



Detección de compuestos fenólicos por espectrofotometría UV-Visible en propóleos de la provincia de Holguín, Cuba

Detection of phenolic compounds by UV-Visible spectrophotometry in propolis in the province of Holguin, Cuba

Autor(es): MSc. Meyglin Fonseca Roche¹, MSc Gisela Valdés González¹, Lic. Mario Fajardo Cárdenas¹ y Téc. Yaneisy Naranjo Alfonso¹.

1-Centro de Investigaciones Apícolas, Carretera de El Cano a El Chico km/0.Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana, Cuba. Teléfono: 72020890.

cromatografia_gaseoso@ciapi.minag.cu

Recibido: 24 - 6- 2016

Aprobado: 19 -7- 2016

RESUMEN

El propóleo, producto natural que el hombre utiliza desde tiempos remotos con fines terapéuticos, formado por resinas que las abejas recolectan de ciertas especies de plantas, de las flores y brotes de las hojas, las cuales mezclan con la saliva, enzimas y otras secreciones propias del insecto. Su composición química es variable y compleja ya que depende esencialmente de la flora vegetal, donde el grupo de compuestos fenólicos presentes son los más comúnmente responsables de la actividad biológica, y la mayoría de éstos se presentan en forma de flavonoides, cuya concentración y actividad biológica dependerán fundamentalmente del tipo de planta de la cual proviene, razón por la que han sido utilizados como marcadores de calidad del propóleo. Este trabajo tuvo como objetivo aplicar un método analítico de espectrofotometría UV Visible en un rango de 240 nm hasta 420 nm a muestras de propóleos de apiarios pertenecientes a municipios de la provincia de Holguín, con vista a la detección de los compuestos fenólicos y considerar la inclusión de esta determinación como un estándar de calidad del propóleo cubano.

Se obtuvo como resultado que todas las muestras de propóleos con la porción de ensayo 1:1000 y 0,4mg/mL de la resina presentaron máximos de absorción, resultando positivas a la presencia de compuestos fenólicos, que los niveles de dilución relativamente bajo pueden ser utilizados para la detección de este grupo por la obtención del espectrograma UV Visible y que el método empleado puede ser introducido para aplicar en el monitoreo de la composición fenólica del propóleo cubano.

Palabras clave: Compuestos fenólicos, propóleos, espectrofotometría.

ABSTRACT

Propolis, natural product used by man since ancient times for therapeutic purposes, consisting of resins that bees collect from certain species of plants, flowers and leaf buds, which mixed with saliva, enzymes and other own secretions of the insect, is a variable and complex chemical composition since it depends essentially on the plant flora, where the group of phenolic compounds present are the most commonly responsible for biological activity, and most of these are in the form of flavonoids, whose concentration and biological activity They will depend mainly on the types of plant from which it comes from, that is why they have been used as markers of quality of propolis. This study aimed to apply an analytical method of UV-Visible spectrophotometry in the range of 240 nm to 420 nm to propolis samples apiaries belonging to municipalities in the province of Holguin, with

a view to the detection of phenolic compounds and considered including this determination as a standard of quality of Cuban propolis.

As a result, it was determined that all propolis samples with the test portion 1: 1000 and 0.4mg / mL resin showed absorption maxima resulting positive to the presence of phenolic compounds, that relatively low levels of dilution can be used for the detection of this group by obtaining UV-Visible spectrogram and that the method can be introduced to apply to the monitoring of the phenolic composition of Cuban propolis.

Keywords: Phenolic compounds, propolis, spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto de la colmena formado por resinas que las abejas recolectan de ciertas especies de plantas, de las flores y brotes de las hojas, las cuales mezclan con la saliva, enzimas y otras secreciones propias de las abejas.

Su composición química es variable y compleja ya que depende, como se mencionó anteriormente, de la flora local cercana al sitio donde se encuentra la colmena donde los principales componentes son resinas y bálsamos (50-55%), ceras (25- 35%), aceites volátiles (10%), polen (5%), minerales y sustancias orgánicas (5%). Se han detectado ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, aldehídos aromáticos, cumarinas, compuestos fenólicos como flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavonoles).

Este producto de la colmena ha sido utilizado desde tiempos antiguos por las propiedades farmacéuticas o actividad biológica que se le han atribuido, tales como: antibacteriana, antiviral, antifúngica, anticancerígena, antioxidante, cicatrizante, inmunoestimulante, anestésica, analgésica, fitoinhibidora, antiinflamatorio, antiúlcero y hepatoprotector entre otras.

El grupo de compuestos con actividad biológica más comúnmente son los conocidos como compuestos fenólicos, y la mayoría de éstos se presentan en forma de flavonoides, cuya concentración y actividad biológica dependerán del tipo de planta en la cual se llevó a cabo la recolección. Tales propiedades son dependientes de su composición química, lo que hace necesario establecer un marco normativo para evaluar la calidad o características, así como las propiedades y límites de seguridad de este producto.

