una substància resinosa produïda per les abelles, amb importants propietats farmacològiques degudes, principalment, al seu contingut en compostos fenòlics.

L'objectiu d'aquest treball ha sigut la caracterització del perfil fenòlic (per HPLC amb detector UV) de 31 mostres de propóleo cru procedents de diferents països (Espanya, Romania, Xina, Hondures, Lituània, Brasil i Ucrania). La pràctica totalitat dels 15 compostos fenòlics identificats (agrupats en 5 famílies: hydroxycinnamic acids, flavonols, isoflavone, flavones i flavonones) han mostrat diferències significatives entre països. Els valors superiors de concentracions de compostos fenòlics els han presentat Romania i Espanya i, els menors valors les mostres d'Hondures.

L'estudi detallat de les mostres d'Espanya (de les que es coneixen 9 procedències geogràfiques diferents), va mostrar en algunes continguts especialment alts de pinocembrin i chrysin. De l'estudi es pot concloure que la composició fenòlica del propòleo depèn, fonamentalment, de la ubicació geogràfica del rusc i, per tant, de les característiques climàtiques i botàniques.

PARAULES CLAU: propòleo, perfil fenòlic.

## **ABSTRACT**

Propolis is a resinous substance produced by bees, with important pharmacological properties, due in part to their content in phenolic compounds. The aim of this work has been the characterization of the phenolic profile (by HPLC with UV detector) of 31 crude propolis samples from different countries (Spain, Romania, China, Honduras, Lithuania, Brazil and Ukraine). Practically all of the 15 phenolic compounds identified (grouped into 5 families: hydroxycinnamic acids, flavonols, isoflavone, flavones, flavonones) have shown significant differences between countries. The highest concentration values of phenolic compounds have been presented by the samples from Spain and Romania and the lowest values by the samples from Honduras. The detailed study of the samples from Spain (of which 9 different geographical origins were known), showed in some especially high contents of pinocembrin and chrysin. From the study can be concluded that the phenolic composition of propolis depends fundamentally on the geographical location of the hive and therefore, on climatic and botanical characteristics.

KEY WORDS: propolis, phenolic profile.

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

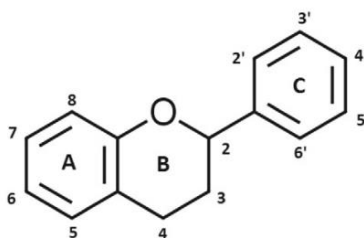
## INTRODUCCIÓN

La palabra propóleo proviene del griego propolis, “pro” (en defensa) y “polis” (ciudad), lo que refleja la función que tiene el propóleo para las abejas. Esta sustancia es preparada por ellas para sellar las grietas de la colmena (Hegazi et al.), alisar las paredes y mantener durante todo el año una humedad y temperatura estable dentro de la propia colmena (Huang et al., 2014). El propóleo, además de ser utilizado por las abejas como material de construcción, es una importante “arma química” gracias a sus propiedades antimicrobianas. En este sentido, las abejas lo utilizan para embalsamar a los intrusos que puedan entrar en la colmena (Bankova, 2005).

El hombre ha utilizado el propóleo desde la antigüedad por sus versátiles propiedades farmacológicas (antimicrobianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, antioxidantes, antitumorales, etc.) demostradas en numerosos estudios científicos (Bankova et al., 2014; Neto, et al., 2017; Sawaya et al., 2011; Cottica et al., 2015; Castro et al., 2014).

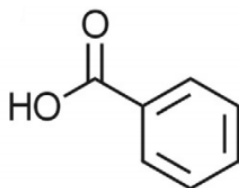
El propóleo es una sustancia resinosa y fuertemente adhesiva, principalmente de color oscuro. Las abejas producen esta sustancia recolectando exudados de diferentes plantas (mayoritariamente resinas (AL-Ani et al., 2018), que son modificados por ellas con enzimas, polen y cera (Kalogeropoulos, 2009). Es por ello, que la composición típica del propóleo crudo es aproximadamente: 45-55% de resina vegetal, 25-35% de cera, 5-10% de aceites aromáticos, 5% de polen y 5% de otros productos naturales y diferentes metabolitos secundarios de plantas (Kaškonienė et al., 2014). Por tanto, las características del propóleo, dependen del origen geográfico y las condiciones climáticas de la zona (Falcão, 2013; Kumazawa et al., 2004; Kaškonienė et al., 2014).

Más de 300 componentes químicos se han identificado en el propóleo destacando los compuestos fenólicos, por ser los principales responsables de su acción farmacológica y biológica, de ahí la importancia de su determinación analítica (Escriche y Juan, 2018). Entre los principales grupos de compuestos fenólicos cabe mencionar los flavonoides y los ácidos fenólicos (Bonvehí y Gutiérrez, 2011; Isidorov et al., 2012). Los flavonoides se caracterizan por poseer anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono (Figura 1) (Cartaya, 2011). Estos compuestos se dividen en varias subclases, de acuerdo con la sustitución del anillo C, siendo las más representativas: flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianidinas e isoflavonas.



**FIGURA 1.** Estructura química básica del esqueleto de los flavonoides.

Los ácidos fenólicos (Figura 2) se pueden dividir en dos categorías según su estructura: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico. Estos compuestos consisten en un anillo de benceno unido a un grupo carboxílico (ácidos benzoicos) o a un ácido propenoico (ácidos cinámicos) (Oroian y Escriche, 2015).



**FIGURA 2.** Estructura química básica del esqueleto de los ácidos fenólicos.

Numerosos artículos publicados describen procedimientos espectrofotométricos para cuantificar de forma total los compuestos fenólicos. Entre estos métodos destaca el colorimétrico mediante cloruro de aluminio y el método de Follin-Ciocalteu (Al et al., 2007; Cicco et al., 2009; Bonvehí y Gutiérrez., 2011).

Actualmente, los métodos cromatográficos son los más utilizados para estudiar el perfil fenólico del propóleo, ya que permiten determinar la concentración individual de flavonoides y ácidos fenólicos. La cromatografía líquida con detectores UV y MS es la mejor técnica debido a su capacidad para identificar una gran variedad de compuestos químicos (Pellati et al., 2011; Midorikawa et al., 2001; Gómez et al, 2006).

Por todo lo anteriormente comentado, el objetivo de este trabajo ha sido la caracterización de muestras de propóleo crudo de diferentes regiones del mundo en base a su perfil fenólico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras de propóleo**

En este trabajo se han utilizado 31 muestras de propóleo crudo de diferentes países: 8 de España, 8 de Rumania, 3 de China, 3 de Honduras, 3 de Lituania, 3 de Brasil y 3 de Ucrania.

Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta la realización de las determinaciones analíticas.

