



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

FACULTAD DE FARMACIA

DOCTORADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGIA ANALITICA

DESARROLLO DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS PARA DETERMINAR LA
CORRELACIÓN ENTRE BIO-ACTIVIDAD Y CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y
ESPECTROSCÓPICAS DE PROPÓLEOS PROVENIENTES DE DISTINTAS
ZONAS APÍCOLAS DEL SUR DE CHILE.

POR:

YOVANI ALEXIS VENEGAS SEPULVEDA

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al grado académico de Doctor en Ciencias y Tecnología Analítica

Profesor Guía : Dr. David Rodrigo Contreras Pérez

Profesor Co-Guía : Dr. Edgar Rafael Pastene Navarrete

Marzo de 2016

Concepción, Chile



“According to all known laws of aviation, there is no way that a bee should be able to fly. Its wings are too small to get its fat little body off the ground. The bee, of course, flies anyways. Because bees don't care what humans think is impossible.”

Dedicado con amor a mi familia Paola Andrea, Benjamin, BO, Valeria y Vicente

INDICE

INDICE	3
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCION	9
ESTADO ACTUAL DE LA APICULTURA EN CHILE.....	9
PRODUCTOS APÍCOLAS. USOS Y APLICACIONES DE PROPÓLEOS.....	11
ESTUDIOS DE PROPÓLEOS EN CHILE.....	13
CAPÍTULO 1	18
DIVERSIDAD QUÍMICA DE PROPÓLEOS Y LA PROBLEMÁTICA DE SU ESTANDARIZACIÓN.....	18
1. <i>Importancia de los polifenoles en la bio-actividad del propóleos</i>	22
2. <i>Propóleos y el estudio de su composición química</i>	30
A. Determinación de compuestos por Cromatografía Líquida.....	31
B. Determinación de compuestos por Cromatografía Gaseosa.....	33
C. Determinación de compuestos por Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIR).....	35
D. Determinación de compuestos por Espectroscopia UV-Vis.....	43
CAPÍTULO 2	57
PROPÓLEOS Y ESTUDIOS DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	57
1. <i>Actividad Antibacteriana</i>	57
2. <i>Actividad Antioxidante</i>	59
3. <i>Actividad Antiinflamatoria</i>	61
4. <i>Actividad Anticarcinogénica, Antitumoral y Antiproliferativa</i>	63
5. <i>Actividad Antiaterogénica</i>	66
6. <i>Efectos sobre el sistema Cardiovascular</i>	67
7. <i>Actividad Antidiabética</i>	68
8. <i>Actividad Antiviral</i>	69
MÉTODOS SEMI-AUTOMATIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	71
1. <i>Determinación de la capacidad antioxidante</i>	72
2. <i>Determinación de actividad antidiabética</i>	75
CAPÍTULO 3	88
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIADA.....	88
1. <i>Diseño del modelo predictivo con espectroscopia NIR</i>	92
A. Visualización de espectros NIR.....	92
B. Transformación de datos.....	93
C. Pre-procesamiento de datos.....	96
2. <i>Optimización del modelo predictivo</i>	98
A. Eliminación de outliers.....	99
B. Selección del número de factores.....	100
C. Selección del rango de variable independientes.....	100
D. Análisis de error.....	101

3. Validación del modelo predictivo.....	103
A. Mejoramiento del modelo predictivo.....	104
CAPÍTULO 4	107
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	107
1. Objetivo General.....	108
2. Objetivos Específicos.....	108
CAPÍTULO 5	109
SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TOTAL POLYPHENOLS AND TOTAL FLAVONOIDS IN PROPOLIS BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPY AND PLS.....	109
RESUMEN.....	110
INTRODUCTION.....	111
MATERIALS AND METHODS	113
2.1. Propolis samples	113
2.2. Total Polyphenols determination.....	113
2.3. Total Flavonoids determination.....	114
2.4. Acquisition of NIR spectra.....	115
2.5. Multivariate data analysis.....	115
RESULTS.....	118
3.1. Total Polyphenols and total Flavonoids content.....	118
3.2. NIR Spectra	119
3.3. Optimization of PLS in Cross Validation.....	119
3.3.1. Pre-processing and Transform data.	119
3.3.2. Outlier identification.....	120
3.4. External validation.....	122
3.4.1 Optimization of NIR spectral data	122
3.4.2. LOD and LOQ estimation for predictive models.....	125
DISCUSSION.....	126
ACKNOWLEDGMENTS	127
REFERENCES.....	128
CAPÍTULO 6	134
A NEW NEAR INFRARED METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PROPOLIS	134
SUMMARY.....	134
RESUMEN.....	135
INTRODUCTION.....	137
MATERIALS AND METHODS	140
2.1. Propolis samples	140
2.2. Reference Methods.....	140
2.2.1. CAPE equivalents determination in propolis samples.....	140
2.2.2. Estimation of antioxidant capacity by High-throughput DPPH Assay.	141
2.3. Acquisition of NIR spectra and HPLC-EC chromatograms.....	143
2.4. Multivariate data analysis.....	144
RESULTS.....	147
3.1. Determination of CAPE equivalents in propolis samples.	147

3.2. Estimation of antioxidant capacity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay.....	149
3.3. Optimization of PLS algorithm using the NIR spectra by Cross Validation	152
3.3.1. External Validation in predictive model of CAPE content.	153
3.3.2. External Validation in predictive model of Antioxidant Activity of propolis samples by EC_{50} estimation.....	156
3.3.3. LOD and LOQ estimation for predictive models.....	159
DISCUSSION.....	159
ACKNOWLEDGMENTS	161
REFERENCES	162
CAPÍTULO 7	169
OTROS ENSAYOS Y EXPERIMENTOS. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	169
FRACCIONAMIENTO RÁPIDO DE MUESTRAS DE PROPÓLEOS POR UN SISTEMA TRIFÁSICO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.	171
1. Introducción.....	171
2. Materiales y Métodos.....	172
A. Muestras de Propoleo	172
B. Fraccionamiento de las muestras de propoleo.....	172
C. Análisis de las fracciones de propoleo por HPLC-CE	172
D. Análisis del contenido de polifenoles y flavonoides totales en las fracciones de propóleo.	173
3. Resultados.....	175
4. Discusión.....	178
5. REFERENCIAS	180
ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE A-AMILASA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV EN MICROPLACA DE ALTO RENDIMIENTO.	181
1. Introducción.....	181
2. Materiales y Métodos.....	182
A. Muestras de Propoleos.....	182
B. Ensayo de Inhibición de Amilasa Pancreática de origen porcino.....	183
3. Resultados.....	183
4. Discusión.....	184
5. REFERENCIAS	185
ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE A-AMILASA DE ORIGEN PORCINO POR ESPECTROMETRÍA NIR Y PLS.	186
1. Introducción.....	186
2. Materiales y Métodos.....	186
A. Muestras de Propóleos.....	186
B. Ensayo de Inhibición de Amilasa Pancreática de origen porcino.....	187
C. Adquisición de espectros NIR.	187
D. Análisis de datos espectrales	187
3. Resultados.....	189
4. Discusión.....	190
5. REFERENCIAS	191
CONCLUSIONES	192
AGRADECIMIENTOS	195

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: COMPUESTOS REPORTADOS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIFERENTES TIPOS DE PROPÓLEOS ESTUDIADOS EN CHILE.....	14
TABLA 2: COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIFERENTES TIPOS DE PROPÓLEOS.....	21
TABLA 3: CONDICIONES HPLC PARA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PROPÓLEOS.	32
TABLA 4: CONDICIONES GC PARA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PROPÓLEOS.	35
TABLA 5: ALGUNAS LONGITUDES DE ONDA (NM) ASOCIADAS AL GRUPO FUNCIONAL AROMÁTICO EN ESPECTROSCOPIA NIR.	40
TABLA 6: CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN OTRAS MUESTRAS DE PROPÓLEOS.	46
TABLA 7: MERIT FIGURES FOR TOTAL POLYPHENOLIC AND FLAVONOIDS CONTENT IN METHANOLIC EXTRACT BY HIGH-THROUGHPUT MICROPLATE ASSAY. *	118
TABLA 8: EFFECT OF TRANSFORM DATA IN PREDICTIVE MODEL OPTIMIZATION. *	120
TABLA 9: EFFECT OF OUTLIER EXCLUSION IN PREDICTIVE MODEL OPTIMIZATION. **	121
TABLA 10: IMPACT OF WAVELENGTH SELECTED IN EXTERNAL VALIDATION BY TOTAL POLYPHENOLS ..	124
TABLA 11: IMPACT OF WAVELENGTH SELECTED IN EXTERNAL VALIDATION BY TOTAL FLAVONOIDS	125
TABLA 12: LOD AND LOQ ESTIMATIONS FOR POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS	126
TABLA 13: MERIT FIGURES FOR CAPE EQUIVALENTS BY HPLC-EC IN METHANOLIC EXTRACT OF RAW PROPOLIS.....	148
TABLA 14: ANTIOXIDANT ACTIVITY EXPRESSED AS EC ₅₀ AND TEAC ₅₀ FROM PROPOLIS SAMPLES ACCORDING THEIR ORIGIN.....	151
TABLA 15 : PREDICTIVE MODEL FOR CAPE CONTENT OBTAINED FROM NIR SPECTRA DURING EXTERNAL VALIDATION.	154
TABLA 16: PREDICTIVE MODEL FOR EC 50 OBTAINED FROM NIR SPECTRA DURING EXTERNAL VALIDATION.	157
TABLA 17: LOD AND LOQ ESTIMATIONS FOR CAPE CONTENT AND EC50	159
TABLA 18: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE AMILASA POR ESPECTROMETRÍA UV	184
TABLA 19: ANÁLISIS DE ERROR Y TRATAMIENTO DE DATOS PARA MODELOS PREDICTIVOS DE A-AMILASA	189

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE ALGUNOS ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EN PROPÓLEOS.....	25
FIGURA 2: ESTRUCTURA BÁSICA DE ALGUNOS FLAVONOIDES ENCONTRADOS EN PROPÓLEOS.	27
FIGURA 3: POSIBLES SITIOS DE UNIÓN DE METALES PARA FLAVONOIDES (QUERCETINA).....	61
FIGURA 4: REPRESENTACIÓN DE UN ESTUDIO MULTIVARIADO A PARTIR DE UN MÉTODO DE REFERENCIA.	91
FIGURA 5: ESPECTRO NIR QUE DISCRIMINA EN AL MENOS DOS TIPOS DE MUESTRAS.	93
FIGURA 6: A) EFECTO DE SUAVIZADO; B) INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE PRIMERA Y SEGUNDA DERIVADA (1D Y 2D) EN LA DISMINUCIÓN DEL RUIDO Y VALORES ABERRANTES	94
FIGURA 7: ELIMINACIÓN DE VARIABLES QUE NO CONTRIBUYEN AL MODELO PREDICTIVO EN UN ESPECTRO NIR	101
FIGURA 8: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ETAPA DE VALIDACIÓN DE UN MODELO PREDICTIVO.	103
FIGURA 9: RAW NIR SPECTRA OF 26 (N=2) PROPOLIS SAMPLES BETWEEN 800 NM AND 2780 NM.	119
FIGURA 10: REGRESSION VECTOR AND CORRELATION SPECTRUM FOR TOTAL POLYPHENOLS AND TOTAL FLAVONOIDES IN EXTERNAL VALIDATION BETWEEN 800-2780 NM WAVELENGTHS	122
FIGURA 11: NIR SPECTRUM OF REFERENCE SAMPLE USED IN ALIGN TRANSFORM. (A) CORRELATION SPECTRUM TOTAL POLYPHENOLS, (B) REGRESSION VECTOR TOTAL POLYPHENOLS, (C) CORRELATION SPECTRUM TOTAL FLAVONOIDES, (D) REGRESSION VECTOR TOTAL FLAVONOIDES.	123
FIGURA 12: EXPERIMENTAL AND PREDICTED VALUES FOR THE OPTIMIZED NIR SPECTRUM ZONE TO EXTERNAL VALIDATION IN PLS ANALYSIS: A) TOTAL POLYPHENOLS CONCENTRATION, B) TOTAL FLAVONOIDES CONCENTRATION.....	127
FIGURA 13: AREA UNDER CURVE (AUC) FOR DPPH SCAVENGING VERSUS TROLOX CONCENTRATION FOR TEAC DETERMINATION.	143
FIGURA 14: CHROMATOGRAMS OBTAINED FROM PROPOLIS EXTRACTS: A) CONTROL SAMPLE B) SPIKED WITH QUERCETIN (1), KAEMPFEROL (2) AND CAPE (3).....	148
FIGURA 15: A) REACTION RATES OF A PROPOLIS SAMPLE TO DIFFERENT CONCENTRATIONS LEVELS TO ESTIMATE AREA UNDER THE CURVE (AUC) B) AUC VS LOG (PROPOLIS CONCENTRATION) FOR CALCULATE EC ₅₀ CONCENTRATION OF EACH PROPOLIS SAMPLE.	150
FIGURA 16: RAW NIR SPECTRA OF 26 (N=2) PROPOLIS SAMPLES BETWEEN 800 NM AND 2780 NM.	153
FIGURA 17: SCATTER PLOT SHOWING A CORRELATION BETWEEN PLS PREDICTION VALUE AND REFERENCE MEASUREMENT FOR CAPE CONTENT.	155
FIGURA 18: SCATTER PLOT SHOWING A CORRELATION BETWEEN PLS PREDICTION VALUE AND REFERENCE MEASUREMENT FOR EC ₅₀ ESTIMATION.	158
FIGURA 19: CHROMATOGRAM USED AS REFERENCE TO ALIGN THE SAMPLES FOR HPLC-EC ANALYSIS USING MULTIVARIATE CALIBRATION PLS	161
FIGURA 20 CROMATOGRAMAS SUPERPUESTOS DEL FRACCIONAMIENTO DE MUESTRAS DEL ESTUDIO. .	176
FIGURA 21: MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN EXTRACTO TOTAL Y FRACCIONES DE PROPOLEO.....	177
FIGURA 22: MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES EN EXTRACTO TOTAL Y FRACCIONES DE PROPOLEO.....	178
FIGURA 23: DISTRIBUCIÓN DE CAPE EN TRES FRACCIONES DE PROPOLEO POR SISTEMA TRIFÁSICO DE EXTRACCIÓN.	179
FIGURA 24: GRÁFICO DE CORRELACIÓN ENTRE EL MÉTODO DE REFERENCIA Y EL VALOR DE PREDICCIÓN DEL MODELO PREDICTIVO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL PROPOLEO SOBRE LA ACTIVIDAD DE AMILASA PANCREÁTICA.	190

RESUMEN

Se abordó la problemática de la estandarización del propóleos, desde un enfoque basado en el estudio quimiométrico de la correlación entre la composición química y la actividad biológica de muestras recolectadas en diferentes zonas geográficas de la región del Biobío y Araucanía. Se implementó un método espectroscópico de bajo costo para caracterizar muestras crudas de propóleos en función de su composición química. Fueron desarrollados modelos predictivos de actividad biológica para ser utilizados en el control de la producción de productos apícolas.

Para desarrollar estos modelos se utilizó la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) con muestras de propóleos crudas, sin ningún tipo de procesamiento. Los espectros NIR fueron calibrados con los resultados obtenidos por diferentes métodos de referencia, (espectroscópicos y cromatográficos) para algunos compuestos de interés biológico relevante, tal como son el contenido de polifenoles totales, el contenido de flavonoides totales y el contenido de equivalentes de fenil éster de ácido cafeico (CAPE). Simultáneamente, a partir de los mismos espectros NIR, se desarrollaron modelos predictivos PLS de la bio-actividad "in vitro" que pudieran tener 26 muestras de propóleos determinadas por los métodos tradicionales de inhibición enzimática, como fueron la actividad antioxidante y la actividad antidiabética. La capacidad de predicción simultánea de marcadores químicos responsables de alguna actividad biológica relevante mediante el uso de herramientas quimiométricas permite inferir que es posible abordar la problemática de la estandarización de propóleos de manera rápida, eficiente, automatizable y de bajo costo, siendo esta información útil para la industria apícola y que puede ser extrapolado a otro tipo de investigación de productos naturales.

Palabras Clave: Propóleos, NIR, PLS, CAPE, Flavonoides, Polifenoles

INTRODUCCION

Estado actual de la Apicultura en Chile.

El desarrollo de la apicultura en Chile ha tenido un importante apoyo del Estado en iniciativas desarrolladas por agricultores y sociedades apícolas en el mundo rural. Por la vía de proyectos individuales y asociativos se han implementado un número importante de emprendimientos de desarrollo apícola financiados por instituciones como el Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP) con su programa PRODESAL (Programa de Desarrollo Local) encargados de apoyar a los pequeños productores agrícolas y sus familias que desarrollan actividades silvoagropecuarias. La Corporación de Fomento de la Producción (CORFO) y el Servicio de Cooperación Técnica (SERCOTEC) son instituciones cuya misión es impulsar la actividad productiva y apoyar iniciativas de mejoramiento de la competitividad de las micro y pequeñas empresas. El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) es el organismo dependiente del Ministerio de Agricultura encargado de apoyar el desarrollo de la agricultura en Chile y una de sus labores es aplicar instrumentos que permitan determinar la aptitud para consumo humano de la miel y otros productos apícolas, así como también velar por el cumplimiento de los requisitos y exigencias internacionales y verificar la información de respaldo necesaria para la certificación de productos apícolas. Es así como existe toda una institucionalidad ligada al desarrollo de la apicultura en Chile, desde la etapa de formulación de proyectos, apoyo al emprendimiento, asesoría técnica, evaluación del producto final y verificación del cumplimiento de exigencias fitosanitarias. Todo esto, asociado a la favorable condición climática debiera permitir que Chile fuera un productor destacado de productos apícolas en el concierto internacional.

Sin embargo, esta actividad ha presentado problemas relacionados con la implementación de estas unidades productivas, cuyas principales falencias son: Escasa capacitación e infraestructura para el manejo de apiarios productivos, saludables e inocuos; bajos estándares de calidad en la producción; escaso valor agregado en los productos terminados; falta de estudios científicos que avalen los beneficios de estos productos; reducidas posibilidades de control sobre la producción apícola, entre otros. Esto se traduce en dificultades y barreras para los productores en acceder a nuevos mercados restringiendo sus posibilidades de mejorar sus ganancias, lo que no guarda relación con las buenas perspectivas descritas anteriormente. Es por ello que el progreso de la apicultura en Chile requiere aportes de I+D principalmente en las etapas de control de calidad de la producción y desarrollo y diferenciación de productos. Asimismo, es importante realizar estudios científicos que determinen las propiedades saludables de estos productos y demuestren los beneficios asociados a su consumo y utilización.

En este contexto, el Programa de Doctorado en Ciencias y Tecnología Analítica de la Universidad de Concepción nace como un programa innovador, orientado en la formación de recursos humanos de alto nivel con capacidad para realizar investigación independiente y original, innovación tecnológica y gestión, cuya visión implica una vinculación sólida y permanente con el sector productivo nacional. El desarrollo de investigaciones científicas asociadas al emprendimiento local es una estrategia que permite a los productores otorgar un mayor valor agregado a su trabajo, mejorar su competitividad, acceder a nuevos mercados y valorizar la imagen de Chile como país productor de bienes saludables y con altos estándares de calidad.

Productos apícolas. Usos y aplicaciones de Propóleos.

La Miel, propóleos y jalea real son productos apícolas que han sido usados por muchos años en “medicina popular” con diversas aplicaciones beneficiosas para el hombre. Destacado es el aporte nutritivo de la miel como una fuente natural de carbohidratos, utilizada principalmente como un endulzante natural. El propóleos forma parte de la medicina tradicional desde tiempos ancestrales, donde muchas culturas lo han utilizado en ritos fúnebres y usos medicinales. La Jalea real es el alimento recibido por la abeja reina durante todo su estado larval, confiriéndole un mayor desarrollo y tamaño que el resto de sus hermanas. Se le ha utilizado por la industria cosmética como un tónico para la piel y estimulante del crecimiento del cabello así como también para la longevidad en la medicina tradicional.