Los flavonoides, junto con los ácidos fenólicos y sus esteroides, genéricamente denominados "compuestos fenólicos", son pigmentos vegetales con una importante acción antioxidante, actualmente considerados los principales componentes bioactivos del propóleo. Ambos absorben radiación en la región UV protegiendo de la radiación solar a los tejidos vegetales más sensibles.

Para que la calidad del propóleo sea considerada aceptable debe cumplir ciertos requisitos, tales como: estar libre de residuos tóxicos; poseer bajo contenido de cera, materia insoluble y cenizas; presencia de compuestos químicos de origen botánico con marcada actividad biológica que han sido usados como marcadores de calidad del propóleo .

Por su amplia diversidad en la composición química y su empleo en la medicina, cosmético y alimentación, han traído como consecuencia la necesidad de control de su calidad y su normalización en general.

La absorción en la región del espectro UV-Visible es uno de los parámetros físico químicos usados para evaluar los propóleos, ya que el propóleos absorbe fuertemente la luz UV el rango de 270 a 350 nm e indica una presencia importante de flavonoides que tienen valor biológico., los cuales presentan absorciones máximas (λ_{max}) entre estas longitudes de onda, pudiéndose inferir que las diferencias en la λ_{max} corresponden a diversas composiciones de fenoles y flavonoides presentes en los propóleos como consecuencia de sus diferentes orígenes botánicos y geográficos.

Este trabajo tuvo como objetivo aplicar espectrofotometría UV Visible en un rango de 240 nm hasta 420 nm a muestras de propóleos de apiarios pertenecientes a los municipios Sagua de Tánamo, Frank País, Banes, Báguano, Gibara y Cueto de la provincia de Holguín, Cuba, con vista a la detección de los compuestos fenólicos y considerar la inclusión de esta determinación como un estándar de calidad del propóleos cubano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los propóleos utilizados en este estudio fueron recolectados por el sistema de raspado de apiarios pertenecientes a diferentes municipios de la provincia de Holguín (ver Tabla No.1).

Se trabajó con la resina soluble en etanol o fracción alcohólica de propóleos procedentes de una extracción por Soxhlet con etanol al 96%, después de la eliminación de las sustancias solubles en n-hexano.

Para conocer la concentración de sólidos solubles totales de las resinas obtenidas, se realizó por método gravimétrico, sometiénolas a un secado en estufa a 105°C.

A cada una de las resinas se les realizó el espectrograma de absorción UV Visible, preparando dos porciones de ensayo diferentes: una dilución de 1 en 1000 con alcohol etílico y la otra conociendo el contenido de sólidos solubles totales fueron ajustadas a 0.4mg/ml también con alcohol etílico.

Posteriormente, se les efectuó un barrido de longitudes de onda desde 240 nm hasta 420 nm en el espectrofotómetro de UV Visible JENWAY 6715. Se graficaron los valores de absorbancia medidos en función de la longitud de onda para describir su espectro. La presencia de compuestos fenólicos se consideró positiva si se registra un máximo de absorción ($\lambda_{máx}$) entre 270 nm y 315 nm.

Los resultados fueron procesados a través de un análisis de t-Student, con un grado de confianza del 95% en el paquete estadístico SPSS versión 22.

Tabla 1.- Ubicación de la zona de muestreo

No	Municipio	Apiario
1	Sagua de Tánamo	Guagui
2	Sagua de Tánamo	La Demajagua
3	Frank País	No.1 El Quemado
4	Frank País	Tánamo
5	Frank País	Collaso
6	Banes	Retrete 2
7	Báguano	La Cueva
8	Gibara	Loma alta
9	Cueto	Birán
10	Procedente de la producción almacenada en la UEB	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado del espectrograma UV visible (ver tabla 2), aplicado a las muestras donde fue utilizado el procedimiento correspondiente a la dilución 1:1000 de la resina obtenida, donde sus valores de longitud de onda de máxima absorción estuvieron entre 288 y 292nm.

Para estas muestras correspondientes a la dilución 1:1000 se obtuvieron máximos de absorbancias entre 270 nm y 315 nm que son los valores donde se considera positiva la presencia de compuestos fenólicos por la aparición de un pico máximo de absorción para las normativas argentina, pero también cumplieron con la legislación de Brasil y la norma del Salvador, donde plantean la detección de los flavonoides por picos entre 200 y 400nm (10) y entre 250nm a 350nm por la presencia de uno o más picos.

En el caso de las muestras cuya porción de ensayo correspondió a la dilución de 0,4mg/mL los valores de longitud de onda fueron de 291nm y 315nm. Para esta porción de ensayo también tuvieron máximos de absorbancias entre 270 nm y 315 nm, valores donde se considera positiva la presencia de compuestos fenólicos.