## **Reactivos**

- Estándares utilizados: caffeic acid, rutin, p-coumaric acid, ferulic acid, m-coumaric acid, quercetin, trans-cinnámico acid, apigenin, genistein, naringenin, kaempferol, chrysin, pinocembrin, ácido cafeico feniletil éster (CAPE), galangin. Todos éstos estándares fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Etanol adquirido de Panreac (Barcelona, España) y metanol de VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Francia).

Todos los reactivos y estándares utilizados fueron grado HPLC. Además, se utilizaba agua purificada (bidestilada) de un sistema Milli Q.

Se prepararon soluciones madre individuales de cada estándar en metanol entre 1000-2500 µg/mL, que eran almacenadas a -20 °C durante todo el experimento. Los estándares de trabajo se realizaron mediante dilución de la cantidad apropiada de cada solución madre patrón en 70% etanol en agua, para obtener 6 niveles de calibración hasta obtener concentraciones finales de: 10, 20, 40, 50, 75 y 150 µg/mL.

## **Obtención de extractos de propóleo**

Cada muestra de propóleo (todavía congelada) se trituraba en un mortero hasta obtener un polvo fino. La obtención de los extractos de propóleo se realizó en EtOH/agua al 70% a temperatura ambiente, utilizando una doble ultrasonificación, siguiendo el procedimiento descrito por Escriche y Juan (2018).

Para cada muestra se pesaba un gramo del polvo anteriormente obtenido, y se disolvía en 30 mL. La solución se mezclaba en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos en la oscuridad. Después de una centrifugación de 5 minutos de 5000 rpm a 5 ° C, el sobrenadante se filtraba (Whatman 3).

Posteriormente se realizaba una segunda ultrasonificación sobre el residuo en las mismas condiciones. Ambos extractos se juntaban en un matraz volumétrico de 50 mL y se diluían a 100 mL con EtOH / agua al 70%. Todas las extracciones de las muestras se realizaron por triplicado.

## **Análisis cromatográfico**

Las determinaciones analíticas del perfil fenólico se realizaban en un cromatógrafo líquido HPLC Agilent 1120 Compact LC, provisto de una bomba binaria con desgasificador integrado, inyector automático, horno de columna y un detector UV/VIS. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, USA). El Software EZChrom Elite se utilizó para realizar el análisis de datos.

Los detalles del método fueron los siguientes: horno de columna (30 ° C); fase móvil A (5% de ácido fórmico) y fase móvil B (acetonitrilo); velocidad de flujo (0,7 mL/min); volumen de inyección (5 µL); detección: 295 nm; tiempo de ejecución: 45 minutos. El gradiente de la fase móvil se muestra en la Tabla 1.

Diariamente se realizaba una inyección de un blanco (todos los reactivos excepto la muestra), para verificar que no existía interferencia en la resolución. Los tiempos de retención de todos los estándares fueron confirmados por inyecciones individuales de cada estándar. En cada sesión de trabajo se inyectaba un estándar de trabajo para verificar los tiempos de retención de cada estándar.

Los extractos de propóleo se filtraban a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0.2 µm antes del análisis cromatográfico.

El límite de detección del método (LD) y el de cuantificación (LQ) fueron 0.01 mg/g bálsamos y 0.05 mg/g bálsamo, respectivamente. El análisis de cada muestra se realizó por triplicado.

**TABLA 1.** Gradiente de la fase móvil utilizado durante el análisis cromatográfico.

<b>TIEMPO (min)</b>	<b>FASE MÓVIL A (%)</b>
<b>0</b>	90
<b>12</b>	90
<b>18</b>	60
<b>27</b>	50
<b>33</b>	30
<b>40</b>	10
<b>43</b>	90
<b>45</b>	90

### **Expresión de los resultados**

Los resultados se expresaron en “rendimiento (bálsamo) y no en peso de propóleo, según ha sido reportado en el artículo Escriche y Juan, 2018, con la finalidad de eliminar la interferencia de las impurezas (cera, restos de abeja, etc.) contenidas en las muestras.

El rendimiento se calculaba a partir de una alícuota (2,0 mL) de cada extracto etanólico, obtenido como anteriormente se ha descrito. Esta alícuota se mantenía en estufa hasta sequedad. El porcentaje del rendimiento se calculó siguiendo la ecuación (1):

$$\text{Rendimiento (bálsamo)} = \frac{\text{Peso del extracto etanólico seco}}{\text{Peso propóleo crudo}} * 100 \quad (1)$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 3 se observa como ejemplo, diferentes cromatogramas correspondientes a cuatro de los países estudiados. A simple vista se aprecia una gran diferencia en el perfil de las muestras analizadas. La muestra de Honduras destaca por la escasez de picos identificados en ella. Sin embargo, en ella se aprecian varios picos de gran altura al final del cromatograma, que no han sido identificados en el presente estudio. Por ello, sería interesante tenerlos en cuenta en estudios futuros.

La Tabla 2 muestra los 15 compuestos fenólicos identificados en las muestras del presente estudio, agrupados en cinco familias: 6 hydroxycinnamic acids (caffeic acid, p-coumaric acid, m-coumaric acid, ferulic acid, CAPE, trans-cinnamic acid), 4 flavonols (rutin, quercetin, kaempferol y galangin), 1 isoflavone (genisteín), 2 flavones (chrysin, apigenin) y 1 flavonone (pinocembrin).

La cuantificación de dichos compuestos se ha realizado considerando las correspondientes rectas de calibrado obtenidas a partir de los estándares de trabajo. La Figura 1 muestra las rectas de calibrado obtenidas para todos los compuestos estudiados. Se observa en todas ellas un valor de  $r^2$  que oscila entre 0.998 y 0.999, lo que demuestra una buena linealidad del método utilizado y, por tanto, una adecuada cuantificación de los compuestos fenólicos analizados.

La Tabla 2 también muestra los valores promedio de las concentraciones obtenidas para cada compuesto y cada país, (expresados como mg de compuestos/g bálsamo) los valores máximos y mínimos, así como el sumatorio de las concentraciones de los compuestos pertenecientes a cada familia, y el del total del perfil fenólico (considerando el valor total de las cinco familias).

En la Tabla 2 también se detallan los resultados de la ANOVA (cociente F y diferencias significativas) obtenido para cada compuesto considerando el factor país.

De los 15 compuestos cuantificados, 14 de ellos mostraron diferencias significativas entre muestras considerando el país de origen. Únicamente el trans-cinnamic acid no presentó diferencias significativas, debido a la



gran variabilidad de concentración del trans-cinnamic acid en las muestras de algunos países como España que oscila entre 0.1 y 3.3 mg/g bálsamo.