El propóleos, del griego “**propolis**” *pro*: defensa y *polis*: ciudad; es un producto natural resinoso y adhesivo que es recolectado, transformado y utilizado por ***apis mellifera sp.***, cuya función principal es mantener un adecuado estado de sanidad apícola. Las abejas recolectan resinas y bálsamos a partir de grietas presentes en la corteza de los árboles y brotes de las hojas, en un radio de vuelo aproximado de 5 km. Esta resina es masticada, parcialmente digerida y mezclada con sus propias enzimas salivales y cera, para ser almacenado al interior de la colmena. (Burdock, 1998). Después de la miel, es el segundo producto en cantidad elaborado por las abejas. Es utilizado para sellar espacios abiertos, recubrir las paredes internas de la cámara de cría y celdas reales, proteger del ingreso de intrusos y prevenir la descomposición de organismos extraños que hayan ingresado al interior de la colmena.

Existe evidencia significativa que valida muchas propiedades de propóleos como antiséptico, antifúngico, antibacteriano, antiviral, antiinflamatorio, inmunomodulador, protector hepático, antidiabético, antitumoral y antioxidante. (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Banskota, 2001; Castaldo & Capasso, 2002; Matsui et al., 2004; Fuliang et al., 2005; Viuda-Martos et al, 2008). Algunas de sus aplicaciones son preparaciones para el síndrome de resfrío, afecciones de garganta, preparaciones dermatológicas para el tratamiento de quemaduras, acné, herpes, etc. (Burdock, 1998). Además ha sido utilizado en enjuagues bucales o pastas dentales para prevenir las caries y tratar la gingivitis y la estomatitis (Libério et al, 2009). Aplicado externamente, alivia varios tipos de infecciones causadas por bacterias y hongos (Castaldo & Capasso, 2002). En la década del 70 y 80 se realizaron estudios en pacientes que demuestran la efectividad de Propóleos en dermatología, otorrinolaringología, enfermedades ginecológicas, enfermedades digestivas, odontología y otras patologías (Marcucci, 1995). Respecto de su toxicidad, el Propóleos contiene algunos compuestos que pueden causar dermatitis de contacto y reacciones de hipersensibilidad (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Basista-Soltys, 2013). El cálculo de la LD₅₀ en ratones se calcula superior a 2000 mg/kg (Burdock, 1998; Banskota, 2001) concluyendo que es un producto de muy baja toxicidad. La ingesta crónica del propóleos también ha sido evaluada, no encontrándose alteraciones bioquímicas que sugieran toxicidad a largo plazo (Mani et al, 2006), al contrario, mostrando una buena biodisponibilidad oral y un adecuado perfil de seguridad (Basista-Soltys, 2013). Estas propiedades, que han sido acreditadas por diversos investigadores en los últimos 30 años, son las responsables de la proliferación en el mercado de productos derivados del Propóleos provenientes tanto de la industria farmacéutica como alimenticia.

Estudios de Propóleos en Chile.

En Chile, los primeros estudios de propóleos reportaron la presencia de algunos flavonoides como pinocembrina, crisina y galangina en muestras de la región de Valdivia (Alarcón, 1989). Luego, en 1998 se reportó la presencia de lignanos por espectroscopia infrarroja, 1^{H} -RMN y HPLC de una muestra de propóleos chileno proveniente de la región de O'Higgins (Valcic S. et al, 1998). En el año 2000, se estudió la actividad antioxidante de una muestra de propóleos obtenida en la zona de San Clemente, región del Maule, describiéndose la presencia de dos flavanonas, tres flavonas y un compuesto del tipo flavanol por 1^{H} -RMN, obteniéndose como resultado una buena actividad atrapadora del radical DPPH y un importante porcentaje de inhibición de la xantina oxidasa para algunos compuestos (Astudillo et al, 2000). En estudios realizados en la zona central del matorral chileno, se determinó la presencia de pinocembrina, acacetina, galangina, izalpina, ácido cinámico entre otros compuestos, (Muñoz et al, 2001). Montenegro en 2004 estudia el origen botánico del propóleos chileno en muestras obtenidas entre la quinta y la octava región, obteniéndose una buena clasificación de los tipos de polen obtenidos en las colmenas en estudio (Montenegro G. et al, 2004) Ese mismo año, Russo y colaboradores estudiaron la actividad antioxidante y acción antiproliferativa de líneas celulares tumorales en humanos, de una muestra de propóleos de la sexta región que fue caracterizada mediante HPLC-DAD, identificándose los compuestos galangina, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico y fenetil ester del ácido caféico (CAPE) (Russo A. et al, 2004). En 2006, este mismo grupo estudió la acción del propóleos como protector del daño sobre espermatozoides humanos generado por especies reactivas del oxígeno (ROS), obteniéndose también resultados satisfactorios. (Russo A. et al, 2006). Recientemente, en muestras provenientes de la Zona Central, se reportó la

presencia de ácido cafeico, CAPE, ácido ferúlico, galangina, genisteína, kaempferol, pinocembrina, quercetina y vainillina, entre otros compuestos (Castro et al, 2014) confirmando además la actividad antiinflamatoria tanto in vivo como in vitro (Valenzuela-Barra et al, 2015). La Tabla 1 muestra un cuadro resumen con la evolución en el tiempo de los estudios de propóleos realizados en Chile.

Tabla 1: Compuestos reportados y actividad biológica de diferentes tipos de propóleos estudiados en Chile.

Año	Origen Muestra	Composición química	Actividad biológica	Autor	Publicación
1989	Valdivia	Flavonoides (Crisina, Galangina)	No reportada	Alarcón R.	Estudio Químico de Propóleos. <i>Tesis pregrado UACH</i>
1998	Pichilemu (Yaquil)	Lignanos	No reportada	Valcic et al	Lignans from Chilean Propolis. <i>J. Nat. Prod.</i> 1998 (61) 771-775
1999	Pichilemu (Yaquil)	Viscidona, coniferil aldehído, etil éster del ácido ferulico, vainillina)	Antibacteriana	Valcic et al	Phytochemical, Morphological, and Biological Investigations of Propolis from Central Chile. <i>Z. Naturforsch.</i> 1999 (54c) 406-416
2000	San Clemente	Flavanonas, flavonas, flavanol.	Antioxidante y antiinflamatoria	Astudillo et al	Biologically active compounds from Chilean propolis. <i>Bol. Soc. Chil. Quim.</i> 2000 (45) 577-581
2001	Colliguay	Pinocembrina, acacetina, galangina, izalpina, ácido cinámico	No reportada	Muñoz et al	Phenolic Compounds of Propolis from Central Chilean Matorral. <i>Z. Naturforsch.</i> 2001 (56c) 273-277
2004	San Vicente Tagua Tagua	Galangina, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico y fenetil éster del ácido caféico (CAPE)	Antioxidante y antiproliferativa	Russo et al	Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. <i>Life sciences</i> 2004 (76) 545-558
2010	Araucanía	Acido cafeico, miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, galangina y CAPE	Hepatomodulador	Herrera et al.	El Propóleos Reduce la Esteatosis Hepática Inducida por Dieta en Ratones. <i>Int. J. Morphol.</i> 2010 (28):75-84
2012	Araucanía (Cunco)	Pinocembrina, CAPE, quercetina, galangina	Anti-angiogenico	Daleprane et al	Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. <i>Journal of Nutritional Biochemistry</i> 2012 (23) 557-566
2014	Araucanía (Cunco)	Acido cafeico, ácido ferrulico, pinobanksina, quercetina, quercetina, pinocembrina, kaempferol, apigenina, ácido cafeico benzyl éster, ácido cafeico phenethyl éster, galangina	Anti-angiogenico	Cuevas et al	Identification of microRNAs involved in the modulation of pro-angiogenic factors in atherosclerosis by a polyphenol-rich extract from propolis. <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i> 2014 (557) 28-35
2014	Región Metropolitana	Acido cafeico, ácido ferrulico, pinobanksina, quercetina, pinocembrina, kaempferol, apigenina, ácido cafeico benzyl éster, ácido cafeico phenethyl éster, galangina	Antioxidante	Castro et al	Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. <i>Food Research International</i> (2014) 64 873-879
2015	Región Metropolitana	Acido cafeico, ácido ferrulico, pinobanksina, quercetina, pinocembrina, kaempferol, apigenina, ácido cafeico benzyl éster, ácido cafeico phenethyl éster, galangina	Antiinflamatorio	Valenzuela-Barra et al	Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. <i>Journal of Ethnopharmacology</i> 2015 (168) 37-44

REFERENCIAS

- ALARCÓN, R. A. (1989) Estudio Químico de Propóleos. *Tesis de Grado Pedagogía en Biología, Química y Ciencias Naturales, Facultad de Filosofía y Humanidades*. Valdivia, Universidad Austral de Chile.
- ASTUDILLO S, L., AVILA R, F., MORRISON A, R., GUTIERREZ C, M., BASTIDA, J., CODINA, C. & SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. (2000) Biologically active compounds from chilean propolis. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 45, 577-581.
- BANSKOTA, A. H., TEZUKA, Y. & KADOTA, S. (2001) Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15, 561-571.
- BASISTA-SOLTYS K (2013) Allergy to propolis in Polish beekeepers *Postepy Dermatologii I Alergologii*, 29(6): 440-445.
- BURDOCK, G. (1998) Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347-363.
- CASTALDO, S. & CAPASSO, F. (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, 1, S1-S6.
- CASTRO, C., MURA, F., VALENZUELA, G., FIGUEROA, C., SALINAS, R., ZÚÑIGA, M. C., TORRES, J. L., FUGUET, E. & DELPORTE, C. (2014) Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. *Food Research International*, 64, 873-879.
- FULIANG, H. U., HEPBURN, H. R., XUAN, H., CHEN, M., DAYA, S. & RADLOFF, S. E. (2005) Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacological Research*, 51, 147-152.

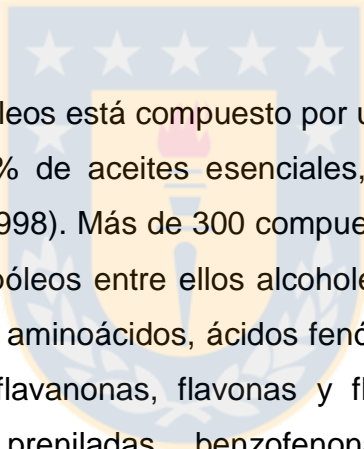
- LIBERIO, S. A., PEREIRA, A. L. A., ARAUJO, M. J. A. M., DUTRA, R. P., NASCIMENTO, F. R. F., MONTEIRO-NETO, V., RIBEIRO, M. N. S., GONCALVES, A. G. & GUERRA, R. N. M. (2009) The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 1-9.
- MANI, F., DAMASCENO, H. C. R., NOVELLI, E. L. B., MARTINS, E. A. M. & SFORCIN, J. M. (2006) Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 95-98.
- MARCUCCI, M. C. (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- MATSUI, T., EBUCHI, S., FUJISE, T., ABESUNDARA, K. J. M., DOI, S., YAMADA, H. & MATSUMOTO, K. (2004) Strong Antihyperglycemic Effects of Water-Soluble Fraction of Brazilian Propolis and Its Bioactive Constituent, 3,4,5-Tri-O-caffeoylquinic Acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1797-1803.
- MONTENEGRO, G., MUJICA, A. M., PEÑA, R. C., GÓMEZ, M., SEREY, I. TIMMERMANN, B. N. (2004) Similitude Pattern and Botanical Origin of the Chilean Propolis. *Phyton*, 73, 145-154.
- MUÑOZ O. ET AL., (2001) Phenolic Compounds of Propolis from Central Chilean Matorral. *Z. Naturforsch.* 56c, 273-277
- RUSSO, A., CARDILE, V., SANCHEZ, F., TRONCOSO, N., VANELLA, A. & GARBARINO, J. A. (2004) Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*, 76, 545-558.
- RUSSO, A., TRONCOSO, N., SANCHEZ, F., GARBARINO, J. A. & VANELLA, A. (2006) Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[α]pyrene and exogenous reactive oxygen species. *Life Sciences*, 78, 1401-1406.

- VALCIC, S., MONTENEGRO, G. & TIMMERMANN, B. N. (1998) Lignans from Chilean Propolis. *Journal of Natural Products*, 61, 771-775.
- VALENZUELA-BARRA, G., CASTRO, C., FIGUEROA, C., BARRIGA, A., SILVA, X., DE LAS HERAS, B., HORTELANO, S. & DELPORTE, C. (2015) Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 37-44.
- VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. & PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. (2008) Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science*, 73, R117-R124.



CAPÍTULO 1

Diversidad química de propóleos y la problemática de su estandarización.



En general el propóleos está compuesto por un 50% de resina vegetal, 30% de cera de abeja, 10% de aceites esenciales, 5% de polen y 5% de otras sustancias (Burdock, 1998). Más de 300 compuestos han sido reportados como constituyentes del propóleos entre ellos alcoholes, aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos y aromáticos, aminoácidos, ácidos fenólicos y sus ésteres, polifenoles del tipo flavonoides (flavanonas, flavonas y flavonoles), cetonas, terpenos, lignanos, cumarinas preniladas, benzofenonas preniladas, esteroides y azúcares entre otros. (Marcucci, 1995, Miguel et al, 2010). Sus características organolépticas se relacionan directamente con su composición química la que varía cualitativa y cuantitativamente de acuerdo al origen geográfico, botánico y a la fenología de la flora local (Marcucci, 1995; Medic-Sarich et al, 2009), siendo este uno de los aspectos que más dificulta su estandarización.

De acuerdo a sus características organolépticas se distinguen al menos tres variedades de propóleos de diferente origen y vegetación predominante:

- a) Propóleos café-amarillento encontrado en Europa central, China, Argentina y Chile, donde se destaca su alto contenido de compuestos polifenólicos de tipo flavonoides (quercetina, galangina, pinocembrina, canferol, crisina,

acaecetina, izalpina), ácidos fenólicos (ácido cafeico, ferúlico y p-cumárico) y sus ésteres (fenetil y prenil éster del ácido cafeico). Su origen botánico se asocia predominantemente a las familias *salicaceae*, géneros *populus* sp. (álamo) y *salix* sp. (sauce) y a la familia *myrtaceae*, genero *eucalyptus* sp. (eucalipto). (Muñoz et al, 2001; Russo et al, 2004; Castro et al, 2014)

- b) Propóleos verde, encontrado preferentemente en el sur de Brasil se destaca por su alta producción (200-300 g al mes) asociada a la exuberante vegetación predominante y al desarrollo de innovadoras técnicas de recolección (colector inteligente o Pirassununga). Derivados de terpenos y el ácido 3,5-diprenil-4-hydroxicinámico o artepillina C es un compuesto que se encuentra presente en este tipo de propóleos y su principal fuente vegetal proviene de la familia *asteraceae*, género *baccharis* sp. (*baccharis dracunculifolia*) (Aga H. et al, 1994).
- c) Propóleos rojo, proveniente de zonas con clima cálido tropical como la isla de Cuba, Venezuela y norte de Brasil, donde sus compuestos más destacados son del tipo benzofenonas isopreniladas y algunas de sus fuentes vegetales provienen del genero *clusia* sp (*clusia rosea*) y *dalbergia* sp (*dalbergia ecastophyllum*) (Cuesta-Rubio et al, 2007; Ribeiro et al, 2012)

Las variaciones estacionales también influyen en la composición química del propóleos (Teixeira et al., 2008). En la zona de temperatura del hemisferio norte, las abejas recolectan propóleos sólo en verano (incluyendo el final de la primavera y el comienzo del otoño) y la variación estacional de la composición del propóleos es poco significativa en esta región. En Brasil, sin embargo, la recolección de propóleos puede durar todo el año, pero algunos ácidos aromáticos presentes en el propóleos se ven afectados en su composición durante el paso de las diferentes estaciones del año (Bankova et al, 1998). Esto nos indica que la variación estacional de la composición del propóleos es

predominantemente cuantitativa, indicando que las abejas recolectan el propóleo del mismo grupo de plantas determinado por su radio de vuelo.

También se han realizado algunos estudios que comparan la influencia de la raza de abeja en la composición química del propóleo y su actividad antibacteriana contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos (Silici & Katluka, 2005). El análisis por GC-MS de extractos etanólicos derivatizados demostró que existe alguna diferencia entre las tres razas del estudio: *apis melifera caucasica* resultó tener una mayor actividad antibacteriana que las variedades *anatolica* y *cárnica*, siendo ésta una aproximación que también debe ser considerada.

Algunos estudios indican que en muestras procedentes de diferentes zonas geográficas y climáticas se mantiene presente la actividad biológica del propóleo, particularmente su actividad sobre microorganismos, siendo esta actividad resultado de una composición química totalmente diferente. (Markham et al, 1996; Kujumgiev et al, 1999; Bankova, (A) 2005). La Tabla 1.1 nos muestra los compuestos a los que se le atribuye una actividad biológica, extraídos de muestras de propóleos de diferente origen geográfico y botánico. Esto sugiere que *apis melifera* es capaz de adaptarse y sintetizar propóleos útiles para la colmena y cumplir su función de sanidad apícola en cualquier condición, dependiendo sólo de la vegetación disponible en el lugar de recolección dentro de su radio de vuelo. Esto ha llevado a algunos investigadores a proponer que las propiedades biológicas del propóleo sean correlacionadas con una detallada investigación de su composición química y de su origen botánico, siendo este uno de los aspectos que más dificulta su estandarización. (Sforcin & Bankova, 2011).

Tabla 2: Compuestos responsables de la actividad biológica de diferentes tipos de propóleos.

Tipo de Propoleo	Actividad Antibacteriana	Actividad Antiinflamatoria	Actividad Antitumoral	Actividad Hepatoprotectora	Actividad Antioxidante	Actividad Alergénica
Europeo (tipo poplar)	Flavanonas, Flavonas, Acidos Fenólicos y sus esteres	Flavanonas, Flavonas, Acidos Fenólicos y sus esteres	Acido Cafeico Fenetil ester (CAPE)	Acido Cafeico, Acido Ferrulico, CAPE	Flavonoides, Acidos Fenólicos y sus esteres	3,3-Dimetilalil
Brasileño (tipo Baccharis)	Acido p-cumarico prenilado, labdano, diterpenos	No identificado	Acido p-cumarico prenilado, diterpenos, benzofuranos	Acido p-cumarico prenilado, Flavonoides, Lignanos, Acido Cafeoilquimico	Acido p-cumarico prenilado, Flavonoides	No ensayado
Cubano	Benzofenonas preniladas	No testeado	Benzofenonas preniladas	No identificado	Benzofenonas preniladas	No ensayado

Extraído de Bankova V., 2005 b. eCAM 2005;2(1)29-32

Por todo lo expuesto, la problemática de la estandarización del propóleo es un tema complejo, que ha sido abordado por diferentes investigadores mediante la elucidación de su composición química y la correlación de esta con su actividad biológica. Dada la variabilidad de la matriz y las características particulares de los distintos tipos de propóleos que se han investigado esta labor resulta compleja, demanda mucho tiempo, requiere la disponibilidad de varias técnicas analíticas y generalmente deja de lado las interacciones entre los diferentes compuestos que constituyen la matriz. El análisis multivariado del propóleo en conjunto con la determinación selectiva de algunos compuestos con actividad biológica relevante permitiría establecer un parámetro de calidad de las muestras que nos ayude a desarrollar un sistema de control que facilite su estandarización.