Similar al caso anterior las porciones de ensayo con este nivel de concentración (0,4mg/ml), también estuvieron en los rangos normados para esta determinación del espectrograma UV Visible.

Comparando los resultados se encontró que los valores de longitudes de onda de máxima absorción, fueron superiores para las porciones de ensayo de 0,4mg/mL (ver figura 1), correspondiéndose a muestras con mayor concentración de resinas, por lo tanto, con

presencia de mayor cantidad de este grupo de compuestos aunque no se ha podido determinar una correlación entre el contenido de resinas y el de fenoles totales. Esto fue corroborado con los resultados estadísticos donde se encontró la presencia de diferencias significativas.

Al parecer el nivel de dilución a emplear puede ser relativamente bajo para la detección de estos compuestos por este método del espectrograma UV Visible, ya que se obtuvieron resultados con la utilización de la dilución 1:1000 a partir de resinas con valores bajos de sustancias extraíbles en alcohol que oscilaron entre 0,17 y 3,46mg/mL. Martínez y col, utilizaron extractos del propóleo al 1% que diluyeron con etanol al 95% hasta obtener soluciones en el rango de absorbancia de 1 a 2,5 unidades.

Por otro lado, se plantea que las diferencias en las longitudes de onda de máxima absorción entre las muestras corresponden a diversas composiciones de fenoles y flavonoides presentes en los propóleos como consecuencia de sus diferentes orígenes botánicos y geográficos

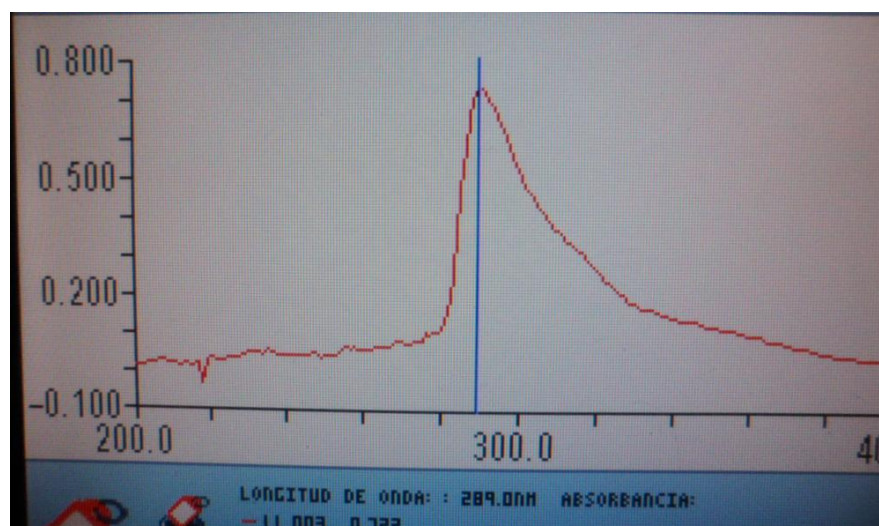
Otro aspecto a tener en cuenta con respecto a la variabilidad o diferencias es lo que se ha planteado de que la abeja elabora el propóleo de acuerdo a sus necesidades y probabilidades de fuentes de materia prima, por lo que está demostrado internacionalmente que será muy difícil encontrar dos colmenas que produzcan propóleos idénticos, aun cuando estén ubicados en la misma zona geográfica. Es más los propóleos de las distintas partes de la colmena no tendrán exactamente la misma composición. Pero estas variaciones no están dadas por la diversidad de los elementos que están presentes en su composición que básicamente se mantendrán estables, sino en las cantidades de cada uno de ellos que estarán presentes en cada muestra.

Tabla 2. Resultados de las determinaciones del_% de la Resina (g/mL), sustancias solubles en etanol (g/100g de propóleos) y el espectrograma UV Visible