Las muestras con un valor medio total más elevado de compuestos fenólicos fueron las de Rumania (50.5 mg/g bálsamo) y España (46.9 mg/g bálsamo), seguidas por China y Ucrania con 43.7 y 35.5 mg/g bálsamo, respectivamente. Lituania (25.0 mg/g bálsamo) y Brasil (18.4 mg/g bálsamo) mostraron valores intermedios.

Es importante mencionar el bajo valor total obtenido en las muestras de Honduras (5.9 mg/g bálsamo), tal y como se observa en el cromatograma de la Figura 3 muchos compuestos no fueron detectados en las muestras de este país y cuando se identificaron estaban en muy baja concentración. Sin embargo, en las muestras de Honduras destaca el alto contenido medio de trans-cinnamic acid en comparación a las muestras del resto de países, a excepción de algunas muestras de España, tal y como se ha nombrado anteriormente.

Considerando las familias, la mayor abundancia de hydroxycinnamic acids e isoflavone correspondió a las muestras de Rumania con valores medios de 18.4 y 1.5 mg/g bálsamo, respectivamente. China mostró el sumatorio de valores medios más elevados de flavonols (16.0 mg/g bálsamo), debido a la abundancia de galangin, y flavanone (14.7 mg/g bálsamo). Las muestras de España tenían un valor más alto de flavones (12.5 mg/g bálsamo), debido a su elevada concentración en chrysin.

Tanto en las muestras de España como en las de Rumania destacaran como mayoritarios el chrysin (12.2 y 10.5 mg/g bálsamo) y el pinocembrin (9.4 y 6.9 mg/g bálsamo). Concretamente la concentración del chrysin también ha sido importante en Ucrania, China y Lituania (9.9, 5.2 y 4.0 mg/g bálsamo), aunque no haya sido el compuesto más abundante. Sin embargo, en Honduras y Brasil la presencia de este compuesto en ningún caso superó 0.8 mg/g bálsamo.

Es importante destacar la baja cantidad de la mayoría de los compuestos fenólicos cuantificados en las muestras de Brasil, aunque son las muestras que contienen los valores máximos de m-coumaric acid, con valores que oscilaron entre 4.4 y 4.8 mg/g bálsamo. También, tuvieron el valor más elevado de quercetin (1.4-1.6 mg/g bálsamo) en comparación con el resto de países estudiados.

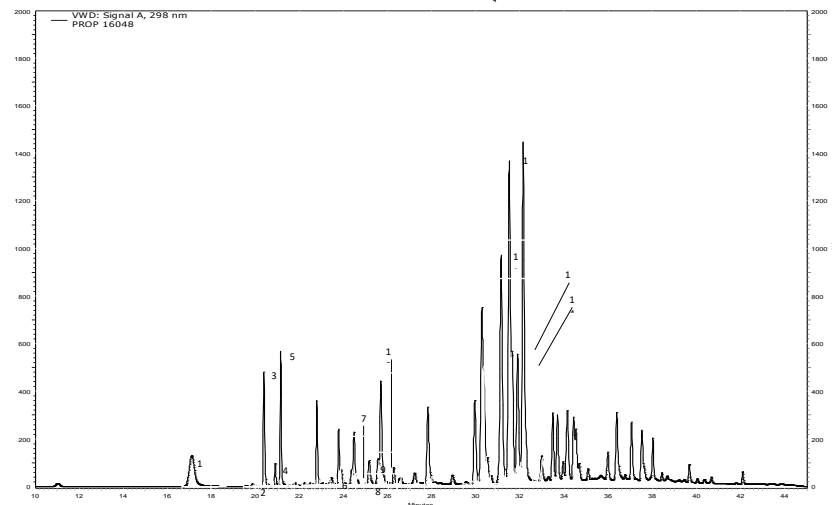
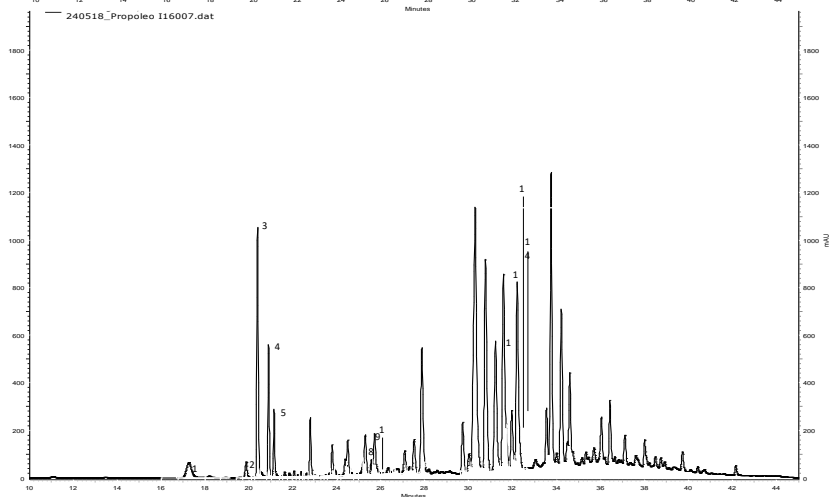
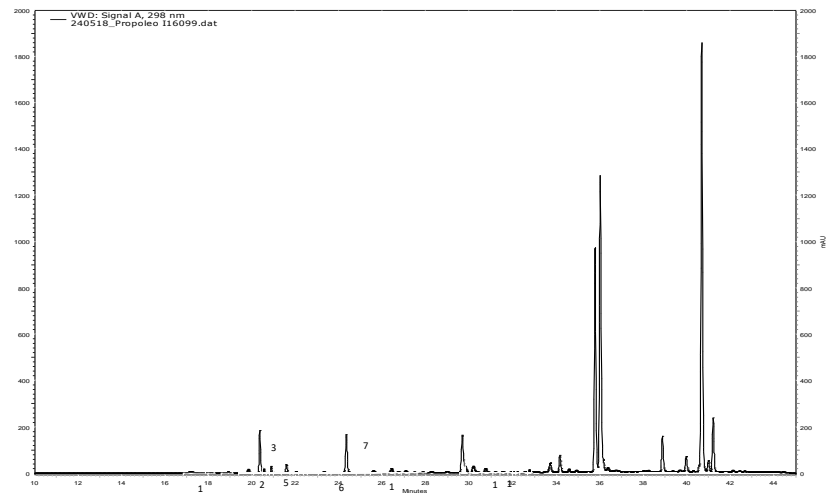
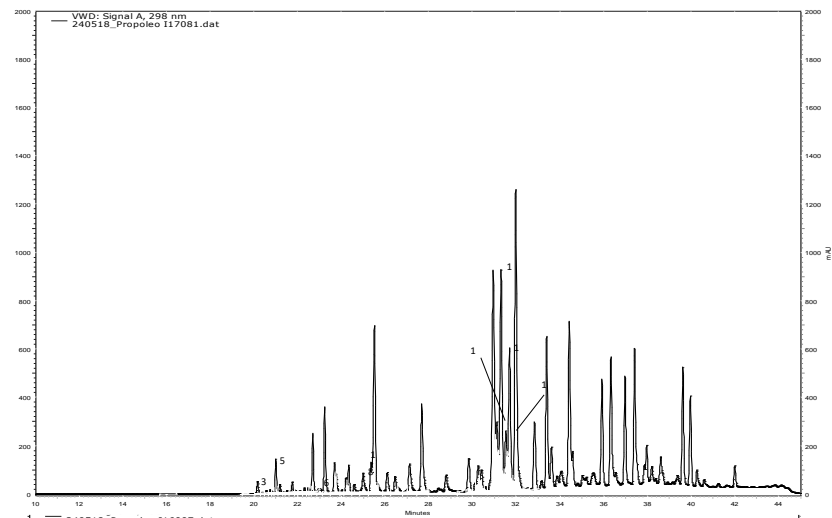
China fue el país con menor número de compuestos identificados, no se encontraron en ninguna de sus muestras caffeic acid, ferulic acid, rutin, junto con apigenin y naringenin. En cambio, su valor medio total es elevado debido a que la concentración de algunos compuestos identificados como galangin, pinocembrin, CAPE y chrysin es bastante elevada. Muchos artículos han resaltado la elevada concentración de estos compuestos en propóleos provenientes de China (Bonvehí y Coll, 1994; El Sohaimy y Masry, 2014; Hatano et al., 2012).