1. Importancia de los polifenoles en la bioactividad del propóleo.

Resulta interesante estudiar la relación existente entre la estructura química de los polifenoles presentes en el propóleo y los mecanismos de acción involucrados en las diferentes actividades biológicas descritas en la Tabla 1. Se cree que los flavonoides podrían estar implicados en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de funciones de la membrana citoplasmática e inhibición del metabolismo energético de ciertas bacterias (Cushnie & Lamb, 2005). La quercetina, uno de los componentes del propóleo ha demostrado provocar un aumento en la permeabilidad de la membrana bacteriana y una disipación del potencial de membrana. (Mirzoeva et al, 1997). Este mecanismo de acción antibacteriana nos hace pensar que aunque quercetina ha mostrado una gran actividad antioxidante (Kumazawa et al, 2004) su acción sobre la permeabilidad en la bacteria puede deberse a un efecto pro oxidante, que podría estar asociado a la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS). En determinadas condiciones se ha descrito que los polifenoles podrían generar especies reactivas al oxígeno como el H_2O_2 o incluso $\cdot OH$ a través de la reacción de Haber-Weiss-Fenton. Esta polifuncionalidad por parte de algunos compuestos fenólicos (galato de epigallocatequina, EGCG, por ejemplo), es evidente si se considera que además, éstos podrían generar ambientes oxidativos diferenciales que permitan proteger a las células del huésped de las ROS y por otro lado promover la apoptosis de las células tumorales (Yamamoto et al., 2003). Una hipótesis recientemente planteada para explicar el por qué sólo ciertos antioxidantes polifenólicos se muestran activos contra bacterias, considera el potencial efecto pro oxidante que muestran ciertos polifenoles. La forma en que los polifenoles podrían actuar como generadores de especies reactivas del oxígeno fue abordada por varios investigadores (Ahoshima et al., 2005; Arakawa et al, 2002; Arakawa et al,

2004; Aragawa et al., 2003), y utilizando como modelo de polifenoles, catequinas de té verde (cuya propiedad bactericida es conocida), los autores demostraron que a pH 7-8 (o superiores), tal tipo de estructura es capaz de generar cantidades significativas de peróxido de hidrógeno. De acuerdo a los autores, la generación de peróxido de hidrógeno podría explicar el efecto bactericida de los flavan-3-oles. La habilidad de las catequinas para generar peróxido de hidrógeno sería favorecida por el arreglo de grupos hidroxilo en este tipo de moléculas, lo que permitiría la disociación del H⁺ en solución y un electrón en el fenol que reduce al oxígeno, generándose en consecuencia anión superóxido. El anión superóxido posteriormente sufre reducción por la catequina (ej. EGCG), lo que lleva a la formación de O₂²⁻; adicionalmente, el protón se combina con el superóxido generando H₂O₂. Este mecanismo no sólo explicaría la generación de H₂O₂ producida por catequinas puras. También se ha observado la producción de dicho oxidante en infusiones de té negro, té verde y té oolong en las cuales se pudo determinar concentraciones de H₂O₂ correspondientes a 1.5 x 10⁻⁴, 2,4 x 10⁻⁴ y 0.87 x 10⁻⁴ mol/L, respectivamente. Estos niveles de H₂O₂ serían suficientes para ejercer una acción bactericida en cepas Gram positivas y negativas (Arakawa et al., 2004).

La inhibición enzimática es uno de los mecanismos por los cuales los polifenoles ejercen muchos de sus efectos. En determinados casos tal inhibición está asociada a fenómenos competitivos, donde el compuesto polifenolico es capaz de unirse al sitio activo de la enzima promoviendo un efecto inhibitorio. En otras ocasiones los polifenoles pueden inhibir las enzimas alterando la arquitectura tridimensional de ésta. Las ureasas son enzimas ricas en tioles, donde por ejemplo, el contenido total de éstos en la ureasa Jack bean (vegetal) se ha estimado en 15 grupos por subunidad. Sin embargo, solo 6 de las 15 cisteínas son accesibles a reactivos selectivos para ellos. Una de esas 6 cisteínas, Cys592, está localizada en el brazo móvil que cierra el sitio activo de la ureasa. Esta cisteína juega un papel crucial en la actividad catalítica (Ciurli et

al., 1999). Recientemente, una serie de estudios han demostrado cómo la presencia de ciertos grupos funcionales como los quinónicos y tiosulfatos en los inhibidores irreversibles de ureasa, afecta el grado de oxidación de los tioles de la ureasa Jack bean (Takishima et al., 1998; Kot, 2006; Krajewska et al., 2007; Zaborska et al., 2007, Zaborska et al, 2009). En determinadas condiciones, los compuestos que presentan estos grupos funcionales, pueden inducir la oxidación de los tioles de la ureasa de una forma similar al efecto oxidante de H₂O₂. En efecto, la modificación química de Cys592 resulta en inactivación de la enzima. Sin embargo, la modificación covalente de las otras 5 cisteínas, las cuales son más reactivas que Cys592, no afectan la actividad de la enzima. El mismo fenómeno ha sido descrito anteriormente para la Xantina oxidasa (XO) (Anderson et al., 1995). Por lo tanto, se ha sugerido que los polifenoles capaces de generar tales ambientes redox promueven la inhibición enzimática a través de las reacciones señaladas anteriormente.

La relación entre la estructura de los polifenoles presentes en el propóleos y su actividad antioxidante ha sido revisada recientemente (Kurek-Górecka A. et al, 2014), particularmente en lo que respecta a ácidos fenólicos y flavonoides. Los ácidos fenólicos están constituidos por un anillo de benceno, grupos carboxilo e hidroxilo tal como se muestra en la Figura 1. Su actividad antioxidante depende del número de grupos hidroxilo presente en su estructura y sus efectos estéricos. La posición de los grupos hidroxilo, así como el tipo de sustitución en el anillo aromático, influyen en la actividad antioxidante de estos compuestos. Derivados monohidroxilados del ácido benzoico con un grupo hidroxilo en la posición -orto o -para en el anillo no muestran actividad antioxidante, contrariamente a los derivados en posición -meta. Además, la actividad antioxidante aumenta en ácidos con un grupo hidroxilo junto con la presencia del grupo metoxi adicional en el anillo. La sustitución de un grupo alquilo o metoxi en la posición orto aumenta la estabilidad y las propiedades antioxidantes de los ácidos fenólicos. Derivados dihidroxilados del ácido

benzoico muestran tener mayor actividad antioxidante cuando los grupos hidroxilo aparecen en las posiciones 3 y 5. Acido gálico, que contiene tres grupos hidroxilo en posiciones 3, 4 y 5, se caracteriza por ser un potente antioxidante. La esterificación del grupo carboxilo en ácido gálico disminuye sus capacidades antioxidantes.

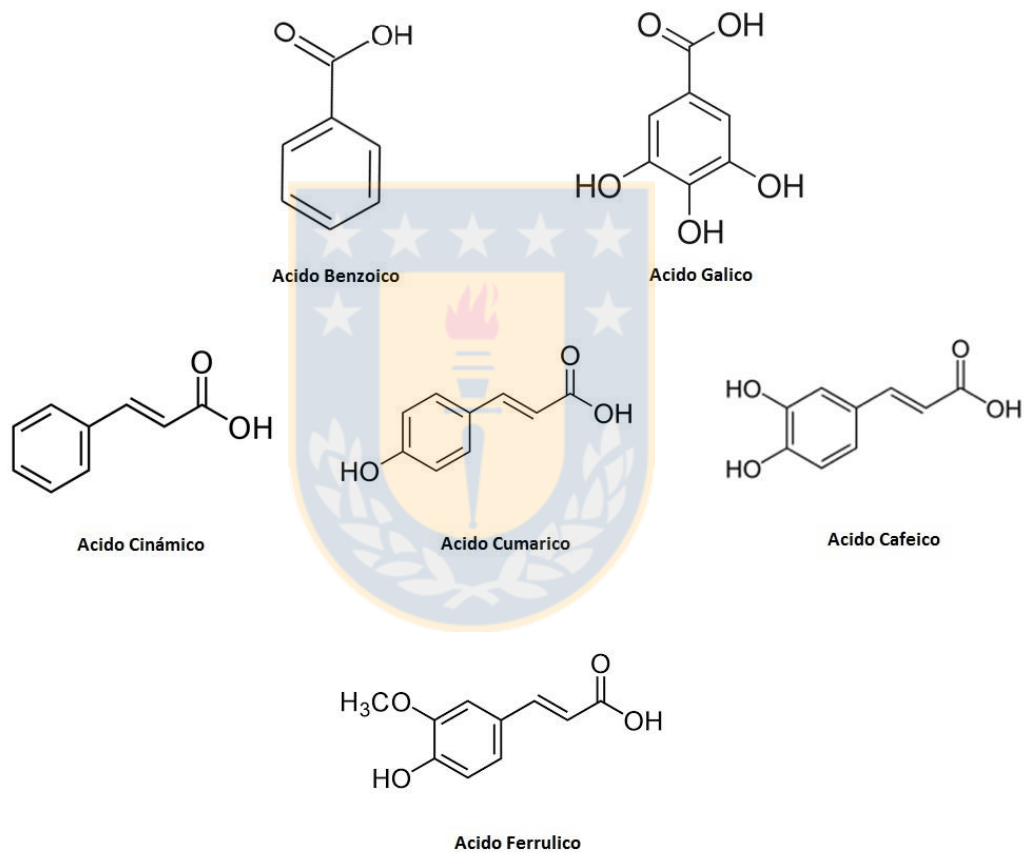


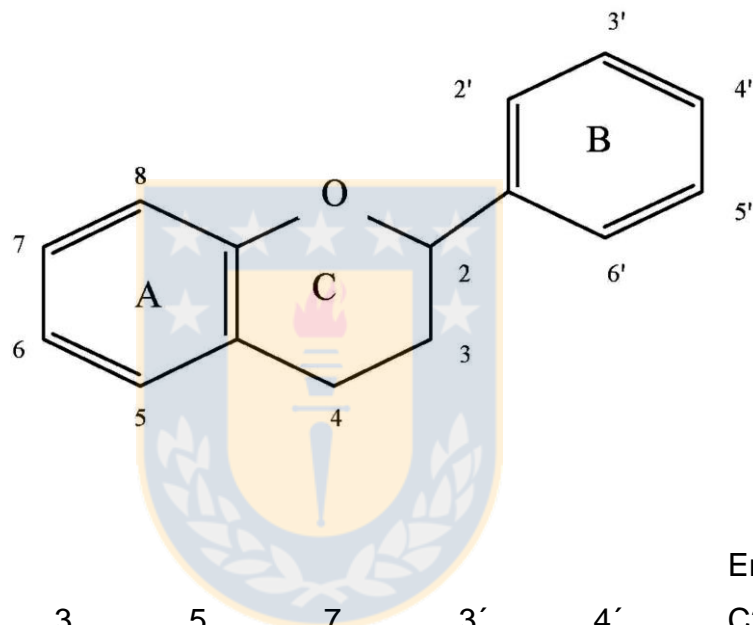
Figura 1. Estructura química de algunos ácidos fenólicos presentes en propóleos.

Por otro lado, la influencia de los grupos hidroxilo adicionales en el anillo aromático provoca un aumento de la actividad antioxidante, lo que se puede

observar en el caso del ácido cinámico. El ácido cafeico tiene un efecto antioxidante más potente que el ácido cumárico derivado de la presencia de un grupo hidroxilo adicional en posición -meta. La potencia de la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos también depende de la ubicación del grupo carboxilo. Este grupo tiene un impacto negativo en las propiedades donadoras de los hidroxibenzoatos y sus derivados. Los ácidos hidroxicinámicos que tienen una cadena lateral con un grupo etileno, muestran mayor capacidad de donar hidrógeno y el radical formado es más estable. Por lo tanto, los derivados del ácido cinámico muestran mejores propiedades antioxidantes que derivados del ácido benzoico. El ácido ferúlico, con un grupo metoxi en la posición 3 muestra una mayor capacidad para estabilizar radicales fenoxi que el ácido p-cumárico. El ácido cafeico se caracteriza por una mejor reactividad hacia los radicales en un ambiente acuoso que el ácido ferúlico. El ácido ferúlico muestra afinidad a los lípidos, que se relaciona a la sustitución del átomo de hidrógeno en el grupo hidroxilo con un grupo metilo. Esto le confiere mejores propiedades antioxidantes en entornos de tipo emulsión, en comparación con el ácido cafeico que tiene un mejor desempeño en solventes polares como el agua. La presencia del grupo metoxi en el ácido ferúlico hace que sea más eficaz como antioxidante que el ácido p-cumárico. Esto es debido a la capacidad del grupo metoxi como donante de electrones, provoca el aumento de la capacidad de estabilizar los radicales ariloxi y hace que un compuesto de dicha estructura sea un antioxidante más eficaz. En su investigación sobre las grasas de oxidación, Rice-Evans y colaboradores determinaron que la actividad antioxidante varía en el siguiente orden: ácido cafeico > ácido ferúlico > ácido p-cumárico (Rice-Evans et al. 1996)

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas que pueden actuar como fitoalexinas y tienen un papel importante en los procesos de crecimiento, protección UV y señalización química de las plantas. (Ignat et al, 2011; Massaro et al, 2014). El elemento básico de su estructura es una unidad

de C6-C3-C6 que consta de 15 átomos de carbono, como se ve en la Figura 2, que incluye un anillo benzoico y una unidad de fenilpropano. La mayoría de los flavonoides crean un sistema heterocíclico que contiene oxígeno entre sus anillos aromáticos. Un elemento frecuente de su estructura es un doble enlace en la posición C-2 y C-3, así como la presencia de un grupo carbonilo en la posición C-4.



	3	5	7	3'	4'	Enlace
pinocembrina	H	OH	OH	H	H	C2-C3 Simple
crisina	H	OH	OH	H	H	Doble
narigenina	H	OH	OH	H	OH	Simple
apigenina	H	OH	OH	H	OH	Doble
galangina	OH	OH	OH	H	H	Doble
kaempferol	OH	OH	OH	OH	H	Doble
quercetina	OH	OH	OH	OH	OH	Doble

Figura 2: Estructura básica de algunos flavonoides encontrados en propóleos.

En las plantas, estos compuestos generalmente aparecen como estructuras de glucósido, en los que el fragmento de azúcar contiene 1 a 5 moléculas de monosacáridos unidos con enlaces O- o C-glucósido. Los azúcares que aparecen más frecuentemente son hexosas (glucosa, galactosa), pentosas (arabinosa, xilosa, mañosa) o ácidos urónicos (ácido glucurónico, ácido galacturónico); estos a menudo son esterificados con ácido sulfúrico, ácidos alifáticos (acético o malónico) o ácidos aromáticos (benzoico, cinámico). Las clases básicas de flavonoides son: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, isoflavonas, flavan-3-oles (catequinas), chalconas, antocianidinas y leukoantocianidinas. Los flavonoides se caracterizan por poseer propiedades antioxidantes. Estas propiedades están estrechamente relacionadas con la estructura de estos compuestos. La actividad antioxidante eficaz de flavonoides es el resultado de los siguientes elementos de su estructura:

- el grupo orto-dihidroxi (catecol) en el anillo B, muestra capacidad significativa como "atrapador" de radicales de oxígeno (ROS) y radicales de nitrógeno (RNS) provocando una alta estabilidad del radical fenoxilo recién creado. Los grupos hidroxilo en el anillo B son donadores de electrones y de nitrógeno para los radicales. (Ejemplo: Quercetina)
- el doble enlace entre el carbono C-2 y C-3 y la presencia del grupo 4-oxo en el anillo C es la razón de la deslocalización de un electrón en el anillo B. Las propiedades antioxidantes son el resultado de la deslocalización de un electrón en la unidad aromática. Durante la reacción de estos compuestos con radicales libres, los radicales fenoxilo formados se estabilizan por el efecto de la resonancia en el anillo aromático.
- grupos hidroxilo cercanos de los carbonos C-3 y C-5 en presencia de grupos 4-oxo en el anillo A y C generan los efectos máximos de "atrapamiento" de radicales libres.

Las propiedades antioxidantes de los flavonoides disminuyen ante la glicosilación o la presencia de grupos metoxilo en el carbono C-3, probablemente asociado a un impedimento estérico. El mayor poder antioxidante se ha observado en los Flavon-3-oles (por ejemplo, -quercetina, miricetina, morina), flavan-3-oles-catequinas (galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, epigallocatequina, catequina) antocianidinas (cianidina) (Rice-Evans et al. 1996; Heim et al, 2002).

La actividad antioxidante de los polifenoles es una de sus propiedades más estudiadas. Un amplio espectro de la actividad biológica de estos compuestos con respecto al cuerpo humano se traduce en gran parte de sus efectos antioxidantes sobre radicales libres formados a partir de formas reactivas del oxígeno (ROS) que se producen por la reducción gradual de oxígeno molecular en las reacciones de un electrón. (Cuvelier et al, 1996; Rice-Evans, 2004). Los radicales libres son capaces de oxidar las proteínas celulares, ácidos nucleicos y lípidos. Ellos contribuyen al envejecimiento de las proteínas celulares, mutagénesis, carcinogénesis y al desarrollo de enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer. También aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares, probablemente mediante la desestabilización de las membranas celulares y por oxidación de las lipoproteínas LDL. Los polifenoles son antioxidantes exógenos naturales. Ingeridos con los alimentos, pueden ser absorbidos incambiados, o metabolizarse por reacciones de hidroxilación, metilación, sulfatación o glucuronidación. Por ello, la biodisponibilidad de los polifenoles depende del tipo de alimento ingerido. La unión a proteínas plasmáticas disminuye su absorción, mientras que su ingesta con alcohol las aumenta. Una gran mayoría de los polifenoles consumidos pueden ser degradados por la microflora bacteriana intestinal, adquiriendo gran relevancia los ensayos in vivo que puedan aportar información sobre su participación y mecanismos de acción que expliquen los reales beneficios del consumo humano.

2. Propóleos y el estudio de su composición química.

Con el desarrollo de técnicas analíticas de separación y purificación tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de gases (GC), así como las técnicas de identificación como espectroscopía de masas (MS), resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC-MS), y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se han identificado por primera vez una serie de nuevos compuestos en propóleos; incluyendo flavonoides, terpenos, compuestos fenólicos y sus ésteres, azúcares, hidrocarburos y elementos minerales. En contraste, no se han reportado fitoquímicos relativamente comunes, tales como alcaloides. Entre 2000 y 2012 doscientos cuarenta y un (241) compuestos se han reportado por primera vez desde el propóleos. (Huang et al, 2014).

Las investigaciones en propóleos en los últimos 30 años se han centrado en los compuestos polifenólicos del tipo flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, acetofenonas, lignanos y terpenos como principales responsables de su bioactividad. (Medic-Sarich M. et al, 2009; Bankova et al, 1999; Valcic et al., 1998). Para la cuantificación de estos compuestos la técnica de Cromatografía líquida HPLC ha ganado terreno, desplazando a la técnica de GC-MS, principalmente por la dificultad que representa la derivatización de los componentes del propóleos. Los sistemas de detección más utilizados han sido los detectores UV, de arreglo de diodos y de espectrometría de masas. (Gómez-Caravaca et al, 2006). También se han utilizado métodos colorimétricos, (Chang et al., 2002) técnicas espectroscópicas (Popova et al., 2004) electroforesis capilar en zona CZE y micelar MECK (Hilhorst et al., 1998) y espectroscopia infrarroja (Nie P. et al, 2013; Xu L. et al, 2013), encontrándose

en la actualidad un abanico de herramientas analíticas que permiten caracterizar de buena forma las muestras de propóleos.

A. Determinación de compuestos por Cromatografía Líquida.

El análisis de propóleos por Cromatografía líquida HPLC representa en la actualidad la técnica analítica más utilizada para la caracterización de polifenoles (Tabla 3). Las condiciones cromatográficas de los métodos HPLC incluyen comúnmente una columna C18 de fase reversa, detector UV-Vis o de arreglo de diodos (DAD) y un sistema binario de disolventes que contiene agua acidificada (solvente A) y un disolvente orgánico polar (disolvente B). Así, la HPLC en fase reversa, acoplada con diferentes sistemas de detección “en-línea”, tales como detector de arreglo de diodos (DAD) o espectrometría de masas (MS) se ha convertido en la técnica de análisis más utilizada para la separación y determinación de polifenoles. La introducción de las columnas de fase inversa han mejorado considerablemente la separación de compuestos fenólicos por HPLC, sin embargo, debido a las desventajas en el límite de detección y la sensibilidad, los métodos HPLC presentan ciertos reparos, especialmente para extractos vegetales de matriz compleja y muestras ambientales. Por lo tanto, la pre concentración inicial y purificación de los polifenoles de matriz compleja es crucial antes del análisis instrumental por HPLC. El objetivo de la pre-concentración es simplificar los cromatogramas obtenidos para que puedan ser utilizados en la identificación y cuantificación de manera fiable. La etapa de purificación es la parte crítica del método; la eliminación de componentes que potencialmente pudieran interferir varía de acuerdo a la matriz que será analizada. El procedimiento puede incluir fraccionamiento líquido-líquido con un solvente inmiscible, cromatografía en columna abierta con Sephadex LH-20, poliamida, Amberlita, o bien la extracción

en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos disponibles comercialmente. La Tabla 3 resume la información proporcionada en algunos manuscritos representativos y nos entrega las condiciones cromatográficas ensayadas por algunos investigadores en la determinación de compuestos polifenólicos en propóleos.