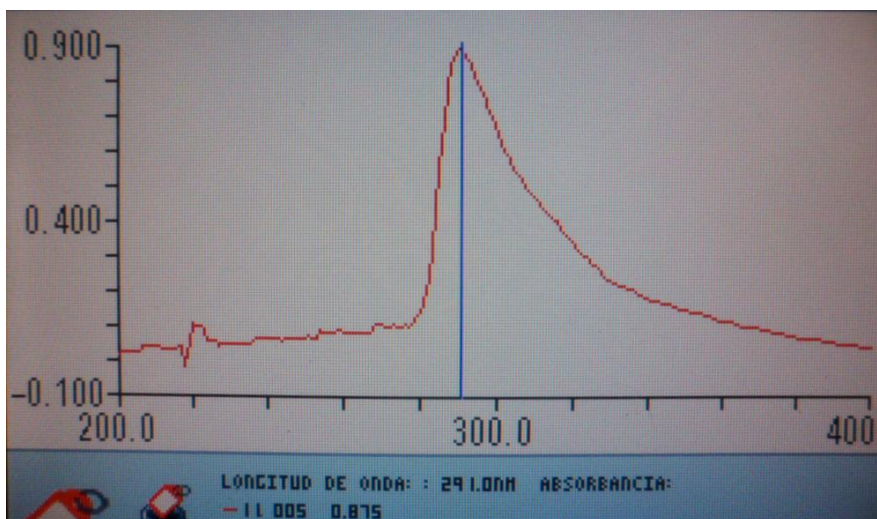
No. muestra	% de la Resina (g/mL)	% de Sustancias solubles en etanol (g/100g de propóleos)	λ máx 1:1000	λ máx 0,4mg/mL
1	1,11	18,3	290	313
2	1,94	31,97	292	300
3	2,56	42,32	289	315
4	2,22	36,71	289	300
5	3,46	56,97	290	300
6	0,78	11,85	288	295
7	0,5	7,83	289	291
8	1,33	20,69	288	298
9	0,24	21,6	292	299
10	0,17	13,6	288	298
Valor mínimo	0,17	7,83	288	291
Valor máximo	3,46	56,97	292	315

Espectrogramas UV Visibles encontrados en algunas de las muestras.

Muestra 7(1:1000)



Muestra 7: 0,4mg/mL



CONCLUSIONES

Todas las muestras de propóleos con la porción de ensayo 1:1000 y de 0,4mg/mL de la resina presentaron máximos de absorción resultando positivas a la presencia de compuestos fenólicos.

Los resultados de los espectrogramas obtenidos cumplieron con las legislaciones de Argentina, Brasil y El Salvador.

Para la dilución de 0,4mg/mL se encontró que los valores de longitudes de onda de máxima absorción fueron superiores.

Niveles de dilución relativamente bajos pueden ser utilizados para la detección de los compuestos fenólicos por este método del espectrograma UV Visible.

El método empleado puede ser introducido para aplicar en el monitoreo de la composición fenólica del propóleos cubano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, M.S. (2012). *Caracterización organoléptica y física química de propóleos del Departamento de la Libertad, Perú*. The Biologist. . Vol 10, No. 1.
- Bedascarrasbure, E; Maldonado, L; Álvarez, A y Rodríguez, E. (2004). *Contenido de fenoles y flavonoides del propóleos argentino*. Acta Farm. Bonaerence.. 23 (3): 369-72.
- Chaillou LL & Nazareno MA. (2009). *Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition*. Food Sci. Technol. 42: 1422-1427.
- Farré R, Frassetto I & Sánchez A. *El propolis y la salud*. (2004.) *Ars Pharm*. 45: 23-43.
- Instrução normativa nº 3. (2001) Legislação. Anexo VI. *Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de propolis*
- López del Villar, J.A y Ubillos, C.M.M. (2004). *Estandarización del propóleos de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. Tesis para optar por el título profesional de Químico Farmacéutico*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Maidana, J.F, Rodríguez, M y Chazarreta, A.M. *Determinación de fenoles totales en propóleos de la provincia de Santiago de Estero*. [Api-guia.com.ar/propoleos /fenoles.htm](http://api-guia.com.ar/propoleos/fenoles.htm). consultado (2014).
- Martínez G.J, García, P.C, Durango, R.D, Gil, G.J. (2012). *Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección*. Rev.MVZ Córdoba. 17(1):2861-2869.
- Norma Argentina. (2008). *Propóleos en Bruto*. Norma IRAM-INTA 15935-1. Instituto Argentino de Normalización. Buenos Aires, Argentina.
- Norma Salvadoreña Obligatoria. (2003). *Calidad del Propóleos Crudo*. Norma NSO 65.19.02:03. CONACYT. Diario Oficial. Tomo 360. San Salvador, El Salvador.
- Palomino, L.R; García, C.M; Gil, J.H; Rojano, B.A; Durango, R. (2009). *Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia)*. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Volumen 16 Número 3. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 388-395.
- Papotti G, Bertelli D, Bortolotti L, Plessi M. (2011). *Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods*. J. Agric Food Chem. 60: 2852-2862.

- Peña, R.C. (2008). *Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos*. *Cien. Inv. Agr.* 35(1): 17-26. www.rcia.puc.cl
- Salamanca, G.G, Correa, I.L y Principal, J. (2007). *Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos*. *Zootecnia Tropical*. 25(2):95-102.
- Yang H, Dong Y, Du H, Shi H, Peng Y, Li X. (2011). *Antioxidant compounds from propolis, collected in Anhui, China*. *Molecules*.16: 3444-3455.