Una vez analizado los componentes individualmente se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para observar el efecto global de todos ellos en relación al país de procedencia de las muestras. La Figura 5 muestra el PCA bi-plot realizado: scores (muestras de propóleos) y loadings (compuestos). Los códigos para cada muestra representan el origen del propóleo y el número de muestra. Cada punto representa la media de las tres réplicas realizadas. Los dos componentes principales explicaron el 84% de las variaciones en el conjunto de datos: PC1 (58%) y PC2 (26%).

Se observa que no siempre existe proximidad entre las muestras del mismo país. Por ejemplo, las 8 muestras de España no se encuentran agrupadas en la figura, así como las 7 muestras de Rumania y las 3 muestras de China. Esta dispersión indica que la composición fenólica del propóleo varía dentro de las muestras de un país, hecho que ya se había visto anteriormente en la observación individual de cada compuesto (Tabla 2). Por tanto, se demuestra la variabilidad observada para muchos de los compuestos identificados en las muestras de un país. Por tanto, podemos afirmar que no existe una agrupación de propóleo por países.

La mayor proximidad entre las muestras de Honduras, Ucrania, Brasil y Lituania podría deberse a que en estos países el número de muestras disponibles para el estudio era mucho menor al de Rumania y España, y éstas podrían haber sido recolectadas en zonas próximas. Sin embargo, esta afirmación no se puede probar ya que se desconoce el lugar exacto de su obtención.

Sin embargo, para las muestras de España, además de que se disponía de un número importante, se sabía cuál había sido la zona exacta de recolección, por lo tanto, se ha realizado un análisis en detalle de las mismas.



**FIGURA 3.** Ejemplos de cromatogramas demuestras de propóleo de diferentes orígenes a) China, b) Honduras, c) Rumania y d) España

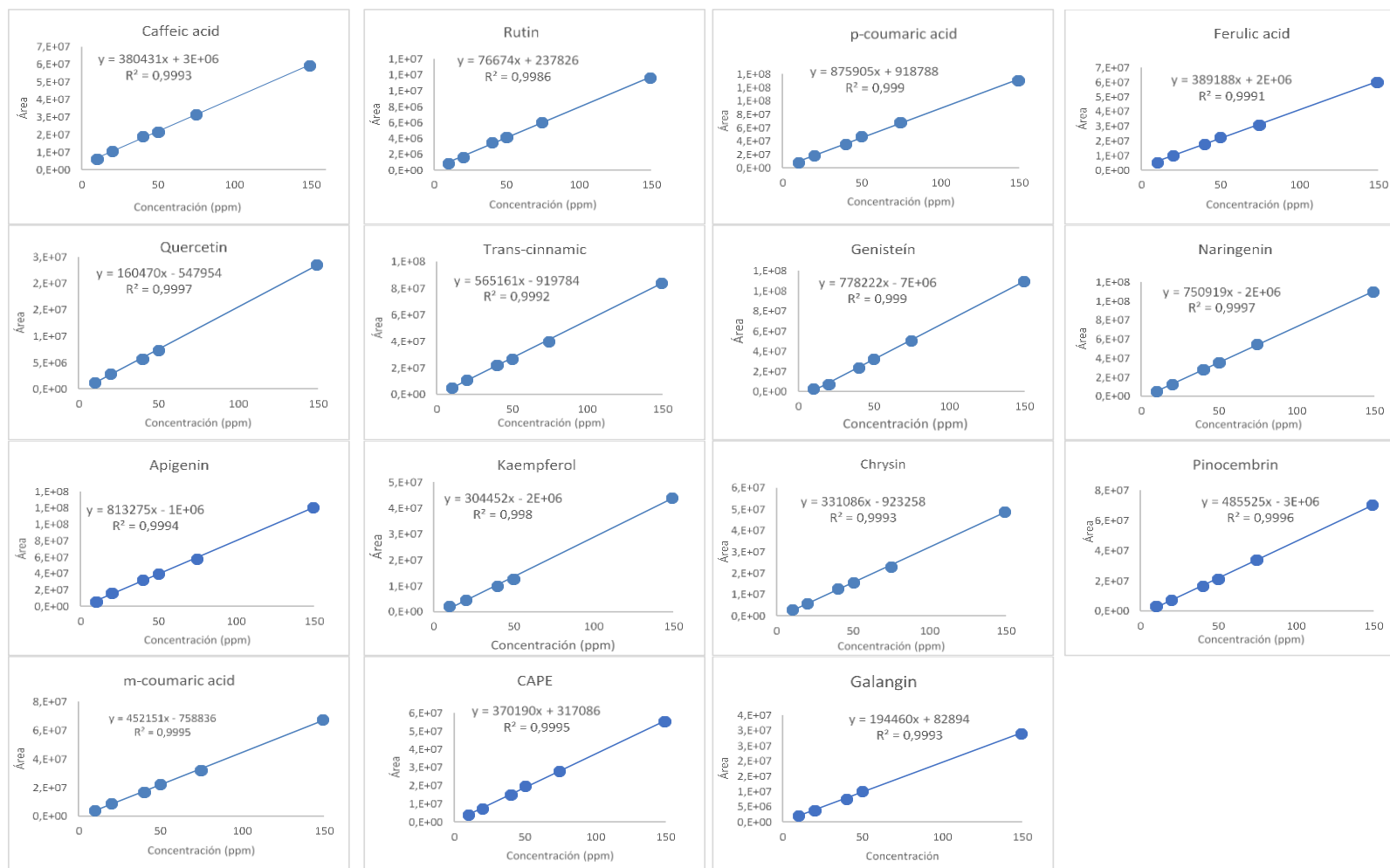


FIGURA 4. Rectas de calibrado obtenidas para todos los compuestos analizados

**TABLA 2.** Valores promedio de las concentraciones (mg de compuestos / g bálsamo) de cada compuesto fenólico; valores máximos y mínimos resultantes de la cuantificación de dichos compuestos en las muestras de propóleo analizadas; sumatorio de las concentraciones de los compuestos de cada familia; sumatorio total del perfil fenólico para cada país y resultados ANOVA (cociente F y diferencias significativas) obtenidos para el factor país.