Tabla 3: Condiciones HPLC para determinación de compuestos fenólicos en propóleos.

Columna	Fase móvil	Elución	Detección	Compuestos identificados	Observación
Intersil 5 ODS-2 columna (25cm x 0,46 cm i.d.) con una columna guard cromosfero ODS (1cm x 0,3 cm i.d.)	A: agua: ácido acético (95:5, v/v); B: metanol	Gradiente	UV $\lambda = 290$ nm	Flavonas, flavonoles, flavanones y dihidroflavonoles y fenólicos totales (ácido cafeico, p-ácido cumárico, ácido ferúlico, kaemferol, pinocembrin, fenetil cafeato, cafeato isopentil, crysin, galangin, pinostrobin, benzyl cafeato	Constituyentes activos de propoleo tipo poplar; verificación de los resultados espectrofotómetros cuantitativos.
YMC Pack ODS-A (RP)	Ácido acético: metanol: agua (5:75:60, v/v/v)	Isocratico	DAD $\lambda = 254$ nm	Quercetina, Kaemferol, apigenina, isomranmetin, ramnetin, pinocembrin, ácido cafeico dimetilalil, pinobanksin, kaemferol, apigenina, isosakuranetin, pinocembrin, ácido cafeico dimetilalil, pinobanksin 3-acetato, crysin, galangina, kaemferide, techtocrisin	Origen botánico y composición de propoleo brasileño; análisis TLC, GC también.
Columna ODS (25 cm x 0,4 cm i.d., 5 μ m)	A: H ₂ O:0,1% H ₃ PO ₄ ; B: CH ₃ CN:0,1% H ₃ PO ₄	Gradiente	UV $\lambda = 254$ nm	Evidencia de presencia de compuestos fenólicos por la intensa fluorescencia	Actividad antibacteriana de propoleo brasileño, análisis TLC también
Superspher 100 RP-18 (12.5 cm x 0,4 cm, 4 μ m)	A: Metanol: ácido acético, 1M (50:50); B: Metanol: ácido acético, 1 M (40:60); C: acetonitrilo	Gradiente	UV $\lambda = 254$ nm	Pinocembrin, galangina	Actividad contra Streptococcus pyogenes de propoleo italiano
YMC Pack ODS-A (RP)	Ácido acético: metanol: agua (5:75:60, v/v/v)	Isocratico	DAD $\lambda = 254$ nm	Isosakuranetin, sakuranetin, quercetina, kaemferol, pinocembrin, kaemferide acacetin, isorhamnetin	Evaluación de las preparaciones para ver quien tiene máxima absorción
Chromsep RP-18 (25 cm x 0,46 cm i.d., 5 μ m)	A: Metanol; B: agua: acetonitrilo (97.5:2.5, v/v)	Gradiente	UV $\lambda = 254$ nm	Crisin y otros	Establecer condiciones ideales para análisis

(Extraído de Gómez-Caravaca et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; (41):1220-1234).

En la actualidad el análisis de propóleos por LC-MS es una técnica que permite identificar una buena cantidad de componentes del propóleos y conocer la forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunos casos se

encuentran asociados a azúcares formando glucósidos, en otras ocasiones pueden formar esterés a partir de ácidos fenólicos. Pellati y colaboradores identificaron 40 compuestos de propóleos en un sistema HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS/MS donde además compararon los analizadores de masa de triple cuadrupolo con trampa de iones, observando resultados de mayor sensibilidad en los iones de flavonoides determinados en el analizador de triple cuadrupolo. Obtuvieron buenos parámetros de validación concluyendo que el método desarrollado es adecuado para el análisis de extractos de propóleos (Pellati et al, 2011).

Falcão y colaboradores configuraron un sistema de cromatografía líquida con detección por arreglo de diodos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-DAD-ESI-MSN). Analizaron 40 extractos etanólicos de propóleos de diferentes lugares de Portugal obteniendo como resultado la detección de 76 polifenoles en las muestras, algunos de ellos metilados, esterificados o a la forma de glucósidos. La conclusión del estudio fue la determinación de un perfil común para la mayoría de los propóleos portugueses y la posibilidad de utilizar algunos compuestos fenólicos, como kaempherol-dimetil-éter, como marcadores geográficos de una localidad en particular (Falcão et al, 2013).

B. Determinación de compuestos por Cromatografía Gaseosa

La determinación de los componentes de propóleos por cromatografía gaseosa (GC) permite realizar un análisis tanto cualitativo como cuantitativo. Sin embargo, la preparación de la muestra es compleja debido a la necesidad de eliminar lípidos del extracto, la liberación de compuestos fenólicos desde enlaces tipo éster y glucosídicos y la derivatización de polifenoles de baja volatilidad afecta desafortunadamente la reproducibilidad de los resultados. GC

acoplada con espectrometría de masas (GC-MS) es el método más utilizado, ya que la detección por MS permite la adquisición de datos de masa molecular e información estructural que facilita la identificación de los compuestos. No obstante, el propóleos contiene componentes que no son lo suficientemente volátiles para el análisis directo ni incluso derivatizados o llevados a alta temperatura (HT-GC-MS). (Sawaya A. et al, 2004). Aun así, GC es una técnica que tiene una gran capacidad de separación y ofrece alta sensibilidad y selectividad cuando es combinada con espectrometría de masas. Así lo demuestra la publicación de Pellati y colaboradores donde utiliza esta metodología acoplada con headspace y microextracción en fase sólida (HS-SPME-GC/MS) para el análisis de los compuestos volátiles de diferentes muestras, logrando identificar 99 compuestos presentes en propóleos procedentes de Italia (Pellati et al, 2013). La Tabla 4 nos muestra algunas condiciones cromatográficas ensayadas para el análisis de propóleos tales como rango de temperatura, tipo de columnas, tiempo de análisis y compuestos determinados. No existen reportes de análisis de muestras de propóleos por GC-FID en la literatura consultada.

Tabla 4: Condiciones GC para determinación de compuestos fenólicos en propóleos.

Rango Temperatura (°C)	Columna	Tiempo de análisis (min)	Detección	Derivatización	Compuestos identificados	Observaciones
100-310	Columna capilar HP5-MS (23 m x 0,25 mm i.d.), 0,5 mm film thickness	42	MS	Piridina + BSTFA	Pinocembrin, pinobanksin, pinobanksin O-acetato, chrysin, galangin, pentenyl caffeates, benzyl caffeates, phenethyl caffeate	Composición de propoleo Europeo
100-310	Columna capilar HP5-MS (23 m x 0,25 mm i.d.), 0,5 mm film thickness	42	MS	Piridina + BSTFA	Ácido cinámico, bencil cinamato, cinamil cinamato, pinocembrin, pinobaksin, pinobanksin 3 acetato, chrysin, galangin feniletil cafeato, cinamil cafeato, vanilina, p-ácido cumárico, ácido ferulico, ácido cafeico, ácido dehidroabietico	Composición y actividad antibacteriana de propoleo Turco y análisis TLC también.
50-285	Columna CBP5 (30 m x 0,25 mm i.d.)	55	MS	Metilación	ácido coumárico, ferulico, pinobanksin, kaempferol, apigenina, isosakuranetin, pinocembrin, dimetilalil ácido cafeico, pinobanksin 3-acetato, chrysin, galangina, kaempferide, tectocrysin	Propóleos y resinas de plantas HPLC y análisis TLC también.
40-390	Columna glass (22 m x 0,2 mm i.d.) coated con PS-086 a	54	FID MS	Trimetilsililación: bis(trimetilsilil)-trifluoro acetamida (BSTFA)	Inositol, p-ácido cinámico, ácido ferulico, ácido isoferulico, ácido cafeico	Flavonoides en acetona no derivatizado, derivatización de extracto de metanol.
40-380b	Capilar sílica fused (10 m x 0,3 mm i.d.) coated con 0,1 um film of Silaren-30c	55	FID MS	No	Ácido hydroxinámico, vanilina, ácido cinámico, benzyl cinamato, naringina, 3', 4'-dimetoxi, betuleol, kaempferid	Hexano y extractos crudos de acetona

a = 15% fenil, 85% metil polisiloxano
b = Programa A
c = Difetilpolisiloxano, 40% sildifenileno eter, 30% dimetil polisiloxano

(Extraído de Gómez-Caravaca et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006; (41):1220-1234).

C. Determinación de compuestos por Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIR)

La espectroscopia molecular estudia la interacción entre la radiación electromagnética y las moléculas de un compuesto. Las interacciones producidas entre las moléculas son de diferente naturaleza, dependiendo de la energía de radiación utilizada, la que está directamente relacionada con la longitud y número de onda del haz incidente. El resultado de esta interacción podría ser excitación de electrones, vibraciones o rotaciones moleculares. La espectroscopia infrarroja es una técnica analítica que mide la longitud de onda e intensidad de absorción de la luz infrarroja en una muestra. En ella se descarta la excitación de electrones como una forma de interacción con la luz, siendo posible sólo que la absorción molecular genere cambios en el estado de

energía vibracional y/o rotacional. Los modos de vibración producidos se pueden explicar como consecuencia de transiciones entre niveles de energía, donde el número cuántico vibracional (v) cambia en una unidad ($\Delta v \pm 1$) denominada banda fundamental, o en más de una unidad ($\Delta v \pm 2; \pm 3, \dots$) que se denominan sobretonos.

El primer paso para el desarrollo de un método por espectroscopia NIR es la medición de un espectro de la muestra usando un espectrómetro NIR. El resultado de esta medición instrumental es un espectro único con características ópticas y químicas determinadas por la muestra medida. La muestra participa como un elemento óptico en el espectrómetro. Por ello el espectro resultante contiene información específica de los aspectos de vibración molecular de la muestra, sus propiedades físicas, y su interacción única con el instrumento. De esta manera, los abstractos datos de absorción obtenidos en el espectro NIR se convierten en información estructural que representa detalles moleculares de la muestra que se mide. Cada grupo funcional de una molécula tiene una frecuencia vibratoria única que se puede utilizar para determinar qué grupos funcionales están presentes en una muestra. Cuando los efectos de todos los diferentes grupos funcionales están en conjunto, el resultado es una única “huella digital molecular” que se puede utilizar para caracterizar la identidad de una muestra.

La espectroscopia NIR utiliza el rango espectral entre 780 a 2500 nm (12500 - 4000 cm^{-1}) y proporciona información estructural mucho más compleja, relacionada con el comportamiento de vibración de combinaciones de enlace. El nivel de energía en una molécula se describe como la suma de los movimientos atómicos y moleculares originados de energía traslacional, rotacional, vibracional y electrónica. La energía traslacional no tiene efecto en el espectro molecular a diferencia de los otros movimientos que si lo hacen. La energía rotacional es proporcional a la velocidad de rotación angular de cada

molécula. Como objeto principal de estudio nos enfocaremos en la energía vibracional. Las vibraciones armónicas siguen una descripción funcional de tal manera que el tipo de vibración determina la frecuencia a la que se absorbe la energía NIR. La amplitud de la absorción en cualquier longitud de onda o número de onda particular es determinada por su absorptividad y el número de moléculas dentro de la trayectoria del haz del instrumento de medida. Un cambio en la respuesta espectral se relaciona con la concentración, en los términos de la ley de Lambert-Beer. Ella nos indica que la absorbancia de un analito (A) medida en un espectrofotómetro es equivalente al producto de la absorptividad (ϵ) de un tipo específico de absorción molecular; la concentración (c) de las moléculas que atraviesa el haz de medida y la longitud de trayectoria (l) del soporte de la muestra dentro del haz de medición. Esta relación entre la señal espectral medida y la concentración de una molécula es expresada como:

$$A = \epsilon c l$$

Donde ϵ es la absorptividad molar, en unidades de litro * mol⁻¹ * cm⁻¹; c es la concentración de moléculas en el haz del espectrómetro en unidades de mol * litro⁻¹ y l es el espesor o longitud de la trayectoria, en unidades de cm, de la muestra medida a una concentración específica.

Dependiendo del tipo de enlace, hay varios tipos de vibraciones moleculares que absorben a longitudes de onda únicas o frecuencias de energía de infrarrojo cercano. Cada una de estos tipos de vibraciones tiene una frecuencia única, donde se produce la absorción. Estos enlaces están sujetos a cambios de energía de vibración cuando se irradian por frecuencias NIR, y existen dos patrones de vibración en estos enlaces: la vibración de “estiramiento o elongación” (del inglés stretching) que incluye cambios simétricos o asimétricos en la distancia de enlace, y la vibración “angular o de doblamiento” (del inglés bending) que incluye cambios simétricos o asimétricos en el ángulo de enlace que pueden ser dentro y fuera del plano. Todas las

moléculas tienen elementos de simetría en sus estructuras. Estas estructuras sólo permiten ciertos movimientos posibles en torno a cualquier plano particular o eje de rotación.

Algunos aspectos prácticos a considerar en las mediciones espectrales tienen relación con la variedad de métodos de presentación de muestra disponibles para el análisis. Algunos espectrómetros NIR son capaces de medir transmitancia (directa y difusa), reflectancia (especular y difusa), etc. La selección del paso de luz óptimo para mediciones en el infrarrojo cercano son: para el infrarrojo cercano de onda corta (12500 a 9091 cm^{-1} o 800 a 1100 nm) se usan regularmente caminos ópticos que van de $5 - 10$ cm. Para el infrarrojo cercano de onda larga (9091 a 4000 cm^{-1} o 1100 a 2500 nm) comúnmente el paso óptico para hidrocarburos va entre 0.1 a 2 cm. Por otro lado, las geometrías de presentación de muestra utilizadas en las mediciones de infrarrojo cercano pueden ser la forma de líquido o suspensión que utilizan principalmente transmitancia y transmitancia difusa. Las formas sólidas, pequeñas partículas, telas y gránulos son más afines al uso de métodos de reflectancia o transmitancia difusa. Con el fin de optimizar las mediciones de espectroscopia habrá que considerar que las muestras exhiben diferentes características ópticas que deben ser optimizadas, por ejemplo, diluirlas si fueran ampliamente coloreadas.

Como ya se dijo, la energía infrarroja es la energía electromagnética de la vibración molecular. La zona del infrarrojo cercano tiene la característica de presentar sobretonos y bandas de combinación de vibraciones moleculares fundamentales, especialmente de estiramiento (stretching) y de doblamiento (bending). En la interpretación de la espectroscopía de infrarrojo cercano debemos considerar que la energía absorbida por una matriz que consiste en compuestos orgánicos depende de la composición química de la matriz, definido por el tipo de moléculas presentes, la concentración de estas especies

individuales y las interacciones entre las moléculas de la matriz. Para que el espectro NIR sea válido, debemos estar absolutamente seguros de que diferentes tipos de moléculas absorben a frecuencias únicas. Debido a la naturaleza de las anchas bandas del espectro NIR que consisten en la superposición de bandas de combinación y sobretonos, las especies individuales no son bien resueltas como en la zona del infrarrojo medio. Adicionalmente, muchos compuestos absorben energía NIR a través de toda la región de longitud de onda, lo que hace difícil, si no imposible, resolver claramente una línea de base utilizando sencillos métodos cuantitativos de pico-altoza o pico-área. Esto nos lleva a la misma conclusión de los primeros investigadores: la región NIR no es especialmente útil, por si misma, como una técnica de medición cuantitativa. Por ello, se requieren nuevas técnicas de manipulación espectral para interpretar las mal resueltas bandas de un espectro NIR y compensar las interferencias de fondo. Aun así, es posible identificar bandas de absorción características para diferentes grupos funcionales de compuestos orgánicos. La tabla 5 muestra las diferentes longitudes de onda que pueden estar asociadas al grupo funcional C-H aromático. De ella observamos que, como ejemplo, el enlace de carbono aromático podemos encontrarlo desde una longitud de onda de 714 nm hasta 2768 nm, ya sea como un hidrocarbano (714, 876, 1142, 1680, 1446, 1417, 1685 nm) o asociado a un grupo arilo (1671, 1689, 2148, 2154, 2167, 2188, 2206, 2294, 2352, 2387, 2407, 2440, 2444, 2469, 2513, 2525, 2540, 2679, 2687, 2708, 2747 y nm).

Tabla 5: Algunas longitudes de onda (nm) asociadas al grupo funcional aromático en espectroscopia NIR.

Grupo funcional	Nanometros	Espectro-Estructura	Tipo de material
C-H aromático (ArCH)	714	C-H (5v), aromático	Hidrocarbóno aromático
C-H aromático (ArCH)	876	C-H (4v), aromático	Hidrocarbóno aromático
C-H aromático (ArCH)	1142	C-H (3v), aromático	Hidrocarbóno aromático
C-H aromático (ArCH)	1680	C-H (2v), aromático	Hidrocarbóno aromático
C-H aromático (ArC-H)	1446	C-H combinación ArC-H	Hidrocarbóno aromático
C-H aromático (C-H)	1417	C-H combinación ArC-H	Hidrocarbóno aromático
C-H aromático (C-H)	1685	C-H (2v), ArC-H	Hidrocarbóno aromático
C-H aromático (C-H) Arilo	1671	CHv + CHv (12 + 1) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	1689	CHv + CHv (15 + 5) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2148	CHv + CCv (15 + 9) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2154	CHv + CCv (12 + 16) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2167	CCv + CHv (16 + 5) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2188	CCv + CHv (13 + 1) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2206	CCv + CHv (13 + 15) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2294	CHv + CHδ (12 + 3) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2352	CHv + CHδ (12 + 17) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2387	CCδ + CHv (17 + 5) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2407	CHv + CHδ (15 + 10) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2440	CCδ + CHv (14 + 1) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2444	CHv + CCv (12 + 2) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2469	CCδ + CHv (14 + 15) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2513	CHv + CHδ (15 + 6) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2525	CCω + CHv (19 + 15) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2540	CCω + CHv (11 + 12) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2679	CCω + CHv (4 + 1) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2687	CCω + CHv (7 + 5) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2708	CCω + CHv (8 + 5) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2747	CHv + CCδ (12 + 18) banda asignada a benceno.	C-H arilo
C-H aromático (C-H) Arilo	2768	CCω + CHv (18 + 5) banda asignada a benceno.	C-H arilo

La espectroscopia NIR es un método rápido, fácil de realizar y no destructivo, que puede registrar espectros de muestras sólidas y líquidas sin ningún tratamiento previo. Una de sus principales ventajas es que implica un bajo costo de operación y proporciona espectros rápidamente, siendo capaz de predecir parámetros físicos y químicos a partir de un sólo espectro. La información analítica contenida en las típicamente grandes y ampliamente superpuestas bandas de espectros NIR es poco selectiva y está influenciada por una serie de características físicas, químicas y estructurales. Además, las diferencias entre las muestras pueden causar diferencias espectrales muy leves que son difíciles de distinguir a simple vista (Blanco y Villarroya, 2002). Como los instrumentos NIR disponibles actualmente proporcionan rápidamente

grandes cantidades de datos que requieren de un procesamiento rápido y eficiente, la espectroscopia NIR requiere complementarse con quimiometría para extraer tanta información relevante como sea posible a partir de los datos analíticos. Ambas técnicas están estrechamente relacionados, y pueden ser útiles para detectar adulterantes (Cozzolino y Corbella, 2003) o rastrear el origen de las materias primas (Cheng et al., 2013). En síntesis, tanto los métodos cualitativos y cuantitativos de espectroscopia NIR requieren la aplicación de algoritmos de calibración multivariada, comúnmente referidos a métodos quimiométricos, para modelar la respuesta espectral y realizar una calibración relacionada a métodos de referencia.

Para el modelo de estudio presentado en esta tesis resultan interesantes los trabajos publicados por Désiré Luc Massart quien publica entre 2003 y 2007 algunos estudios mostrando diferentes aplicaciones de la espectroscopia NIR en la investigación de productos naturales. Junto a Luypaert J. estudia la posibilidad de utilizar espectroscopia de infrarrojo cercano combinado con un método de cuadrados mínimos parciales (Partial Least Squares PLS) como un forma rápida para estimar la calidad del té verde (Luypaert J. et al, 2003; Zhang M. H. et al, 2004). En 2005 van Nederkassel, y Massart publican un estudio donde utilizan datos cromatograficos para predecir la actividad antioxidante de muestras de té verde (van Nederkassel A. et al, 2005). Luego, Massart junto a Capron X. y colaboradores publican dos estudios donde utilizan la calibración multivariada de 63 marcadores de calidad de un vino para determinar su origen geográfico (Capron X. et al, 2007 a) y concluyen que usando todo el conjunto de 63 parámetros con los modelos de mínimos cuadrados parciales discriminantes (PLS-DA) es posible lograr discriminación perfecta casi todo el tiempo, siendo capaces de comprobar experimentalmente la autenticidad de una muestra de vino “desconocido” (Capron et al, 2007 b). Otro investigador que ha explorado diferentes aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo cercano es Quan-Sheng Chen. La línea de investigación desarrollada por él y

sus colaboradores han permitido el desarrollo de la espectroscopía NIR y el uso de la quimiometría como herramienta predictiva y de clasificación. En 2006 este grupo investiga la determinación simultánea de polifenoles totales y cafeína concluyendo que muchos componentes presentes en el té verde pueden ser analizados rápida y simultáneamente por espectroscopia NIR en conjunto con los métodos quimiométricos apropiados, en tiempo real, en el sitio de medición, mejorando significativamente la eficiencia del aseguramiento y control de calidad en la producción de té verde (Chen Q. et al 2006a; Chen Q. et al 2006b). Luego investigan la factibilidad de este modelo utilizando diferentes algoritmos (Chen Q. et al, 2008a) y lo utilizan para la determinación de catequinas en té verde (Chen Q. et al, 2008b), obteniendo resultados satisfactorios para una de las dos catequinas estudiadas. Al año siguiente logran determinar adecuadamente cuatro catequinas (epigalocatequina, epicatequina, epigalocatequingalato y epicatequingalato) presentes en té verde, gracias a la selección adecuada del tipo de pre-procesamiento de datos que más se ajusta al modelo predictivo (Chen Q. et al, 2009). Desde ese año, este investigador ha participado como autor o co-autor en 83 publicaciones (www.scopus.com), utilizando la espectroscopia NIR como herramienta en modelos predictivos y explorando otros métodos quimiométricos tanto cualitativos como cuantitativos.

En cuanto a investigación de propóleos se refiere, Xu y colaboradores exploraron el uso de espectroscopía NIR y quimiometría para el análisis rápido de adulteraciones en propóleos chinos. Estos artificios por lo general implican adición de ciertos componentes activos conocidos, los que fueron detectados con buena precisión mediante el desarrollo de modelos de clase de propóleos puro (Xu et al, 2013). Nie y colaboradores desarrollaron un nuevo método para la determinación rápida de crisina y galangina en propóleos chinos, mediante espectroscopia visible e infrarrojo cercano (Vis-NIR), usando como método de referencia HPLC con detección de longitud de onda variable. Sus resultados

mostraron alta precisión para la detección de crisina y galangina por HPLC, sin embargo, este método resulta ser costoso complejo y consume mucho tiempo. Una determinación rápida, no destructiva y eficiente de crisina y galangina se logró mediante espectroscopía Vis-NIR, aunque proponen que la precisión sería necesario mejorarla aún más (Nie et al, 2013).

Con todo lo anterior, podemos afirmar que el desarrollo de la espectroscopia NIR ha ido de la mano con la simplificación y miniaturización de los métodos de análisis, dando respuesta a la necesidad de tomar decisiones analíticas en terreno, donde frecuentemente se debe ser capaz de discriminar objetivamente la calidad de una materia prima, de un proceso o de un producto terminado. Este avance no sería posible sin una herramienta que sea capaz de extraer la mayor parte de la información analítica detectada, permitiendo caracterizar tanto la identidad como la cantidad de los componentes presentes en la muestra. Las posibilidades de aplicación de esta metodología la convierten en una de las alternativas de análisis que se deben evaluar para avanzar en la solución de la problemática de la estandarización del propóleo.

D. Determinación de compuestos por Espectroscopia UV-Vis

El contenido de compuestos fenólicos se puede determinar por varios métodos de separación, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Kumazawa et al, 2004), cromatografía de gases (GC) (Bankova V. et al, 2014), electroforesis capilar de zona (CZE) (Hilhorst, M. et al, 1998), etc. Estos métodos de separación permiten identificar y cuantificar los polifenoles como un conjunto de sustancias individuales, de forma muy precisa y exacta, pero no está exento de dificultades al momento de identificar todos los compuestos fenólicos en un material específico, muchas veces retrasando los tiempos de análisis y provocando altos costos pocas veces aceptables (Stratil et

al, 2006). Además, generalmente es necesario analizar un alto número de muestras, debido a que el contenido individual de polifenoles es muy variable y está influenciado por un gran número de factores externos, tales como procesos agrotécnicos, condiciones climáticas, fenología del lugar, etapas de maduración, entre otros.

En la actualidad, se puede obtener información suficiente para la evaluación rápida o de “screening” del contenido de polifenoles totales, flavonoides totales (Yang et al, 2011) catequinas totales (He et al, 2009), cumarinas totales (Fernández Izquierdo et al, 2000), etc. y utilizarlo como criterio de valor nutricional de los productos alimenticios derivados de plantas. Estos análisis orientativos se pueden realizar fácilmente a partir de mediciones espectrofotométricas, empleando reactivos analíticos específicos que posean una selectividad adecuada para evitar la obtención de valores falsos positivos que afecten la calidad de la estimación.

El ensayo de Folin-Denis es el procedimiento más antiguo y más utilizado para la cuantificación de fenoles totales en materiales vegetales. Se produce la reducción de ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico (reactivo de Folin-Denis) a un complejo de color azul en una solución alcalina en presencia de compuestos fenólicos (Folin & Denis, 1912). Más tarde, este reactivo fue mejorado por Folin y Ciocalteu con la adición al reactivo de sulfato de litio, para evitar la precipitación en la reacción y aumentar la sensibilidad (Folin & Ciocalteu, 1927). El ensayo de Folin-Ciocalteu adquiere mayor importancia a partir de 1965, con el estudio comparativo realizado por Singleton & Rossi, quienes buscaban mejorar los erráticos resultados que se obtenían al utilizar el ensayo de Folin-Denis. Las condiciones optimizadas involucran utilizar Na_2CO_3 para ajustar el pH, estandarizar el tiempo de reposo en la oscuridad previo a la lectura, controlar la temperatura durante el análisis, modificar la longitud de onda de lectura (765 nm) y utilizar ácido gálico como estándar de referencia,

obteniendo así un método más exacto y preciso que sus predecesores, que hasta hoy es el referente para medir el contenido de polifenoles totales en productos naturales (Singleton & Rossi, 1965). Actualmente, el reactivo de Folin-Ciocalteu está disponible comercialmente para la cuantificación de polifenoles totales, sin embargo, tanto el reactivo de Folin-Denis como el de Folin-Ciocalteu no son específicos y detectan todos los grupos fenólicos que se encuentran en los extractos, incluidos los de las proteínas extraíbles o el ácido ascórbico, existiendo la posibilidad de sobreestimar su resultado debido a la superposición de las respuestas espectrales (Naczk & Shahidi, 2004).

La detección de flavonoides totales se puede realizar a través de un espectrofotómetro UV-Vis, ya que todas las agliconas de flavonoides contienen al menos dos anillos aromáticos y, por consiguiente, absorben eficientemente la luz UV. El primer máximo se debe al anillo A, y se encuentra en el rango de 240-285 nm (banda I) y el segundo máximo, se debe al anillo C (Figura 2) y se encuentra en el rango de 300-560 nm (banda II) (Corradini et al, 2011) . La complejación de los fenoles con Al (III) se ha utilizado para el desarrollo de métodos espectrofotométricos que permitan la determinación de flavonoides y taninos totales, realizando la lectura a 435 nm (Naczk & Shahidi, 2004).

Los avances de la “química verde” y la necesidad de realizar simultáneamente un alto número de muestras han llevado al desarrollo de innovaciones de los métodos clásicos, disminuyendo drásticamente los residuos contaminantes del laboratorio y haciendo más eficiente la gestión de los recursos. De esta manera, se han ajustado los volúmenes de reactivos para este nuevo formato, lo que permite el análisis de un alto número de muestras simultáneamente en una microplaca de 96 platillos (Zhang Q. et al, 2006). Es así como en los últimos años se han desarrollado muchos métodos modificados para volúmenes pequeños, resultando ser tan eficientes como los resultados obtenidos por los métodos clásicos (Herald et al, 2012).

El análisis de polifenoles y flavonoides totales en propóleos se ha utilizado recurrentemente (Chang et al, 2002; Popova et al, 2004; Yang et al, 2011) como se observa en la tabla 6. El análisis de estos resultados sugiere el estudio de la existencia de alguna relación de estos indicadores, que sea útil para estandarizar una muestra, ya sea por si sola o asociada a otro marcador de calidad.

Tabla 6: Concentración de Polifenoles y Flavonoides totales en otras muestras de Propóleos.

Cita Bibliografica	N° Muestras	Origin	Total polyphenols range	Total Flavonoids range
Kumazawa et al, 2003	16	Diferents places	31.2 ± 0.7 - 299 ± 0.5 (mg EAG/g of Propolis)	2.5 ± 0.8 - 176 ± 1.7 (mg EQ/g of Propolis)
Choi et al, 2005	5	Brazil-Korea	120.0 ± 3.5 - 212.7 ± 7.4 (mg EAG/g of extract)	48.2 ± 2.1 - 77.9 ± 1.7 (mg EQ/g of extract)
Ahn et al, 2006	20	China	42.9 ± 0.8 - 302 ± 4.3 (mg/g of EEP)	8.3 ± 3.7 - 188 ± 6.6 (mg/g of EEP)
Chaillou and Nazareno, 2009	30	Argentina	42-253 (mg EAG/g Propolis)	2-28 (mg EQ/g Propolis)
Ferreira et al, 2014	4	Brazil	211 ± 7.5 (mg GAE/100 g propolis)	23 ± 1.0 (mg EQ/100 g propolis)
Valenzuela et al, 2015	8	Chile	14.6 ± 0.4 -36.4 ± 0.6 (%w/w)	2.1 ± 0.2 -14.8 ± 0.4 (%w/w)

EAG : Equivalentes de ácido gálico
EQ : Equivalentes de quercetina

REFERENCIAS

- AGA, H., SHIBUYA, T., SUGIMOTO, T., KURIMOTO, M. & NAKAJIMA, S. (1994) Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 945-946.
- AKAGAWA, M., SHIGEMITSU, T. & SUYAMA, K. (2003) Production of Hydrogen Peroxide by Polyphenols and Polyphenol-rich Beverages under Quasi-physiological Conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 2632-2640.

- ANDERSON, R. F., HILLE, R. & PATEL, K. B. (1995) Inactivation of Xanthine Oxidase by Oxidative Radical Attack. *International Journal of Radiation Biology*, 68, 535-541.
- AOSHIMA, H., OKITA, Y., HOSSAIN, S. J., FUKUE, K., MITO, M., ORIHARA, Y., YOKOYAMA, T., YAMADA, M., KUMAGAI, A., NAGAOKA, Y., UESATO, S. & HARA, Y. (2005) Effect of 3-O-Octanoyl-(+)-catechin on the Responses of GABAA Receptors and Na⁺/Glucose Cotransporters Expressed in *Xenopus* Oocytes and on the Oocyte Membrane Potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1955-1959.
- ARAKAWA, H., KANEMITSU, M., TAJIMA, N. & MAEDA, M. (2002) Chemiluminescence assay for catechin based on generation of hydrogen peroxide in basic solution. *Analytica Chimica Acta*, 472, 75-82.
- ARAKAWA, H., MAEDA, M., OKUBO, S. & SHIMAMURA, T. (2004) Role of Hydrogen Peroxide in Bactericidal Action of Catechin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 277-281.
- BANKOVA, V. (A) (2005) Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 114-117.
- BANKOVA, V. (B) (2005) Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 29-32.
- BANKOVA, V., BOUDOUROVA-KRASTEVA, G., POPOV, S., SFORCIN, J. M. & CUNHA FUNARI, S. R. (1998) Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, 29, 361-367.
- BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S., MARCUCCI, M. C., TSVETKOVA, I. & KUJUMGIEV, A. (1999) Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, 70, 190-193.
- BANKOVA, V.; M. POPOVA; TRUSHEVA, B (2014) Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal* 8:28

- BLANCO, M. & VILLARROYA, I. (2002) NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21, 240-250.
- BURDOCK, G. A. (1998) Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347-363.
- CAPRON, X., MASSART, D. S. L. & SMEYERS-VERBEKE, J. (2007) Multivariate authentication of the geographical origin of wines: a kernel SVM approach. *European Food Research and Technology*, 225, 559-568.
- CAPRON, X., SMEYERS-VERBEKE, J. & MASSART, D. L. (2007) Multivariate determination of the geographical origin of wines from four different countries. *Food Chemistry*, 101, 1585-1597.
- CASTRO, C., MURA, F., VALENZUELA, G., FIGUEROA, C., SALINAS, R., ZÚÑIGA, M. C., TORRES, J. L., FUGUET, E. & DELPORTE, C. (2014) Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. *Food Research International*, 64, 873-879.
- CHANG, C.-C., YANG, M.-H., WEN, H.-M. & CHERN, J.-C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10, 178-182.
- CHEN, Q., ZHAO, J., CHAITEP, S. & GUO, Z. (2009) Simultaneous analysis of main catechins contents in green tea (*Camellia* (L.)) by Fourier transform near infrared reflectance (FT-NIR) spectroscopy. *Food Chemistry*, 113, 1272-1277.
- CHEN, Q., ZHAO, J., LIU, M., CAI, J. & LIU, J. (2008a) Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 568-573.

- CHEN, Q., GUO, Z. & ZHAO, J. (2008b) Identification of green tea (*Camellia sinensis* (L.)) quality level according to measurement of main catechins and caffeine contents by HPLC and support vector classification pattern recognition. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 1321-1325.
- CHEN, Q., ZHAO, J., ZHANG, H. & WANG, X. (2006a) Feasibility study on qualitative and quantitative analysis in tea by near infrared spectroscopy with multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, 572, 77-84.
- CHEN, Q., ZHAO, J., HUANG, X., ZHANG, H. & LIU, M. (2006b) Simultaneous determination of total polyphenols and caffeine contents of green tea by near-infrared reflectance spectroscopy. *Microchemical Journal*, 83, 42-47.
- CHENG, H; QIN, Z; GUO, X; HU, X; WU, J (2013) Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*, 51(2): 813-822
- CIURLI, S., BENINI, S., RYPNIEWSKI, W. R., WILSON, K. S., MILETTI, S. & MANGANI, S. (1999) Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. *Coordination Chemistry Reviews*, 190-192, 331-355.
- CORRADINI, E., FOGLIA, P., GIANANTI, P., GUBBIOTTI, R., SAMPERI, R. & LAGANA, A. (2011) Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*, 25, 469-495.
- COZZOLINO, D; CORBELLA, E (2003) Determination of honey quality components by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Apicultural Research*. 42 (1-2): 16 – 20

- CUESTA-RUBIO, O., PICCINELLI, A. L., CAMPO FERNANDEZ, M., MARQUEZ HERNANDEZ, I., ROSADO, A. & RASTRELLI, L. (2007) Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7502-7509.
- CUSHNIE, T. P. T. & LAMB, A. J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- CUVELIER, M.-E., RICHARD, H. & BERSET, C. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 645-652.
- FALCÃO, S. I., VALE, N., GOMES, P., DOMINGUES, M. R. M., 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, 309-318
- FERNÁNDEZ IZQUIERDO, M. E., QUESADA GRANADOS, J., VILLALÓN MIR, M. & LÓPEZ MARTINEZ, M. C. (2000) Comparison of methods for determining coumarins in distilled beverages. *Food Chemistry*, 70, 251-258.
- FOLIN, O. & CIOCALTEU, V. (1927) On Tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627-650.
- FOLIN, O. & DENIS, W. (1912) On Phosphotungstic- Phosphomolybdic compounds as color reagents *Journal of Biological Chemistry*, 12, 239-243.
- GOMEZ-CARAVACA, A. M., GOMEZ-ROMERO, M., ARRAEZ-ROMAN, D., SEGURA-CARRETERO, A. & FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1220-1234.

- HE, Q., YAO, K., JIA, D. Y., FAN, H. J., LIAO, X. P. & SHI, B. (2009) Determination of total catechins in tea extracts by HPLC and spectrophotometry. *Natural Product Research*, 23, 93-100.
- HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R. & BOBILYA, D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- HERALD, T. J., GADGIL, P. & TILLEY, M. (2012) High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2326-2331.
- HILHORST, M. J., SOMSEN, G. W. & DE JONG, G. J. (1998) Potential of capillary electrophoresis for the profiling of propolis. *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography*, 21, 608-612.
- HOLLAS J. M. (1992) *Modern Spectroscopy*, John Wiley & Sons, 2nd ed. Chichester, England, 1992
- HUANG, S., ZHANG, C.-P., WANG, K., LI, G. & HU, F.-L. (2014) Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19, 19610-19632.
- IGNAT, I., VOLF, I. & POPA, V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- KOT, M. A. (2006) Inhibition of jack bean urease by p-benzoquinone: elucidation of the role of thiols and reversibility of the process. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21, 697-701.
- KRAJEWSKA, B. & ZABORSKA, W. A. (2007) Jack bean urease: The effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups. *Bioorganic Chemistry*, 35, 355-365.

- KUJUMGIEV, A; TSVETKOVA, I; SERKEDJIEVA, Y; BANKOVA, V; CHRISTOV, R; POPOV, S (1999) Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64 (3): 235–240.
- KUMAZAWA, S., HAMASAKA, T. & NAKAYAMA, T. (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329-339.
- KUREK-GÓRECKA, A., RZEPECKA-STOJKO, A., GÓRECKI, M., STOJKO, J., SOSADA, M. & ŚWIERCZEK-ZIĘBA, G. (2014) Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. *Molecules*, 19, 78.
- LUYPAERT, J., ZHANG, M. H. & MASSART, D. L. (2003) Feasibility study for the use of near infrared spectroscopy in the qualitative and quantitative analysis of green tea, *Camellia sinensis* (L.). *Analytica Chimica Acta*, 478, 303-312.
- MARCUCCI, M. C. (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- MARKHAM, K; MITCHELL, K; WILKINS, A; DALDY, J; LU, Y (1996) HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42 (1): 205-211
- MASSARO, C. F., KATOULI, M., GRKOVIC, T., VU, H., QUINN, R. J., HEARD, T. A., CARVALHO, C., MANLEY-HARRIS, M., WALLACE, H. M. & BROOKS, P. (2014) Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). *Fitoterapia*, 95, 247-257.
- MEDIĆ-ŠARIĆ, M., RASTIJA, V., BOJIĆ, M., & MALEŠ, Ž. (2009). From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutrition Journal*, 8, 33.

- MIGUEL, M. G., NUNES, S., DANDLEN, S. A., CAVACO, A. M. & ANTUNES, M. D. (2010) Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3418-3423.
- MIRZOEVA, O. K., GRISHANIN, R. N. & CALDER, P. C. (1997) Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152, 239-246.
- MUÑOZ O. ET AL., (2001) Phenolic Compounds of Propolis from Central Chilean Matorral Z. *Naturforsch.* 56c, 273-277
- NACZK, M. & SHAHIDI, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.
- NIE, P. C., XIA, Z. Y., SUN, D. W. & HE, Y. (2013) Application of Visible and Near Infrared Spectroscopy for Rapid Analysis of chrysin and galangin in Chinese Propolis. *Sensors*, 13, 10539-10549.
- PELLATI, F., PRENCIPE, F. P. & BENVENUTI, S. (2013) Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84, 103-111.
- PELLATI, F; ORLANDINI, G; PINNETI, 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.
- POPOVA, M., BANKOVA, V., BUTOVSKA, D., PETKOV, V., NIKOLOVA-DAMYANOVA, B., SABATINI, A. G., MARCAZZAN, G. L. & BOGDANOV, S. (2004) Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, 15, 235-240.