Compuesto fenólico (mg/g bálsamo)	Países							ANOVA Factor País
	España	Rumania	Lituania	Ucrania	Honduras	Brasil	China	
<b>HYDROXYCINNAMIC ACIDS</b>								
Caffeic acid	2.4 <sup>c</sup> (0.1-5.5)	2.3 <sup>c</sup> (0.5-6.2)	0.4 <sup>a,b</sup> (0.4-0.4)	2.3 <sup>b,c</sup> (2.0-2.5)	0.1 <sup>a,b</sup> (0.1-0.0)	0.2 <sup>a,b</sup> (0.2-0.2)	n.d. <sup>a</sup>	4.91 <sup>***</sup>
P-coumaric acid	2.0 <sup>b</sup> (0.0-6.5)	4.3 <sup>c</sup> (1.8-7.8)	1.9 <sup>a,b</sup> (1.9-2.0)	1.3 <sup>a,b</sup> (1.2-1.3)	0.9 <sup>a,b</sup> (0.8-0.9)	3.0 <sup>b,c</sup> (2.9-3.0)	0.2 <sup>a</sup> (0.2-0.2)	6.74 <sup>***</sup>
M-coumaric acid	2.2 <sup>b,c</sup> (0.2-6.4)	2.9 <sup>c</sup> (1.2-5.4)	0.6 <sup>a,b</sup> (0.5-0.6)	1.6 <sup>a,b,c</sup> (1.6-1.7)	0.2 <sup>a,b</sup> (0.2-0.2)	4.6 <sup>d</sup> (4.4-4.8)	1.2 <sup>a,b</sup> (0.3-1.7)	5.47 <sup>***</sup>
Ferulic acid	0.6 <sup>a</sup> (0.1-2.5)	6.2 <sup>b</sup> (0.1-12.8)	1.8 <sup>a</sup> (1.7-1.9)	0.8 <sup>a</sup> (0.7-0.9)	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	13.48 <sup>***</sup>
CAPE	4.2 <sup>c</sup> (0.2-10.5)	2.1 <sup>a</sup> (0.7-4.7)	2.0 <sup>a,b</sup> (1.9-2.2)	2.3 <sup>a,b</sup> (2.0-2.7)	n.d. <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup> (0.1-0.5)	4.9 <sup>c</sup> (3.9-7.2)	4.08 <sup>**</sup>
Trans-cinnamic	0.7 <sup>a,b</sup> (0.1-3.3)	0.6 <sup>a</sup> (0.2-0.9)	0.2 <sup>a</sup> (0.2-0.2)	0.2 <sup>a</sup> (0.2-0.2)	1.5 <sup>b</sup> (1.3-1.6)	0.2 <sup>a</sup> (0.2-0.2)	0.6 <sup>a,b</sup> (0.5-0.6)	n.s
∑ Hydroxycinnamic acid	12.1	18.4	6.9	8.5	2.7	8.3	6.9	
<b>FLAVONOLS</b>								
Rutin	1.7 <sup>b</sup> (0.0-13.4)	6.0 <sup>a</sup> (0.3-12.0)	9.0 <sup>b</sup> (8.9-9.1)	0.9 <sup>a</sup> (0.8-0.9)	0.8 <sup>a</sup> (0.8-0.8)	0.9 <sup>a</sup> (0.8-1.0)	n.d. <sup>a</sup>	5.09 <sup>***</sup>
Quercetin	0.5 <sup>b</sup> (0.1-1.3)	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	0.5 <sup>b</sup> (0.4-0.6)	0.4 <sup>b</sup> (0.4-0.4)	1.5 <sup>c</sup> (1.4-1.6)	0.4 <sup>d</sup> (0.1-1.3)	1654.94 <sup>***</sup>
Kaempferol	1.3 <sup>a</sup> (0.1-2.8)	1.2 <sup>a</sup> (0.4-1.9)	0.7 <sup>a</sup> (0.7-0.7)	0.9 <sup>a</sup> (0.8-0.9)	0.5 <sup>a</sup> (0.5-0.5)	1.2 <sup>a</sup> (1.1-1.2)	2.2 <sup>b</sup> (2.1-2.2)	3.58 <sup>**</sup>
Galangin	8.4 <sup>b,c</sup> (0.5-23.3)	5.5 <sup>a,b</sup> (1.6-10.8)	1.6 <sup>a</sup> (1.2-2.0)	12.8 <sup>d</sup> (12.6-13.2)	n.d. <sup>a,b,c</sup>	3.6 <sup>a</sup> (3.2-4.0)	13.3 <sup>c,d</sup> (7.2-19.6)	3.63 <sup>**</sup>
∑ Flavonols	11.9	12.7	11.3	15.1	1.7	7.2	16.0	
<b>ISOFLAVONE</b>								
Genistein	1.0 <sup>b</sup> (0.1-1.9)	1.5 <sup>c</sup> (0.5-2.8)	0.9 <sup>a,b,c</sup> (0.8-0.9)	0.6 <sup>a,b</sup> (0.2-1.0)	0.5 <sup>a,b</sup> (0.5-0.5)	0.2 <sup>a</sup> (0.2-0.2)	0.9 <sup>ab</sup> (0.6-1.1)	4.22 <sup>**</sup>
<b>FLAVONES</b>								
Chrysin	12.2 <sup>d</sup> (0.8-26.6)	10.5 <sup>c,d</sup> (5.1-15.1)	4.0 <sup>a,b,c</sup> (3.8-4.1)	9.9 <sup>b,c,d</sup> (9.5-10.0)	0.3 <sup>a,b</sup> (0.2-0.3)	0.7 <sup>a</sup> (0.5-0.8)	5.2 <sup>a,b,c</sup> (4.8-5.4)	4.83 <sup>***</sup>
Apig+Naring	0.3 <sup>b</sup> (0.1- 1.1)	0.5 <sup>c</sup> (0.2-0.8)	0.5 <sup>a,b,c</sup> (0.5-0.5)	0.9 <sup>c</sup> (0.9-1.0)	0.3 <sup>a,b,c</sup> (0.3-0.3)	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	8.01 <sup>***</sup>
∑ Flavones	12.5	11.0	4.5	10.8	0.6	0.7	5.2	
<b>FLAVANONE</b>								
Pinocembrin	9.4 <sup>b</sup> (0.7-25.6)	6.9 <sup>a,b</sup> (1.3-15.4)	1.4 <sup>a</sup> (1.3-1.5)	0.5 <sup>a,b,c</sup> (0.3-0.6)	0.4 <sup>a</sup> (0.4-0.4)	2.0 <sup>a</sup> (2.0-2.1)	14.7 <sup>c</sup> (0.6-25.6)	4.49 <sup>***</sup>
∑ Total	46.9	50.5	25.0	35.5	5.9	18.4	43.7	