- RIBEIRO CABRAL, I. S., OLDONI, T. L. C., ALENCAR, S. M. D., ROSALEN, P. L. & IKEGAKI, M. (2012) The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 557-564. Ribeiro et al, 2009
- RICE-EVANS, C. (2004) Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 827-828.
- RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J. & PAGANGA, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- RUSSO, A., CARDILE, V., SANCHEZ, F., TRONCOSO, N., VANELLA, A. & GARBARINO, J. A. (2004) Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*, 76, 545-558.
- SAWAYA, A. C. H. F., TOMAZELA, D. M., CUNHA, I. B. S., BANKOVA, V. S., MARCUCCI, M. C., CUSTODIO, A. R. & EBERLIN, M. N. (2004) Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*, 129, 739-744.
- SFORCIN, J. M. C. & BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253-260.
- SILICI, S. & KUTLUCA, S. (2005) Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 69-73.
- SINGLETON, V. L. & ROSSI, J. A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

- STRATIL, P., KLEJDUS, B. & KUBAN, V. (2006) Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 607-616.
- TAKISHIMA, K., SUGA, T. & MAMIYA, G. (1988) The structure of jack bean urease. *European Journal of Biochemistry*, 175, 151-157.
- TEIXEIRA, Ã. R. W., MESSAGE, D., NEGRI, G., SALATINO, A. & STRINGHETA, P. C. S. (2008) Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 7, 307-315.
- VALCIC, S., MONTENEGRO, G. & TIMMERMANN, B. N. (1998) Lignans from Chilean Propolis. *Journal of Natural Products*, 61, 771-775.
- VAN NEDERKASSEL, A. M., VIJVERMAN, V., MASSART, D. L. & VANDER HEYDEN, and Y. (2005) Development of a Ginkgo biloba fingerprint chromatogram with UV and evaporative light scattering detection and optimization of the evaporative light scattering detector operating conditions. *Journal of Chromatography A*, 1085, 230-239.
- XU, L., YAN, S.-M., CAI, C.-B. & YU, X.-P. (2013) Untargeted detection and quantitative analysis of poplar balata (PB) in Chinese propolis by FT-NIR spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*, 141, 4132-4137.
- YAMAMOTO, T., HSU, S., LEWIS, J., WATAHA, J., DICKINSON, D., SINGH, B., BOLLAG, W. B., LOCKWOOD, P., UETA, E., OSAKI, T. & SCHUSTER, G. (2003) Green Tea Polyphenol Causes Differential Oxidative Environments in Tumor versus Normal Epithelial Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307, 230-236.
- YANG, H; DONG, Y; DU, H; SH, I H; PENG, Y; LI, X (2011) Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. *Molecules*, 16: 3444-3455

- ZABORSKA, W. A., KAR CZ, W., KOT, M. A. & JUSZKIEWICZ, A. (2009) Modification of jack bean urease thiols by thiosulphinates contained in garlic extract: DTNB titration studies. *Food Chemistry*, 112, 42-45.
- ZABORSKA, W. A., KRAJEWSKA, B., KOT, M. A. & KAR CZ, W. (2007) Quinone-induced inhibition of urease: Elucidation of its mechanisms by probing thiol groups of the enzyme. *Bioorganic Chemistry*, 35, 233-242.
- ZHANG, M. H., LUYP AERT, J., FERNANDEZ PIERNA, J. A., XU, Q. S. & MASSART, D. L. (2004) Determination of total antioxidant capacity in green tea by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Talanta*, 62, 25-35.
- ZHANG, Q., ZHANG, J. Z., SHEN, J. K., SILVA, A., DENNIS, D. A. & BARROW, C. J. (2006) A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 18, 445-450.



CAPÍTULO 2

Propóleos y estudios de su actividad biológica.

1. Actividad Antibacteriana.

Quizá una de las propiedades del propóleos más estudiadas sea su reconocida actividad sobre microorganismos patógenos. Diversos autores han realizado revisiones sistemáticas respecto de su acción contra bacterias principalmente Gram positivas, más que Gram negativas, actividad antimicótica, antiviral y antiprotozoaria (Marcucci, 1995; Castaldo & Capasso, 2002; Banskota, 2001a). Al respecto, muchos investigadores atribuyen las propiedades antimicrobianas del propóleos a su alto contenido de compuestos fenólicos, no teniendo tan claro aún cuál sería el o los mecanismos de acción bactericida (Cushnie & Lamb, 2005). Las propiedades antibacterianas pueden ser el resultado de la actividad sinérgica de los muchos compuestos presentes en él. Pinocembrina muestra una intensa actividad antibacteriana contra *streptococcus sp.* Apigenina inhibe poderosamente la enzima glicosiltransferasa bacteriana. (Marcucci, 1995) Es particularmente llamativa la eficacia que muestra el propóleos como agente cariostático, demostrando actividad como inhibidor del crecimiento del grupo de bacterias asociadas con el establecimiento inicial de las caries (*streptococcus mutans*, *streptococcus sobrinus*, *laccobacillus spp.* entre otras) e inhibiendo la actividad de la enzima glucosiltransferasa, responsable de la producción de glucanos insolubles que juegan un rol clave en la formación de un biofilm de acumulación de microorganismos cariogénicos (Libério et al, 2009).

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa que se aloja en el estómago humano, y es el mayor factor responsable de úlcera péptica y cáncer gástrico. (Alper, 1993; Dunn et al, 1997; Gisbert & Pajares, 2010). Más del 50 % de la población mundial se encuentra afectado por esta bacteria, y en algunos países en vías de desarrollo su prevalencia alcanza entre el 70 y 90 % de la población (Dunn et al, 1997). Varios autores han descrito la actividad in vitro que tienen propóleos de distintos orígenes sobre *H. pylori*, ya sea utilizado como extracto etanólico (Boyanova et al, 2003; Boyanova et al, 2005; Nostro et al, 2005), como extracto acuoso (Nostro et al, 2005) o como extracto metanólico (Banskota et al, 2001b). También se han realizado pruebas in vitro del uso de un extracto etanólico de propóleos combinado con claritromicina demostrando así un efecto sinérgico con otro antibiótico (Nostro et al, 2006). *H. pylori* es capaz de colonizar y persistir en un nicho biológico único dentro del lumen gástrico por diversos mecanismos, entre ellos, induciendo la inflamación gástrica, rompiendo la barrera mucosa gástrica y alterando la homeostasis del estómago (Dunn et al, 1997). Tanto en la etapa de colonización como de permanencia en la mucosa gástrica la enzima ureasa secretada por *H. pylori* adquiere un rol clave en su fisiopatogenia. Se cree que la función de la ureasa es la producción de un microambiente neutro necesario para la sobrevivencia del microorganismo en las drásticas condiciones del estómago, y se ha demostrado que especies mutantes de *H. pylori* ureasa-negativa no tienen la capacidad de colonizar el lumen gástrico en animales de experimentación (Dunn et al, 1997). Por lo anterior, recientes investigaciones relacionadas con la búsqueda de compuestos con actividad anti ureasa nos llevan al estudio de polifenoles responsables de esta propiedad. Resveratrol es un estilbeno presente en el vino tinto que ha demostrado tener actividad anti *H. pylori*, que estaría relacionada con su capacidad de inhibir esta enzima por un mecanismo no competitivo, dependiente de la concentración (Paulo et al., 2011). Especial importancia para esta investigación tiene un estudio que demuestra la actividad

antiureasa de algunos derivados de catecol y pirogalol sintéticos, que podrían presentar menores índices de toxicidad en relación al ácido acetohidroxámico que ha demostrado ser un potente inhibidor de la ureasa de *H. pylori* (Xiao et al., 2010). En los últimos años, Pastene y colaboradores han estudiado el efecto inhibitorio sobre *H. pylori* de un extracto estandarizado de cáscara de manzana rico en polifenoles (APPE: 60% de polifenoles totales, 58% de flavonoides, 30% of flavan-3-oles y procianidinas; Pastene et al., 2009) observando una significativa inhibición de la actividad ureásica y una reducción de la adhesión de *H. pylori* tanto *in vitro* como *in vivo* (Pastene et al., 2010).

2. Actividad Antioxidante

La capacidad antioxidante del propóleos ha sido estudiada por muchos investigadores, atraídos principalmente por la búsqueda de compuestos polifenólicos que contribuyan a prevenir enfermedades causadas por el daño celular asociado a la formación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Kumazawa et al, 2004; Banskota et al., 2000; Basnet et al., 1997). Un amplio espectro de la actividad biológica de estos compuestos con respecto al cuerpo humano se traduce en gran parte de sus efectos antioxidantes (Gülçin, İ. 2012).

Algunos mecanismos que explican la actividad antioxidante de los polifenoles se relacionan con:

- Inhibición de la actividad enzimática previniendo así la aparición de formas reactivas de oxígeno (ROS).
- Quelación de iones provenientes de metales que intervienen en el proceso de formación de radicales libres

- Atrapamiento de formas reactivas del oxígeno (ROS), interrumpiendo así la cascada de reacciones que conducen a la peroxidación de lípidos
- Acción sinérgica con otros antioxidantes

Esta capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos está dada por su alto potencial redox, que les permite actuar como agentes reductores donadores de hidrógeno y captadores de oxígeno singulete. La presencia de grupos hidroxilo en la posición 3'-, 4'- y 5'- en el anillo B de los flavonoides aumenta la actividad antioxidante en comparación a compuestos con un sólo grupo hidroxilo. Adicionalmente, fenoles con dos grupos hidroxilo adyacentes pueden provocar la transición de iones metálicos, como hierro y cobre, que posean capacidad quelante (Miguel et al., 2010). Gregoris y Stevanato reportan la correlación existente entre la estructura química de algunos componentes del propóleo y su capacidad antioxidante, indicando que la mayor actividad antioxidante está dada por moléculas que tienen dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo aromático (Gregoris & Stevanato, 2010).

Respecto de los mecanismos involucrados en la capacidad antioxidante de los polifenoles es interesante la revisión realizada por Perron & Brumaghim, en que señala que la quelación de metales sería responsable tanto de la acción citoprotectora de los polifenoles como de un efecto prooxidante que debe ser abordado en profundidad para explicar cuál es su real implicancia sobre las células. La Figura 3 muestra los sitios donde podrían unirse iones metálicos en el flavonoide quercetina. La actividad antioxidante de los polifenoles se observa comúnmente para los sistemas Fe^{2+} / H_2O_2 utilizando diferentes ensayos, incluyendo estudios celulares y experimentos de inhibición de daño en el ADN in vitro. Por el contrario, al probar los polifenoles en sistemas Cu^+ / H_2O_2 , la potencia antioxidante se ve muy disminuida o incluso se puede observar la

aparición de actividad prooxidante a partir de las interacciones entre los polifenoles y cobre. (Perron & Brumaghim, 2009).

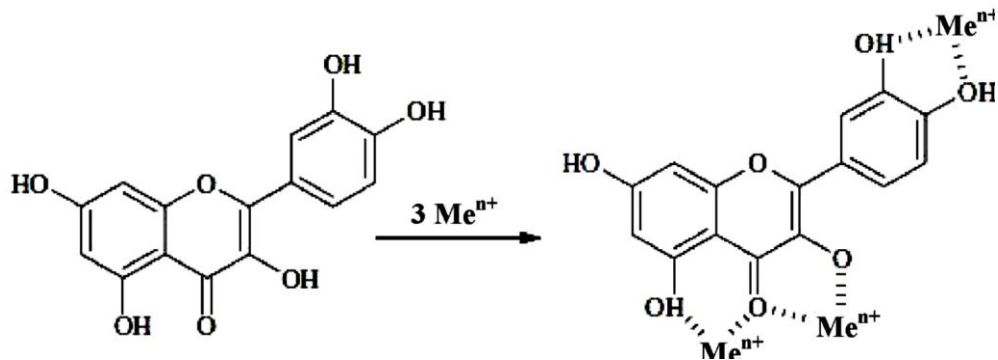


Figura 3: Posibles sitios de unión de metales para flavonoides (quercetina).

Los compuestos polifenólicos de la dieta o exógenos tienen una influencia protectora sobre los antioxidantes endógenos tales como el ácido ascórbico o tocoferol mediante la quelación de metales que catalizan reacciones de oxidación (Ostrowska et al, 2005). Algunos tienen la capacidad de estabilizar radicales α -tocoferol pro-oxidantes. La actividad protectora es mutua. Además, los polifenoles aumentan la absorción de ascorbato, estabilizan sus partículas, reducen su forma oxigenada y disminuyen su metabolismo (Majewska et al, 2009). Debido a su alto contenido de diversos tipos de compuestos polifenólicos, el propóleos muestra una potente actividad antioxidante, que ha sido confirmado en muchos estudios, tanto in vitro (Ya et al, 2004; Mihai et al, 2010; Mihai et al, 2011; Kurek-Górecka et al, 2012) como in vivo (Olczyk et al, 2013).

3. Actividad Antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria del propóleos, según Mirzoeva y Calder la atribuyen a la presencia de ácido caféico, quercetina, narigenina y

principalmente a la acción del fenetil éster del ácido caféico (CAPE). Estos compuestos contribuyen a la supresión de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos por los macrófagos (Mirzoeva & Calder, 1996) y tienen efectos inhibitorios sobre la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa, ornitina decarboxilasa y tirosina-proteína-quinasas (Frenkel K. et al, 1993) Krol y colaboradores atribuyen la actividad antiinflamatoria de propóleos principalmente a CAPE, galangina, kaempherol y kaempheride (Krol W. et al, 1996). Estudios más recientes han confirmado que un extracto etanólico de propóleos mostró fuerte actividad captadora de radicales libres y significativos efectos antiinflamatorios in vitro por la modulación de mediadores inflamatorios clave de la transcripción del mRNA, la inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias específicas, y el bloqueo de la activación del factor nuclear (NF)- κ B. (Huang et al, 2014). CAPE es un inhibidor específico de NF- κ B. Se ha demostrado que suprime significativamente la vía de la lipoxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico durante la etapa de inflamación en concentraciones de orden μ M. A una concentración de 10 μ M, bloquea completamente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los neutrófilos humanos y el sistema xantina / xantina oxidasa. En estudios experimentales desarrollados en ratas con un modelo de artritis, se demostraron los efectos anti-inflamatorios del propóleo, debido al efecto de inhibición de las prostaglandinas (Park et al, 1999). Extractos de propóleos causan una respuesta inmunológica no específica a través de la activación de macrófagos y la inhibición de la producción de óxido nítrico NO (Orsi et al, 2000).

Según Yao y colaboradores, la actividad anti-inflamatoria de los ácidos fenólicos y flavonoides presentes en propóleos es resultado de sus propiedades antioxidantes (Yao L. et al, 2004). Al comparar la estructura química de los flavonoides que exhiben actividad anti-inflamatoria, se ha demostrado que estas propiedades son determinadas por la presencia de grupos hidroxilo en el anillo

B en posición –orto, C-3 'y C-4', donde no puede haber más de dos. Un estudio demostró la potente actividad inhibitoria de fenetil éster del ácido cafeico (CAPE) en la ruta metabólica del ácido araquidónico y el débil efecto de galangina sobre la actividad de la ciclooxigenasa. (Orsi et al, 2000; Mirzoeva & Calder, 1996). Esta actividad se relaciona con la disminución de la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂), tromboxano A₂, leucotrieno B₄ y NO (óxido nítrico II), actuando como inhibidor de la cascada de transformaciones del ácido araquidónico, actividad comparable con la acción producida por indometacina (Raso et al, 2001). Debido a su gran contenido en polifenoles, el propóleo muestra actividad anti-inflamatoria tanto en los procesos inflamatorios agudos como crónicos (Borrelli et al, 2010).

4. Actividad Anticarcinogénica, Antitumoral y Antiproliferativa

El Propóleo contiene sustancias promotores que pueden estimular tanto la proliferación celular como la apoptosis de la célula. Entre ellos se encuentran el ácido cafeico, fenetil éster del ácido cafeico (CAPE), artepillin C, quercetina, narigenina, resveratrol, galangina y genisteína (Díaz-Carballo et al, 2008). Los flavonoides consumidos en los alimentos tienen un efecto directo sobre la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis de las células cancerosas, especialmente con respecto a cáncer del tracto gastrointestinal debido a su contacto directo con ingesta. El efecto citotóxico directo de flavonoides contenidos en propóleos es significativo en el caso de cáncer de mama y tumores papilomatosos del tracto urinario (Benkovic et al, 2008). Los flavonoides presentes en el propóleo pueden detener la proliferación de varios tipos de células cancerosas, especialmente monocítica y leucemia linfática (Lugli et al, 2009).

Un mecanismo anticancerogénico consiste en la inhibición de la tirosina quinasa C, que participa en el crecimiento y la proliferación de las células del cáncer (Sánchez et al, 2004). Análogos de ácido caféico como el CAPE son bloqueadores eficaces de la enzima prooxidativa xantina oxidasa (XO) involucrada en la catálisis de las purinas y pirimidinas (Chan et al, 1995). Esta enzima es una flavoproteína que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y genera anión superóxido y ácido úrico. Además se ha demostrado que los inhibidores de la xantina oxidasa pueden ser útiles para el tratamiento de la enfermedad hepática y como antiinflamatorio en un cuadro de gota. Esta inhibición por unión a la molibdo proteína de la XO en su sitio activo permite que CAPE detenga la vía de recuperación de las purinas, lo que es útil en el tratamiento del cáncer de cualquier tipo de célula.

El estrés oxidativo también es una causa importante de lesiones celulares durante la carcinogénesis. Estudios realizados en eritrocitos demostraron que CAPE y otros ésteres de ácidos polifenólicos relacionados provocaron efectos inhibitorios notables sobre la peroxidación lipídica en la membrana de los eritrocitos, sobre el rompimiento de cadenas de ADN celular y la fragmentación de proteínas (Wang T. et al, 2008).

La inhibición enzimática no competitiva de la 5-lipooxigenasa descrita anteriormente, así como la inhibición de promotores tumorales en el cultivo de células HeLa mediada por procesos oxidativos iniciados por CAPE también ha sido reportado (Bhimani R. et al, 1993). En otro estudio donde se ensayaron 20 muestras de propóleos de diferente origen se identificó y se calculó la concentración de algunos flavonoides y ácidos fenólicos dando como conclusión la hipótesis que el efecto de citotoxicidad sobre células HeLa no dependería de la concentración de componentes particulares, sino de una posible actividad sinérgica de ácidos fenólicos y flavonoides individuales (Barbariá M. et al, 2011).

Se cree que CAPE es capaz de inhibir el crecimiento tumoral por inducir la apoptosis celular y provocar la detención del ciclo celular en un modelo de cáncer de mama, donde la detención del ciclo celular parece tener un rol más significativo (Wu J. et al, 2011). En esta acción juega un importante rol su capacidad de bloquear la vía de transducción de la señal de (NF)- κ B, el que está desregulado en una gran variedad de cánceres humanos. Se ha demostrado que este bloqueo detiene la proliferación de células tumorales, llevándolas a apoptosis, o volviéndolas más sensibles a la acción de agentes anti-tumorales, especialmente antioxidantes (Escárcega R. et al, 2007).

La angiogénesis es otro proceso patogénico fundamental en el cáncer que es inhibido por CAPE al ser capaz de modular el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en cultivos celulares (Basini G. et al, 2012). Otro efecto de CAPE sobre la invasión tumoral y metástasis se relaciona con la regulación de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), que son enzimas proteolíticas zinc-dependientes que juegan papel fundamental en la metástasis tumoral mediante la escisión de la matriz extracelular (Hwang et al, 2006).

Con todo lo anterior, Chan y colaboradores sugieren un resumen de los posibles mecanismos del potencial anti cáncer del propóleo:

1. Suprime la proliferación de células de cáncer o pre-cancerosas a través de su efecto inmunomodulador;
2. Disminuye las poblaciones de células madre del cáncer;
3. Bloquea las vías de señalización de oncogenes específicos;
4. Posee efectos antiangiogénicos;
5. Modula el microambiente tumoral;
6. Puede usarse como un coadyuvante o un tratamiento complementario contra el cáncer (Chan G. et al, 2013)

Es así como Ozturk y colaboradores han revisado los efectos de CAPE en algunos tipos de cáncer tales como de pulmón, próstata y melanomas

concluyendo que existe una actividad anticarcinogénica e inductora de apoptosis, sin embargo indica que se requieren más estudios en todas las áreas de la medicina incluyendo la toxicidad para que el propóleo pueda ser utilizado como un agente en terapias anticancerígenas (Ortuzk G. et al, 2012).