La Tabla 3 muestra los valores promedio de las concentraciones (expresados como mg de compuestos / g bálsamo) de los compuestos químicos analizados en las muestras españolas de propóleo analizadas, así como la desviación estándar de los resultados obtenidos para cada muestra realizada por triplicado. Esta tabla también presenta el sumatorio de las concentraciones de los compuestos pertenecientes a cada familia, así como el sumatorio total del perfil fenólico para cada región geográfica. Se observa que los propóleos provenientes de Valencia muestran sumatorios totales mucho más elevados, con valores de 104.466 y 69.360 mg/g bálsamo respectivamente, seguido del propóleo de Viveros con un 69.023 mg/g bálsamo y, Sierra Mariola con un 55.483 mg/g bálsamo. Por otra parte, el menor sumatorio lo muestra Montroy con un valor de 3.153 mg/g bálsamo, seguido de Cuenca con un 6.071 mg/g bálsamo.

En la Tabla 3 también se observan los resultados de la ANOVA (cociente F y diferencias significativas) obtenidos para el factor región geográfica (dentro de España). Todos los compuestos analizados muestran diferencias significativas entre muestras considerando su región geográfica. El elevado valor de F-Ratio para el Rutin demuestra que este compuesto tiene un peso muy importante en la diferenciación de las muestras.

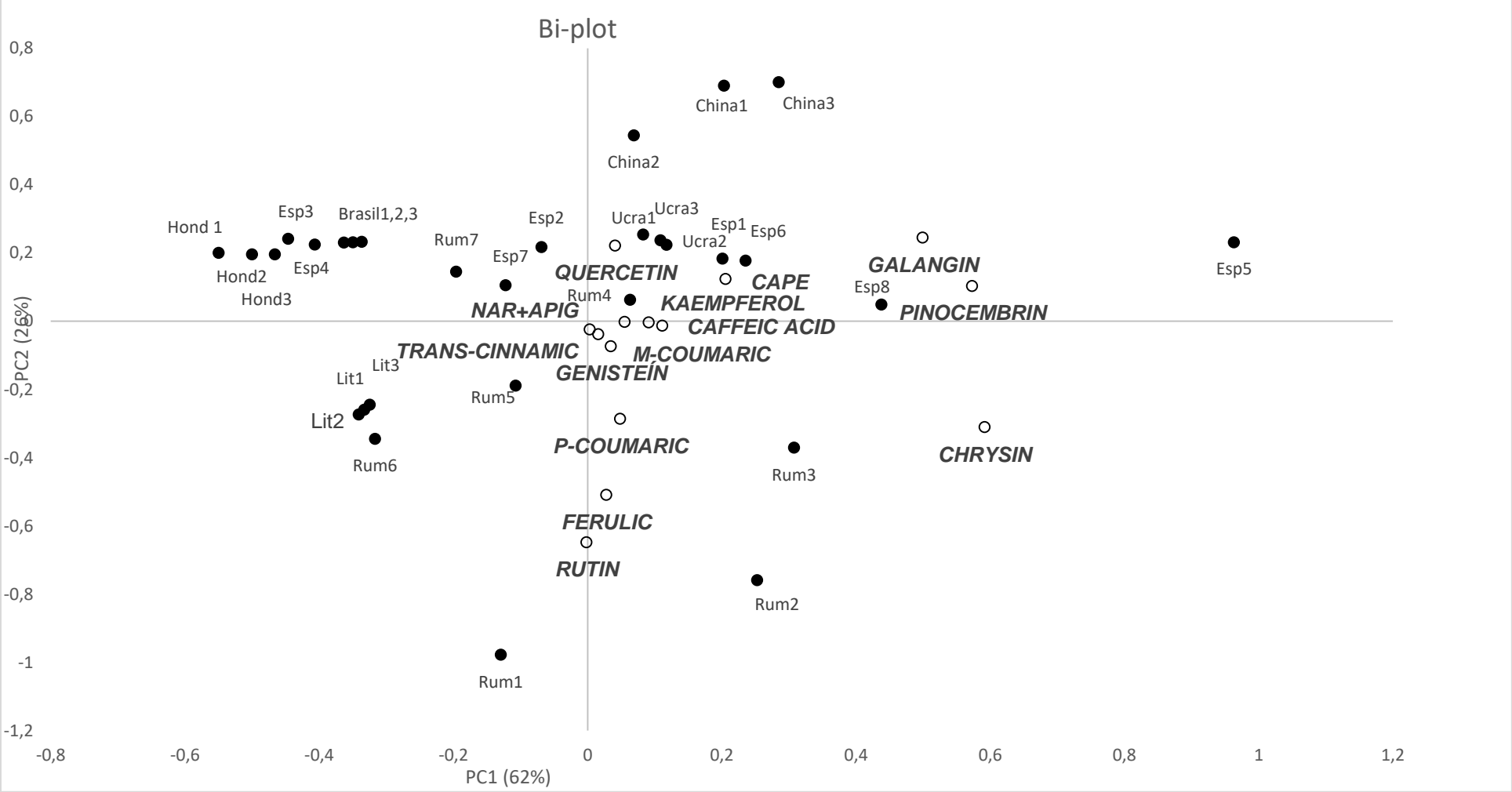
Analizando la información en relación a las familias, la muestra A de Valencia presentó los mayores valores en todas las familias, flavones (26.452 mg/g bálsamo), flavonols (27.088 mg/g bálsamo), hydroxycinnamic acids (26.144 mg/g bálsamo), isoflavone (1.681 mg/g bálsamo) y, flavanone (24.782 mg/g bálsamo); sin embargo, no se detectó la presencia apigenin y naringenin en ella. La muestra B de Valencia presentó unos valores similares para las familias de flavonols (24.482 mg/g bálsamo) e isoflavones (1.681 mg/g bálsamo).