5. Actividad Antiaterogénica

Los flavonoides también muestran efectos antiagregantes sobre las plaquetas sanguíneas. Esta consiste en evitar la reacción en cadena de la oxidación de lípidos iniciada por los radicales libres. Se ha demostrado que los aniones superóxido afectan el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), que se caracteriza por tener efecto antiagregante y relajante sobre los vasos sanguíneos. Radicales libres hidroxilo también inhiben la prostaciclina sintetasa, responsable de la transformación de peróxidos de prostaglandina en prostaciclina. (Kuźnicki D., 2006; Nijveldt et al, 2001). Además, propóleo es un modulador de lípidos y del metabolismo de las lipoproteínas y tiene influencia directa en la reducción de los niveles de colesterol y síntesis de triglicéridos en el hígado de ratas de laboratorio (Li et al, 2012; Fuliang et al, 2005). Estudios más recientes determinaron que el propóleo muestra efectos preventivos en cuadros de aterosclerosis. Luego de la administración de propóleo se logró una mejora en el perfil de lípidos y la disminución en el contenido de citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas. El efecto fue el resultado de influir en el mRNA mediante la regulación de la expresión de genes que desempeñan un papel clave en el mecanismo patógeno de la aterosclerosis (Daleprane et al, 2012). La agregación de plaquetas de la sangre es uno de los componentes en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. CAPE es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria (Chen et al, 2007). Extractos de propóleos también han demostrado tener un efecto directo en la síntesis de óxido nítrico. La influencia moduladora sobre la síntesis de óxido nítrico tiene un efecto protector sobre el

endotelio de los vasos sanguíneos en el curso de procesos inflamatorios cardiovasculares (Roos et al, 2011).

6. Efectos sobre el sistema Cardiovascular

Los polifenoles, principalmente flavonoides, estabilizan y fortalecen los vasos sanguíneos. Por lo tanto, pueden ser utilizados en la prevención de sangrado, equimosis, venas varicosas y la aterosclerosis (Makowska-Wąs et al, 2004). La actividad vasoprotectora está relacionada con la quelación de iones de cobre, lo que resulta en la inhibición de la hialuronidasa, enzima que depolimeriza ácido hialurónico e hidroliza elastina, reforzando y sellando por este mecanismo el endotelio de los vasos. La permeabilidad de los vasos también se disminuye indirectamente como consecuencia de inhibir el metabolismo de las catecolaminas mediante la inactivación de la catecol-O-metiltransferasa (Olszewska M. 2003).

Como ya se indicó, los polifenoles también muestran una influencia beneficiosa en la circulación coronaria y tienen efecto hipotensor, aumentando la biodisponibilidad de óxido nítrico ejerciendo una acción positiva sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). También inhiben la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y ejercen un efecto vasodilatador disminuyendo la agregación plaquetaria y la concentración de tromboxano (Packer et al, 1999; Rohdewald, P. 2002).

Algunos flavonoides contenidos en propóleos como la quercetina, kaempferol y ramnetina bloquean el transporte de calcio a través de las membranas celulares en el citoplasma, lo que provoca vasodilatación y disminución de la presión arterial (Konishi, Y., 2005). Efectos cardioprotectores se lograron también en el caso de miocardiopatía inducida en ratas, que fueron tratados mediante la administración intraperitoneal de un extracto de propóleo.

Se observó mejoría tanto en los parámetros bioquímicos como en la imagen histológica del músculo cardíaco. (Chopra et al, 1995).

7. Actividad Antidiabética

Quizás, de todas las propiedades conocidas del Propóleo, la actividad antidiabética sea la menos estudiada. En 1996 se publica el primer reporte de esta actividad (Sforcin & Bankova, 2011) donde se señala que un extracto acuoso de Propóleo muestra un efecto preventivo sobre la destrucción de las células β del páncreas contra la toxicidad de estreptozotocina (STZ) que induce la inhibición de IL-1 β y la generación de NO sintasa (Matsushige et al., 1996). Luego, se estudió el efecto antihiper glucémico de la fracción soluble en agua de una muestra de Propóleo, demostrándose un potente efecto de supresión de la elevación postprandial de los niveles de glucosa en sangre luego de la administración oral de extracto de Propóleo en ratas Sprague-Dawley, atribuyendo este efecto principalmente a un constituyente derivado del ácido caféico denominado ácido 3, 4, 5-tri-O-cafeoilquinico (Matsui et al., 2004). En 2005, un estudio en que se emplearon ratas con diabetes mellitus, demostró que el Propóleo es capaz de modular positivamente los niveles de azúcar y lípidos en sangre, además de ejercer una disminución de la peroxidación lipídica y una actividad atrapadora de radicales libres en un modelo in vivo (Fuliang et al., 2005). Ese mismo año Okutan y colaboradores estudiaron los efectos que provoca la diabetes en el corazón demostrando que la diabetes mellitus aumenta el estrés oxidativo en el tejido cardíaco y que CAPE tiene un efecto de disminución del estrés oxidativo a través de su propiedad antioxidante por inhibición de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) (Okutan et al, 2011). Zanami y sus colaboradores estudiaron por ocho semanas el efecto del consumo de fructosa en ratas, demostrando que el Propóleo disminuyó significativamente el nivel plasmático de insulina sin afectar los

niveles de glucosa en sangre ni de colesterol total, indicando que el Propóleo podría prevenir el desarrollo de la resistencia a la insulina (Zanami et al., 2007). Un estudio del año 2010 intentó elucidar el mecanismo de acción del efecto antidiabético del Propóleo, investigando la expresión y actividad del gen gluconeogénico glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en células HepG₂. El estudio demostró que Propóleo redujo significativamente la expresión y la actividad enzimática de G₆Pasa, sugiriendo que el Propóleo puede ser un potencial agente antidiabético para el tratamiento de la diabetes no insulino-dependiente (Kang et al., 2010). Zhu y colaboradores mostraron que muestras de propóleo procedentes de China y Brasil inhibieron significativamente la pérdida de peso corporal y el aumento de glucosa en sangre en ratas diabéticas. Además, las ratas tratadas con propóleo originario de China mostraron una reducción de los niveles de hemoglobina glicosilada en comparación con las ratas diabéticas no-tratadas. La medición del metabolismo de los lípidos en sangre mostró signos de dislipidemia en ratas diabéticas y el efecto del tratamiento con propóleo redujo el nivel de colesterol total. (Zhu et al, 2011).

8. Actividad Antiviral

La actividad antiviral de los flavonoides fue discutida en los estudios de Wang (Wang et al, 1998) y han demostrado ser capaces de actuar como inhibidores de la transcriptasa inversa, enzima necesaria para el desarrollo del VIH, propiedad muy deseable, ya que los inhibidores de esta enzima utilizados en la actualidad (ej.: Aciclovir) son extremadamente tóxicos, no sólo a las células infectadas por virus, sino también para las células normales. Una ventaja adicional de los flavonoides es que inducen la producción de Interferones (IFNs). Estas sustancias tienen varios efectos antivirales, incluyendo la fortificación de la membrana celular, inducción de nucleasas que atacan el genoma viral y la modificación del patrón de fosforilación en la

traducción de proteínas deteniendo la biosíntesis de todas las proteínas, incluyendo las del virus (Ng et al, 1997; Ahmad A. et al, 2015).

Amoros y colaboradores estudiaron la actividad antiviral de propóleos in vitro sobre diferentes tipos de virus RNA y DNA (Amoros et al, 1992 a) y al buscar que compuesto del propóleos resulta ser más activo concluyeron que solamente galangina, kaempferol y el extracto total de propóleos son activos contra el virus herpes Tipo I (HSV-1) (Amoros et al, 1992 b). Similares resultados hallaron Schnitzler y colaboradores, donde estudiaron diferentes etapas del proceso de infección viral utilizando aciclovir como control. De los seis componentes de propóleo seleccionados para el estudio, sólo dos mostraron un efecto antiviral. Galangina y crisina redujeron la formación de la placa de HSV-1 en comparación con los controles no tratados. Sin embargo, dado el efecto sinérgico de los muchos componentes diferentes que exhiben los extractos de propóleos se encuentran efectos antiherpéticos significativamente más altos en los extractos totales ya sea acuoso o etanólico que en los constituyentes aislados individualmente (Schnitzler et al, 2010).

Recientemente dos estudios han demostrado que dependiendo de la proporción y composición química del propóleos podemos encontrar diferentes mecanismos de acción antiviral. Bankova y colaboradores hacen este análisis luego de estudiar los satisfactorios resultados obtenidos in vitro contra virus herpes tipo I y II. Ellos muestran que la actividad antiviral de un extracto de propóleos estaría relacionada a su acción sobre la adsorción viral a las células. El contacto directo con propóleos parece dañar significativamente el virus del herpes, y sugieren que el propóleos puede interferir en componentes específicos de la cubierta viral (glicoproteínas) que median la adsorción y permiten la fijación y la penetración del virus en las células (Bankova et al, 2014). Otro estudio con propóleos brasileño demostró la importancia de kaempferol en la actividad antiviral tanto in vitro como in vivo, en un modelo

animal. Un extracto estandarizado de propóleos demostró tener actividad sobre el virus de la influenza en ratones, probablemente por un mecanismo asociado a inhibición de la etapa de replicación del virus, sin embargo la relación entre las estructuras químicas y la actividad antiviral de los flavonoides parece ser difícil de elucidar. El contenido de apigenina y kaempherol en el extracto estandarizado es bajo, por lo tanto, es probable que este extracto de propóleos brasileño contenga compuestos antiinfluenza más eficaces, que este grupo de investigadores continúa intentando elucidar (Kai et al, 2014).

Métodos semi-automatizados para la determinación de Actividad Biológica

La aparición de sistemas de multi-lectura espectral en microplacas comienza a fines de los años 80. En el apogeo de los ensayos de ELISA surge la necesidad de realizar muchos análisis, donde la información obtenida de la lectura sistemática de muestras a intervalos determinados de tiempo permita realizar el estudio cinético y conocer el comportamiento de activación o inhibición enzimática de forma rápida, sencilla, reproducible y reduciendo considerablemente los volúmenes de reactivos y los residuos contaminantes producidos en laboratorio. En 1987, se describe un método colorimétrico para la determinación rutinaria de la velocidad de las reacciones enzimáticas, (Ashour et al, 1987) usando un lector de placas de microtitulación de 96 pocillos comúnmente utilizado en inmunoensayos, donde los datos obtenidos por este método se compararon con los obtenidos en un espectrofotómetro convencional bajo condiciones similares. Las medidas de absorbancia hechas en ambos equipos fueron similares, así como los cambios de absorbancia medidos con el tiempo, demostrando ser un método muy eficaz, aumentando el número de

ensayos enzimáticos llevados a cabo por persona y permitiendo la rápida manipulación de los valores de absorbancia para calcular los datos de velocidad deseados. Luego de esta publicación se sucedieron numerosos estudios que utilizan este equipo con diferentes aplicaciones, tales como inhibición/activación de la actividad enzimática (Nelson & Lipsky, 1995), aplicaciones en fluorimetría (Marx et al, 2001), viabilidad celular (Kueng et al, 1989), ensayo cinético de α -amilasa (Soor & Hincke, 1990), entre otros.

1. Determinación de la capacidad antioxidante

El análisis de la actividad antioxidante se puede realizar por diferentes métodos. Huang y colaboradores realizan una revisión el año 2005, donde dependiendo de las reacciones involucradas, clasifican estos ensayos en dos tipos: los ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en la transferencia de electrones (ET). Ellos indican que en la mayoría de los ensayos HAT se aplica un esquema de reacción competitiva, en la que tanto antioxidante como sustrato compiten por radicales peroxilo térmicamente generados a través de la descomposición de compuestos azoicos. Estos ensayos incluyen la inhibición de la auto-oxidación inducida por lipoproteínas de baja densidad, capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC), el potencial total antioxidante de captura de radicales (TRAP) y los ensayos de blanqueo de crocina. Los ensayos basados en transferencia de electrones miden la capacidad de los antioxidantes de reducir un oxidante, que cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio de color se correlaciona con la concentración del antioxidante en la muestra. Algunos ensayos basados en ET incluyen el ensayo de fenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR), capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC), potencia antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP), ensayo de "potencial antioxidante total" utilizando Cu (II) como un complejo

oxidante y el ensayo de decoloración del reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil o también conocido como DPPH (Huang et al, 2005)

En los ensayos de transferencia de electrones el antioxidante es capaz de ceder un electrón, reduciendo al oxidante lo que genera un cambio de coloración cuyo punto final será el momento en que el cambio de coloración se detiene. El cambio de absorbancia (ΔA) se representa frente a la concentración de antioxidante para dar una curva lineal. La pendiente de la curva refleja la capacidad reductora del antioxidante, que se puede expresar como la equivalencia en Trolox (TE) o equivalentes de ácido gálico (GAE). Estos ensayos se asemejan a la titulación redox en el análisis químico clásico. Debido a que no hay una reacción competitiva involucrada y no hay ningún radical del oxígeno en los ensayos, es cuestionable cómo estos resultados son correlacionados con la capacidad antioxidante de una muestra, asumiendo que la actividad antioxidante es igual a la capacidad reductora. DPPH es uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánico estable y disponible en el mercado y tiene un máximo de absorción UV-vis a 515 nm. Tras su reducción, su intensa coloración violeta oscuro disminuye monitorizando el progreso de la reacción convenientemente con un espectrofotómetro o un lector de microplaca. El progreso de la reacción se controla a 515 nm durante 30 min o hasta que la absorbancia sea estable. Tras la reducción, la solución se decolora. El porcentaje de DPPH restante se calcula como % DPPH remanente, y es proporcional a la concentración de antioxidante presente en la muestra. La concentración que provoca una disminución del 50% de la concentración inicial de DPPH se define como EC50.

El ensayo de la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC) se informó por primera vez por Miller y Rice-Evans en 1993 (Miller et al, 1993). Debido a su simplicidad operativa, el análisis TEAC se ha utilizado en muchos laboratorios de investigación para el estudio de la capacidad antioxidante, y los

valores TEAC de muchos compuestos y muestras de alimentos fueron informados. Los valores TEAC de compuestos antioxidantes puros no siempre muestran una clara correlación con el número de electrones que un antioxidante puede donar. Algunos estudios han mostrado que el índice TEAC resulta de la capacidad antioxidante del compuesto original más el potencial de la capacidad antioxidante del producto (s) de la reacción. Esto significa que el ensayo TEAC no refleja necesariamente el efecto antioxidante de una sola estructura. Esto dificulta la aplicabilidad de este ensayo para la construcción de la relación estructura-actividad (SAR) y la clasificación en un “ranking” de antioxidantes (Arts et al, 2004). En este estudio se observó que un producto de reacción demostró tener mayor capacidad antioxidante que el producto original, lo que limita las posibilidades de este ensayo en estudios SAR, donde lo deseable es que la actividad esté relacionada a una sola estructura. Ou y colaboradores (Ou et al, 2001) sugieren tener presente que un impedimento similar a este se puede presentar en otro tipo de ensayos de capacidad antioxidante, como ejemplo en el ensayo de capacidad de absorción de radicales del oxígeno conocido por su sigla ORAC.

Muchos estudios se han realizado con respecto a los radicales libres, estrés oxidativo y la actividad antioxidante de los alimentos, otorgando a los antioxidantes un papel prominentemente beneficioso. Sin embargo algunos autores han cuestionado su importancia y al mismo tiempo han intentado comprender mejor los mecanismos detrás del estrés oxidativo. Una corriente de científicos defiende la idea que independientemente de la cantidad de antioxidantes ingeridos, su absorción es muy limitada, y que en algunos casos los prooxidantes son beneficiosos para la salud humana (Carocho & Ferreira, 2013). Otra limitación significativa en la capacidad antioxidante de los alimentos es el gran número de ensayos que se pueden utilizar con resultados potencialmente diferentes. Los ensayos antioxidantes tienen limitaciones e interferencias que aún plantean dificultades al comparar los resultados entre los

distintos procedimientos e investigadores. Esto, unido a un sinnúmero de matrices diferentes, plantea serios problemas que no ayudan a la comunidad científica para avanzar (Frankel & Meyer, 2000). Por ello, la tendencia actual es utilizar más de un ensayo para establecer la capacidad antioxidante de una muestra. Frankel y Meyer sugieren que la evaluación antioxidante se lleve a cabo bajo diversas condiciones de oxidación, utilizando diferentes métodos para medir los productos finales de la oxidación, poniendo especial énfasis en elegir los sustratos adecuados al tipo de muestra, probar diferentes condiciones de oxidación incluyendo la influencia de la temperatura e incluir tanto los productos iniciales como los productos de descomposición secundarios que puedan formarse en la reacción.

Por todo lo anterior, este estudio se abordará con la implementación de métodos semi-automatizados para la determinación de la actividad biológica *in vitro* de las muestras de propóleo. El objetivo es procesar un elevado número de muestras, reducir el consumo de reactivos y rentabilizar al máximo los datos analíticos en lo referido a interpretación de resultados y costos asociados al análisis. Los análisis de propóleos en microplaca de 96 pocillos han resultado ser muy utilizados debido a su rapidez y fácil montaje. De estos ensayos es posible comparar la actividad antioxidante entre muestras, y obtener en corto tiempo una estimación de la EC⁵⁰.

2. Determinación de actividad antidiabética

La diabetes mellitus es el trastorno endocrino más común, causado por deficiencia hereditaria o adquirida en la excreción de insulina y por una disminución de la capacidad de respuesta de los órganos a la insulina secretada. La diabetes mellitus se caracteriza por niveles anormalmente altos de glucosa en el plasma, siendo esta hiperglicemia quien ha jugado un rol central en la patogénesis de las complicaciones relacionadas con la diabetes

mellitus. Conocidas como alfa-glucosidasas son una serie de enzimas, incluyendo sacarasa o α -amilasa, lactasa y maltasa, situadas en las células intestinales, que catalizan el paso final en el proceso digestivo de los hidratos de carbono para liberar monosacáridos absorbibles que resultan en aumento de los niveles de glucosa en sangre. Si se inhiben estas α -glucosidasas, la liberación de D-glucosa a partir de hidratos de carbono complejos en la dieta puede ser retardada.

Un método de screening en microplaca fue desarrollado en 2005 demostrando la factibilidad de determinar α -amilasa en este formato de 96 platos (Funk & Melzig, 2005). Recientemente, Zhang y colaboradores han demostrado el efecto inhibitorio de propóleos sobre α -glucosidasa utilizando acarbosa como control. Tal como se mencionó con anterioridad, la inhibición enzimática de las enzimas relacionadas con la diabetes debe ser analizada en mayor profundidad, existiendo poca literatura que avale los promisorios resultados obtenidos hasta el momento (Zhang et al, 2015).

REFERENCIAS

- AHMAD, A., KALEEM, M., AHMED, Z. & SHAFIQ, H. (2015) Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections-A review. *Food Research International*.
- ALPER, J. (1993) Ulcers as an infectious disease. *Science*, 260, 159-160.
- AMOROS, M., SAUVAGER, F., GIRRE, L. & CORMIER, M. (1992a) In Vitro Activity of Propolis. *Apidologie*, 23, 231-240.
- AMOROS, M., SIMOES, C. M. O., GIRRE, L., SAUVAGER, F. & CORMIER, M. (1992b) Synergistic Effect of Flavones and Flavonols Against Herpes

- Simplex Virus Type 1 in Cell Culture. Comparison with the Antiviral Activity of Propolis. *Journal of Natural Products*, 55, 1732-1740.
- ARTS, M. J. T. J., HAENEN, G. R. M. M., VOSS, H.-P. & BAST, A. (2004) Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 45-49.
- ASHOUR, M.-B. A., GEE, S. J. & HAMMOCK, B. D. (1987) Use of a 96-well microplate reader for measuring routine enzyme activities. *Analytical Biochemistry*, 166, 353-360.
- BANKOVA, V., GALABOV, A. S., ANTONOVA, D., VILHELMOVA, N. & DI PERRI, B. (2014) Chemical composition of Propolis Extract ACFÂ® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine*, 21, 1432-1438.
- BANSKOTA A. ET AL. a (2001) "Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China", *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 239–246.
- BANSKOTA A. ET AL. b (2001) "Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis" *Phytomedicine* 8 (1):16-23.
- BARBARIC, M., MISKOVIC, K., BOJIC, M., LONCAR, M. B., SMOLCIC-BUBALO, A., DEBELJAK, Z. & MEDIC-SARIC, M. (2011) Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 772-778.
- BASINI, G., BAIONI, L., BUSSOLATI, S., GRASSELLI, F., DAQUINO, C., SPATAFORA, C. & TRINGALI, C. (2012) Antiangiogenic properties of an unusual benzo[k,l]xanthene lignan derived from CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester). *Investigational New Drugs*, 30, 186-190.
- BASNET P. ET AL, (1997) "Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian propolis". *Zeitschrift fu"r Naturforschung*, 52c, 828–833.