La muestra de propóleo de Viveros tiene unos valores elevados de hydroxycinnamic acids, debido a su alta concentración de CAPE, así como de flavones como consecuencia de su alto contenido en chrysin.

Las muestras de propóleo de Montroy y Cuenca tienen los valores más bajos de todas las familias.

Es de destacar que en todas las muestras es el chrysin el compuesto fenólico que tiene mayor concentración. Por tanto, podemos decir que las muestras de Valencia se caracterizan por tener una mayor concentración de chrysin comparando con el resto de compuestos fenólicos.

**FIGURA 2.** Matriz de correlación (coeficientes de correlación de Pearson) entre muestras de propóleo de diferentes zonas geográficas.



**TABLA 3.** Concentración de compuestos fenólicos (media y desviación estándar) presentes en muestras de propóleo españolas (mg de compuestos / g bálsamo). Resultados de la ANOVA (cociente F y diferencias significativas) obtenidos para cada compuesto en relación al factor región geográfica.

Compuesto fenólico (mg/g bálsamo)	Región geográfica									ANOVA Factor: Región
	Montroy	Cuenca	Barxeta	Ayora	Valencia A	Valencia B	Viveros	Sierra Mariola	España	
<b>HYDROXYCINNAMIC ACIDS</b>										
<b>Caffeic acid</b>	0.117 <sup>a</sup> (0.006)	0.210 <sup>b</sup> (0.006)	2.551 <sup>c</sup> (0.027)	2.897 <sup>d</sup> (0.088)	5.396 <sup>e</sup> (0.056)	2.175 <sup>f</sup> (0.067)	3.397 <sup>g</sup> (0.030)	3.899 <sup>h</sup> (0.032)	1.073 <sup>i</sup> (0.078)	3193.78***
<b>P-coumaric acid</b>	0.053 <sup>a</sup> (0.001)	0.253 <sup>b</sup> (0.005)	0.901 <sup>c</sup> (0.012)	1.416 <sup>d</sup> (0.037)	2.766 <sup>e</sup> (0.004)	6.433 <sup>f</sup> (0.091)	1.453 <sup>d</sup> (0.012)	1.426 <sup>d</sup> (0.016)	3.518 <sup>g</sup> (0.129)	3537.35***
<b>M-coumaric acid</b>	0.168 <sup>a</sup> (0.006)	0.217 <sup>a</sup> (0.001)	2.192 <sup>b</sup> (0.004)	2.608 <sup>c</sup> (0.061)	6.375 <sup>d</sup> (0.003)	1.668 <sup>e</sup> (0.105)	2.761 <sup>f</sup> (0.025)	3.061 <sup>g</sup> (0.007)	0.738 <sup>h</sup> (0.032)	5207.01***
<b>Ferulic acid</b>	0.104 <sup>a</sup> (0.001)	0.117 <sup>a</sup> (0.002)	0.270 <sup>a,b</sup> (0.009)	0.462 <sup>b,c</sup> (0.038)	0.636 <sup>c,d</sup> (0.009)	2.128 <sup>e</sup> (0.405)	0.438 <sup>b,c</sup> (0.017)	0.597 <sup>c</sup> (0.001)	1.308 <sup>d</sup> (0.023)	56.60***
<b>CAPE</b>	0.218 <sup>a</sup> (0.001)	1.179 <sup>b</sup> (0.057)	3.046 <sup>c</sup> (0.004)	2.802 <sup>d</sup> (0.344)	10.047 <sup>d</sup> (0.257)	2.802 <sup>e</sup> (0.344)	10.399 <sup>d</sup> (0.234)	5.199 <sup>e</sup> (0.042)	0.875 <sup>b</sup> (0.071)	626.44***
<b>Trans-cinnamic</b>	0.076 <sup>a</sup> (0.002)	0.009 <sup>a</sup> (0.001)	0.344 <sup>c,d</sup> (0.014)	0.907 <sup>e</sup> (0.026)	0.924 <sup>e</sup> (0.061)	3.238 <sup>f</sup> (0.096)	0.391 <sup>d</sup> (0.054)	0.281 <sup>c</sup> (0.029)	0.177 <sup>b</sup> (0.001)	1484.96***
$\Sigma$ Hydroxycinnamic acid	0.736	1.985	9.304	11.902	26.144	18.444	18.839	14.463	7.689	
<b>FLAVONOLS</b>										
<b>Rutin</b>	0.000 <sup>a</sup> (0.000)	0.000 <sup>a</sup> (0.000)	0.000 <sup>a</sup> (0.000)	0.492 <sup>c</sup> (0.072)	0.613 <sup>d</sup> (0.002)	13.301 <sup>f</sup> (0.150)	0.113 <sup>b</sup> (0.078)	0.000 <sup>a</sup> (0.000)	1.060 <sup>e</sup> (0.019)	13985.84***
<b>Quercetin</b>	0.096 <sup>a</sup> (0.010)	0.010 <sup>a</sup> (0.010)	0.252 <sup>a,b</sup> (0.002)	0.600 <sup>d</sup> (0.160)	0.591 <sup>c,d</sup> (0.085)	0.527 <sup>c</sup> (0.079)	0.858 <sup>d</sup> (0.403)	0.635 <sup>c,d</sup> (0.042)	0.411 <sup>b,c</sup> (0.018)	8.22***
<b>Kaempferol</b>	0.155 <sup>a</sup> (0.005)	0.139 <sup>a</sup> (0.001)	0.895 <sup>b</sup> (0.021)	1.243 <sup>c,d</sup> (0.064)	2.784 <sup>g</sup> (0.008)	1.600 <sup>e</sup> (0.180)	1.445 <sup>d,e</sup> (0.435)	2.219 <sup>f</sup> (0.212)	0.957 <sup>b,c</sup> (0.023)	75.15***
<b>Galangin</b>	0.460 <sup>a</sup> (0.006)	0.728 <sup>a</sup> (0.009)	6.771 <sup>c</sup> (0.044)	9.525 <sup>f</sup> (0.311)	23.100 <sup>h</sup> (0.160)	9.054 <sup>e</sup> (0.100)	7.674 <sup>d</sup> (0.225)	12.369 <sup>g</sup> (0.063)	5.616 <sup>b</sup> (0.336)	3841.93***
$\Sigma$ Flavonols	0.711	0.877	7.918	11.860	27.088	24.482	10.090	15.223	8.044	
<b>ISOFLAVONE</b>										
<b>Genistein</b>	0.126 <sup>a</sup> (0.017)	0.219 <sup>a</sup> (0.050)	0.773 <sup>b</sup> (0.005)	1.121 <sup>d</sup> (0.028)	1.681 <sup>e</sup> (0.106)	1.525 <sup>e</sup> (0.367)	1.471 <sup>e</sup> (0.017)	1.036 <sup>c,d</sup> (0.089)	0.869 <sup>b,c</sup> (0.005)	50.66***
<b>FLAVONES</b>										
<b>Chrysin</b>	0.792 <sup>a</sup> (0.001)	2.069 <sup>b</sup> (0.008)	8.583 <sup>d</sup> (0.022)	13.506 <sup>f</sup> (0.378)	26.452 <sup>i</sup> (0.177)	13.874 <sup>e</sup> (0.107)	23.588 <sup>h</sup> (0.488)	15.672 <sup>g</sup> (0.104)	6.656 <sup>c</sup> (0.447)	3147.82***
<b>Apig+Naring</b>	0.105 <sup>b</sup> (0.005)	0.000 <sup>a</sup> (0.000)	0.000 <sup>a</sup> (0.000)	0.310 <sup>c</sup> (0.003)	0.000 <sup>a</sup> (0.000)	0.923 <sup>f</sup> (0.168)	0.432 <sup>d</sup> (0.013)	0.715 <sup>e</sup> (0.001)	0.478 <sup>d</sup> (0.024)	94.35***
$\Sigma$ Flavones	0.897	2.069	8.535	13.816	26.452	13.797	24.02	16.387	7.134	
<b>FLAVANONE</b>										
<b>Pinocembrin</b>	0.683 <sup>a</sup> (0.022)	0.921 <sup>a</sup> (0.003)	6.017 <sup>b</sup> (0.264)	12.593 <sup>d</sup> (1.240)	24.782 <sup>f</sup> (0.833)	11.112 <sup>d</sup> (0.022)	14.603 <sup>e</sup> (1.334)	8.374 <sup>c</sup> (0.424)	6.445 <sup>b</sup> (0.082)	340.76***
$\Sigma$ Total	3.153	6.071	32.547	51.292	104.466	69.36	69.023	55.483	30.181	



De lo observado en el análisis de las muestras de España, queda patente la importancia de la zona de recolección de los propóleos en su composición en compuestos fenólicos. Se han observado diferencias significativas en la composición de muchos compuestos entre zonas con características climáticas, geográficas y botánicas muy distintas. Por lo tanto, en la composición de los propóleos, más que el país de procedencia, es el entorno de la colmena lo que puede influir decisivamente en su composición.

## CONCLUSIONES

Las muestras de propóleo de Rumania y España obtuvieron una concentración media superior de compuestos fenólicos al de China y Ucrania. Honduras fue el país que obtuvo una concentración media total más baja, debido a su escaso perfil fenólico, sin embargo, las muestras de este país se detectó la presencia de ciertos compuestos, no identificados en este trabajo pero que podrían ser objeto de investigaciones futuras.

El estudio más en detalle de las muestras de España, puso en evidencia la existencia de importantes diferencias en el perfil fenólico entre zonas geográficas, incluso más acusadas a las detectadas entre países.

Las muestras de algunas zonas de España se caracterizaron por su elevada concentración de chrysin o en pinocembrin, mucho mayor a la concentración del resto de compuestos fenólicos, lo que hace pensar que los propóleos recolectados en ellas se podrían caracterizar por tener una elevada concentración de este compuesto.

Se puede concluir que la composición fenólica del propóleo depende de la ubicación geográfica de la colmena y por lo tanto de características climáticas y botánicas que ello implica.

## BIBLIOGRAFÍA

- AL-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. 2018. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines*, 5(1), 2.
- Al, L., Dezmirean, D., Laslo, L., Moise, A., Popescu, O., & Maghear, O. 2007. Validated method for estimation of total flavonoids in Romanian propolis. Retrieved from <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/zootehnie/article/viewFile/2220/2133>
- Bankova, V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.

- Bankova, V., Galabov, A. S., Antonova, D., Vilhelmova, N., & Di Perri, B. 2014. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine*, 21(11), 1432-1438.
- Bonvehí, J. S., & Coll, F. V. 1994. Phenolic composition of propolis from China and from South America. *Zeitschrift für Naturforschung c*, 49(11-12), 712-718.
- Bonvehí, J. S., & Gutiérrez, A. L. 2011. Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American oil chemists' society*, 88(9), 1387-1395.
- Cartaya, O. 2013. Reseña bibliográfica FLAVONOIDEOS: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES. *Cultivos tropicales*, 22(2), 5-14.
- Castro, C., Mura, F., Valenzuela, G., Figueroa, C., Salinas, R., Zuñiga, M. C., ... & Delporte, C. 2014. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. *Food research international*, 64, 873-879.
- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1), 107–110. <http://doi.org/10.1016/j.microc.2008.08.011>
- Cottica, S. M., Sabik, H., Antoine, C., Fortin, J., Graveline, N., Visentainer, J. V., & Britten, M. 2015. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 609-614.
- El Sohaimy, S. A., & Masry, S. H. D. 2014. Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian and Chinese propolis. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 10, 1116-1124.
- Escríche, I., Juan-Borrás, M. 2018. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, 106, 834-841.
- Falcão, S. I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M. R., Freire, C., Cardoso, S. M., & Vilas-Boas, M. 2013. Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC–MS spectrometry: Uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochemical Analysis*, 24(4), 309-318.
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.
- Hatano, A., Nonaka, T., Yoshino, M., Ahn, M. R., Tazawa, S., Araki, Y., & Kumazawa, S. 2012. Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. *Food Science and Technology Research*, 18(4), 577-584.
- Hegazi, A. G., El Hady, F. K. A., & Allah, F. A. A. 2000. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(1-2), 70-75.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.
- Isidorov, V. A., Bakier, S., Pirożnikow, E., Zambrzycka, M., & Swiecicka, I. 2016. Selective behaviour of honeybees in acquiring European propolis plant precursors. *Journal of Chemical Ecology*, 42(6), 475-485.

- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., & Karathanos, V. T. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116(2), 452-461.
- Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Maruška, A., & Kubilienė, L. 2014. Chemometric analysis of volatiles of propolis from different regions using static headspace GC-MS. *Open Chemistry*, 12(6), 736-746.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), 329-339.
- Midorikawa, K., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Matsushige, K., Message, D., ... Kadota, S. (2001). Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochemical Analysis*, 12(6), 366–373. <http://doi.org/10.1002/pca.605>
- Neto, M. R., Tintino, S. R., da Silva, A. R. P., do Socorro Costa, M., Boligon, A. A., Matias, E. F., ... & Coutinho, H. D. M. 2017. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 572-580.
- Oroian, M., & Escriche, I. 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
- Pellati, F., Orlandini, G., Pinetti, D., & Benvenuti, S. 2011. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(5), 934-948.
- Sawaya, A. C. H. F., da Silva Cunha, I. B., & Marcucci, M. C. 2011. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, 5(1), 27.