- BENKOVIC, V.; KNEZEVIC, A.H.; DIKIC, D.; LISICIC, D.; ORSOLIC, N.; BASIC, I.; KOSALEC, I.; KOPJAR, N. (2008) Radioprotective effects of propolis and quercetin in gamma-irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine*, 15, 851–858.
- BHIMANI, R. S., TROLL, W., GRUNBERGER, D. & FRENKEL, K. (1993) Inhibition of Oxidative Stress in HeLa Cells by Chemopreventive Agents. *Cancer Research*, 53, 4528-4533.
- BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. (2002) Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, 73, 53–63.
- BOYANOVA L. ET AL. (2003) "Inhibition of Helicobacter pylori growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report". *Journal of Medical Microbiology*, 52: 417-419
- BOYANOVA L. ET AL., (2005) "Activity of Bulgarian propolis against 94 Helicobacter pylori strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods". *Journal of Medical Microbiology*, (54): 481-483.
- CAROCHO, M. R. & FERREIRA, I. C. F. R. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- CASTALDO, S. & CAPASSO, F. (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, Supplement 1, S1-S6.
- CHAN, G. C.-F., CHEUNG, K.-W. & SZE, D.-Y. (2013) The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 44, 262-273.
- CHAN, W.S.; WEN, P.C.; CHIANG, H.C. (1995) Structure-activity relationship of caffeic acid analogues on xanthine oxidase. *Anticancer Res.*, 15, 703–707.

- CHEN, T.G.; LEE, J.J.; LIN, K.H.; SHEN, C.H.; CHOU, D.S.; SHEU, J.R. (2007). Antiplatelet activity of caffeic acid phenethyl ester is mediated through a cyclic GMP-dependent pathway in human platelets. *Chin. J. Physiol.*, 50, 121–126.
- CHOPRA, S.; PILLAI, K.K.; HUSAIN, S.Z.; CIRI, D.K. (1995) Propolis protects against doxorubicin – induced cardiopathy in rats. *Exp. Mol. Pathol.*, 62, 190–198.
- CUSHNIE, T. P. T. & LAMB, A. J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- DALEPRANE, J.B.; FREITAS VDA, S.; PACHECO, A.; RUDNICKI, M.; FAINE, L.A.; DÖRR, F.A.; IKEGAKI, M.; SALAZAR, L.A.; ONG, T.P.; ABDALLA, D.S. (2012). Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *J. Nutr. Biochem.* 23, 557–566.
- DÍAZ-CARBALLO, D.; MALAK, S.; BARDENHEUER, W.; FREISTUEHLER, M.; REUSCH, H.P. (2008). The contribution of plukenetione. A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 9635–9643.
- DUNN, B. E., COHEN, H. & BLASER, M. J. (1997) Helicobacter pylori. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 720-741.
- ESCÁRCEGA, R., FUENTES-ALEXANDRO, S., GARCÍA-CARRASCO, M., GATICA, A. & ZAMORA, A. (2007) The Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B and Cancer. *Clinical Oncology*, 19, 154-161.
- FRANKEL, E. N. & MEYER, A. S. (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- FRENKEL, K., WEI, H., BHIMANI, R., YE, J., ZADUNAISKY, J. A., HUANG, M.-T., FERRARO, T., CONNEY, A. H. & GRUNBERGER, D. (1993) Inhibition of Tumor Promoter-mediated Processes in Mouse Skin and

- Bovine Lens by Caffeic Acid Phenethyl Ester. *Cancer Research*, 53, 1255-1261.
- FULIANG HU, HEPBURN HR, XUAN H, CHEN M, DAYA S, RADLOFF SE. (2005) "Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus". *Pharmacol Res.*; 51(2) 147-152.
- FUNKE, I. & MELZIG, M. F. (2005) Effect of different phenolic compounds on alpha-amylase activity: screening by microplate-reader based kinetic assay. *Die Pharmazie - An International. Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60, 796-797.
- GISBERT & PAJARES, (2010) "Treatment of Helicobacter pylori infection: The past and the future" *European Journal of Internal Medicine* 21 357–359
- GREGORIS E. AND STEVANATO R. (2010) "Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity activity of Venetian propolis" *Food and Chemical Toxicology*; (48):76-82.
- GULCIN, Ä. L. (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- HUANG, D., OU, B. & PRIOR, R. L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- HUANG, S., ZHANG, C.-P., WANG, K., LI, G. & HU, F.-L. (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19, 19610-19632.
- HWANG, H. J., PARK, H. J., CHUNG, H.-J., MIN, H.-Y., PARK, E.-J., HONG, J.-Y. & LEE, S. K. (2006) Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 356-362.
- KAI, H., OBUCHI, M., YOSHIDA, H., WATANABE, W., TSUTSUMI, S., PARK, Y. K., MATSUNO, K., YASUKAWA, K. & KUROKAWA, M. (2014) In vitro

- and in vivo anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08). *Journal of Functional Foods*, 8, 214-223.
- KANG, L.-J., LEE, H. B., BAE, H.-J. & LEE, S.-G. (2010) "Antidiabetic effect of propolis: reduction of expression of glucose-6-phosphatase through inhibition of Y279 and Y216 autophosphorylation of GSK-3 α/β in HepG2 cells". *Phytotherapy Research*, 24, 1554-1561.
- KONISHI, Y. (2005) Transepithelial transport of Artepillin C in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1713, 138–144.
- KROL, W., SCHELLER, S., CZUBA, Z., MATSUNO, T., ZYDOWICZ, G., SHANI, J. & MOS, M. (1996) Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *Journal of Ethnopharmacology*, 55, 19-25.
- KUENG, W., SILBER, E. & EPPENBERGER, U. (1989) Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*, 182, 16-19.
- KUMAZAWA, S., HAMASAKA, T. & NAKAYAMA, T. (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329-339.
- KUREK-GÓRECKA, A.; SOBCZAK, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; GÓRECKI, M.T.; WARDAS, M.; PAWŁOWSKA-GÓRAL, K. (2012) Antioxidant activity of ethanolic fraction of Polish propolis. *Z. Naturforsch. C*, 67, 545–550.
- KUŹNICKI, D. (2006) Antioxidants and cholesterol-reducing agents with antiatherogenic activity contained in plant raw materials. *Post. Fitoter.*, 4, 206–212.
- LI, Y., CHEN, M., XUAN, H. & HU, F. (2012) Effects of Encapsulated Propolis on Blood Glycemic Control, Lipid Metabolism, and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-8.

- LIBERIO, S. A., PEREIRA, A. L. A., ARAUJO, M. J. A. M., DUTRA, R. P., NASCIMENTO, F. R. F., MONTEIRO-NETO, V., RIBEIRO, M. N. S., GONCALVES, A. G. & GUERRA, R. N. M. (2009) The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 1-9.
- LUGLI, E., FERRARESI, R., ROAT, E., TROIANO, L., PINTI, M., NASI, M., NEMES, E., BERTONCELLI, L., GIBELLINI, L., SALOMONI, P., COOPER, E. L. & COSSARIZZA, A. (2009) Quercetin inhibits lymphocyte activation and proliferation without inducing apoptosis in peripheral mononuclear cells. *Leukemia Research*, 33, 140-150.
- MAJEWSKA, M.; CZECZOT, H. (2009) Flavonoids in prevention and therapy of diseases. *Farm. Pol.*, 65, 369–377
- MAKOWSKA-WĄS, J.; JANECKO, Z. (2004) Bioavailability of plant polyphenols. *Post. Fitoter.*, 3, 126–137.
- MARCUCCI, M. C. (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- MARX, M. C., WOOD, M. & JARVIS, S. C. (2001) A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1633-1640.
- MATSUI, T., EBUCHI, S., FUJISE, T., ABESUNDARA, K. J., DOI, S., YAMADA, H. & MATSUMOTO, K. (2004) Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid. *Biol Pharm Bull.*; 27(11):1797-803.
- MATSUSHIGE, K., BASNET, P., HASE, K., KADOTA, S., TANAKA, K. & NAMBA, T. (1996) Propolis protects pancreatic beta-cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). *Phytomedicine*, 3, 203-209.
- MIGUEL, M. G., NUNES, S., DANDLEN, S. A., CAVACO, A. M. & ANTUNES, M. D. (2010) Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts

- of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 3418-3423.
- MIHAI, C.M.; MARGHITAS, L.A. (2010) Antioxidant capacity of Transylvanian propolis. *Anim. Sci. Biotech.*, 67, 266–270. 54.
- MIHAI, C.M.; MARGHITAS, L.A.; DEZMIREN, D.S.; BARNUTIU, L. (2011) Correlation between polyphenolic profile and antioxidant activity of propolis from Transylvania. *Animal Sci. Biotech.*, 44, 100–103. 55.
- MILLER, N. J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M. J., GOPINATHAN, V. & MILNER, A. (1993) A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.
- MIRZOEVA, O. K. & CALDER, P. C. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55, 441-449.
- NELSON, A. N. & LIPSKY, J. J. (1995) Microtiter Plate-Based Determination of Multiple Concentration / Inhibition Relationships. *Analytical Biochemistry*, 231, 437-439.
- NG, T. B., HUANG, B., FONG, W. P. & YEUNG, H. W. (1997) Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sciences*, 61, 933-949.
- NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.; LEEUVEN, P.A.M. (2001) Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418–425.
- NOSTRO, A., CELLINI, L., BARTOLOMEO, S. D., CAMPLI, E. D., GRANDE, R., CANNATELLI, M. A., MARZIO, L. & ALONZO, V. (2005) Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research*, 19, 198-202., (19):198-202
- NOSTRO, A., CELLINI, L., BARTOLOMEO, S. D., CANNATELLI, M. A., CAMPLI, E. D., PROCOPIO, F., GRANDE, R., MARZIO, L. & ALONZO,

- V. (2006) Effects of combining extracts (from propolis or *Zingiber officinale*) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research*, 20, 187-190., (20):187-190.
- OKUTAN, H., OZCELIK, N., RAMAZAN YILMAZ, H. & UZ, E. (2005) Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clinical Biochemistry*, 38, 191-196.
- OLCZYK, P.; RAMOS, P.; BERNAŚ, M.; KOMOSIŃSKA-VASSEV, K.; STOJKO, J.; PILAWA, B. (2013) Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy to comparative examination of different groups of free radicals in thermal injuries treated with propolis and silver sulphadiazine. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*
- OLSZEWSKA, M. (2003) Flavonoids and their use in therapy. *Farm. Pol.*, 59, 391–402.
- ORSI, R. O., FUNARI, S. R. C., SOARES, A. M. V. C., CALVI, S. A., OLIVEIRA, S. L., SFORCIN, J. M. & BANKOVA, V. (2000) Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6, 205-219.
- OSTROWSKA, J.; SKRZYDLEWSKA, E. (2005) The biological activity of flavonoids. *Post. Fitoter.*, 3–4, 71–79.
- OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M. & PRIOR, R. L. (2001) Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- OZTURK G., G. Z., AKYOL S., ERDEN G., GUREL A., AKYOL O. (2012) The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16, 2064-2068.

- PACKER, L.; RIMBACH, G.; VIRGIL, F. (1999) Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin — rich extract from pine (*Pinus maritime*) bark, pycnogenol. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 704–724.
- PARK, E.H.; KAHNG, J.H. (1999) Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch. Pharm.Res.*, 22, 554–558.
- PASTENE, E., SPEISKY, H. N., GARCIA, A., MORENO, J., TRONCOSO, M. & FIGUEROA, G. (2010) In Vitro and in Vivo Effects of Apple Peel Polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7172-7179.
- PASTENE, E., SPEISKY, H. N., TRONCOSO, M., ALARCON, J. & FIGUEROA, G. (2009) In Vitro Inhibitory Effect of Apple Peel Extract on the Growth of *Helicobacter pylori* and Respiratory Burst Induced on Human Neutrophils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7743-7749.
- PAULO, L., OLEASTRO, M. N., GALLARDO, E., QUEIROZ, J. O. A. N. & DOMINGUES, F. (2011) Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine. *Food Research International*, 44, 964-969.
- PERRON & BRUMAGHIN, (2009) "A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding" *Cell Biochem Biophys* 53:75–100
- RASO, G. M., MELI, R., DI CARLO, G., PACILIO, M. & DI CARLO, R. (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences*, 68, 921-931.
- ROHDEWALD, P. (2002) A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 40, 158–168.
- ROOS, T.U.; HEISS, E.H.; SCHWAIBERGER, A.V.; SCHACHNER, D.; SROKA, I.M.; OBERAN, T.; VOLLMAR, A.M.; DIRSCH, V.M. (2011) Caffeic acid

- phenethyl ester inhibits PDGF-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of p38 MAPK, HIF-1 α , and heme oxygenase-1. *J. Nat. Prod.*, 74, 352–356.
- ROSSI, A.; LIGRESTI, A.; LONGO, R.; RUSSO, A.; BORRELLI, F.; SAUTEBIN, L. (2002) The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine*, 9, 530–535.
- SÁNCHEZ, Y., AMRÁN, D., FERNÁNDEZ, C., DE BLAS, E. & ALLER, P. (2008) Genistein selectively potentiates arsenic trioxide-induced apoptosis in human leukemia cells via reactive oxygen species generation and activation of reactive oxygen species-inducible protein kinases (p38-MAPK, AMPK). *International Journal of Cancer*, 123, 1205-1214.
- SCHNITZLER, P., NEUNER, A., NOLKEMPER, S., ZUNDEL, C., NOWACK, H., SENSCH, K. H. & REICHLING, J. (2010) Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy Research*, 24, S20-S28.
- SFORCIN J.AND BANKOVA V. “Propolis: Is there a potential for the development of new Drugs?” *J. Ethnopharmacol* 2011, (133): 253-260.
- SOOR, S. K. & HINCKE, M. T. (1990) Microplate reader-based kinetic determination of $\hat{\pm}$ -amylase activity: Application to quantitation of secretion from rat parotid acini. *Analytical Biochemistry*, 188, 187-191.
- WANG, H.K.; XIA, Y.; YANG, Z.Y.; NATSCHKE, S.L.; LEE, K.H. (1998) Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 439, 191–225.
- WANG, T., CHEN, L., WU, W., LONG, Y. & WANG, R. (2008) Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86, 279-287.

- WU, J., OMENE, C., KARKOSZKA, J., BOSLAND, M., ECKARD, J., KLEIN, C. B. & FRENKEL, K. (2011) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Letters*, 308, 43-53.
- XIAO, Z.-P., MA, T.-W., FU, W.-C., PENG, X.-C., ZHANG, A.-H. & ZHU, H.-L. (2010) The synthesis, structure and activity evaluation of pyrogallol and catechol derivatives as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 5064-5070.
- YAO, L.H.; JIANG, Y.M.; SHI, J.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 59, 113–122.
- ZAMAMI, Y., TAKATORI, S., KOYAMA, T., GODA, M., IWATANI, Y., DOI, S. & KAWASAKI, H. (2007) “Effect of propolis on insulin resistance in fructose-drinking rats”. *Yakugaku Zasshi.*; 127(12):2065-73.
- ZHANG, H., WANG, G., BETA, T. & DONG, J. (2015) Inhibitory Properties of Aqueous Ethanol Extracts of Propolis on Alpha-Glucosidase. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 7.
- ZHU, W., CHEN, M., SHOU, Q., LI, Y. & HU, F. (2011) Biological Activities of Chinese Propolis and Brazilian Propolis on Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mellitus in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-8.

CAPÍTULO 3

Métodos quimiométricos de calibración multivariada.

Se reconoce que los primeros métodos quimiométricos se remontan a mediados de la década del 60. Wold, es el primero en usar el término “quimiometria” en una publicación de 1972 (Wold, 1972) y junto a Kowalsky en 1974 fundan la “International Chemometrics Society”. Esta disciplina nace junto al desarrollo de la computación científica y la instrumentación informatizada en el laboratorio y se diferencia de la estadística clásica utilizada en química analítica por tener un enfoque principalmente multivariado y el uso de métodos de cálculo complejo (Brereton, 2014), lo que demanda un apoyo computacional exigente.

El análisis multivariado de los datos permite extraer una mayor cantidad de información de las muestras en estudio y produce un modelo que representa de mejor manera el comportamiento real del sistema analítico. Considera las interacciones que existen entre los componentes de una muestra y por ello mejora la precisión y se facilita la detección de errores en un modelo predictivo. La calibración multivariada es el proceso de construcción de un modelo matemático que relacione la señal de un instrumento (por ejemplo espectro de absorvancia, cromatograma, etc) con alguna propiedad de las muestras. La

predicción es el proceso inverso de predecir alguna propiedad de una muestra usando el modelo matemático construido con la respuesta o señal entregada por el instrumento (Beebe et al, 1998). Cuando el número de muestras en estudio es lo suficientemente grande, el modelo predictivo gana en robustez y precisión y disminuyen los errores debido a la eliminación del sistema de valores anómalos o outliers que interfieren en la capacidad predictiva del modelo. Otra etapa importante en quimiometría es el pre-procesamiento y transformación de los datos que puede ser definido como una manipulación matemática de las señales analíticas que se hace previo al análisis primario. Se usa para remover información irrelevante de los datos y es una etapa que debe ser optimizada previo a la calibración multivariada.

El uso de herramientas quimiométricas en la investigación de productos derivados de la apicultura ha sido intenso en los últimos años, orientado principalmente a la valoración del origen de estos productos y evitar su adulteración. Diversas técnicas analíticas han sido montadas para lograr este objetivo, tales como ^1H NMR (Schievano et al., 2010), cromatografía aniónica HPAEC-PAD (Cordella et al., 2005), Espectroscopia Infrarroja Cercana NIR (Xiangrong Zhu et al., 2010) entre otras. El análisis de minerales y elementos traza demuestran ser un medio eficaz para los fines de clasificación de la miel de diversos orígenes geográficos y botánicos (Arvanitoyannis et al., 2005; Necemer et al., 2009). También se han aplicado herramientas quimiométricas para clasificar el origen del Propóleo a partir del contenido de metales presentes en la muestra (Cantarelli et al, 2011). El uso de espectroscopía infrarroja combinado con el uso de herramientas quimiométricas ha sido utilizado principalmente en los últimos años para identificar una muestra en base a su “huella digital” dada por su espectro infrarrojo, acoplado con métodos de calibración multivariada permitiendo discriminar muestras de diferentes orígenes y detectar posibles falsificaciones.

El estudio de calibración multivariada de cuadrados mínimos parciales (PLS) es un tipo de calibración que considera la varianza de la concentración de la muestra en estudio y ha permitido a los investigadores establecer modelos predictivos a partir de métodos de referencia. Este es el caso del estudio dirigido por Chen y colaboradores (Chen Q. et al, 2009) donde desarrolla un modelo predictivo utilizando espectroscopia NIR, capaz de estimar el contenido de cuatro catequinas en té verde a partir de los resultados obtenidos en un método de referencia HPLC-DAD. Para realizar la regresión PLS se utiliza un modelo matricial donde los valores de las variables continuas de longitud de onda obtenidos en el espectro NIR o tiempo de retención si se tratase de un cromatograma serán ordenados como si fueran el eje X o la variable independiente; y los resultados obtenidos en el método de referencia corresponderán al eje Y o variable dependiente de un sistema de coordenadas X,Y. La Figura 4 muestra un esquema del ordenamiento de las variables para construir un modelo PLS de regresión multivariada.

Este tipo de estudios permiten discriminar la calidad de un producto en base a la determinación de algunos “marcadores químicos” que posean una actividad biológica relevante, documentada y que sea medible por algún método disponible. La posibilidad de reducir el tiempo y el costo de los análisis rutinarios de control de calidad y de automatizar un proceso que no destruye la muestra en estudio son las principales ventajas de la espectroscopia NIR, que gracias a la optimización de modelos de calibración multivariada entrega como resultado modelos predictivos con un alto índice de correlación con sus pares más sofisticados. El diseño, optimización del modelo y su posterior validación y mejoramiento es la clave del proceso que pasaremos a revisar a continuación:

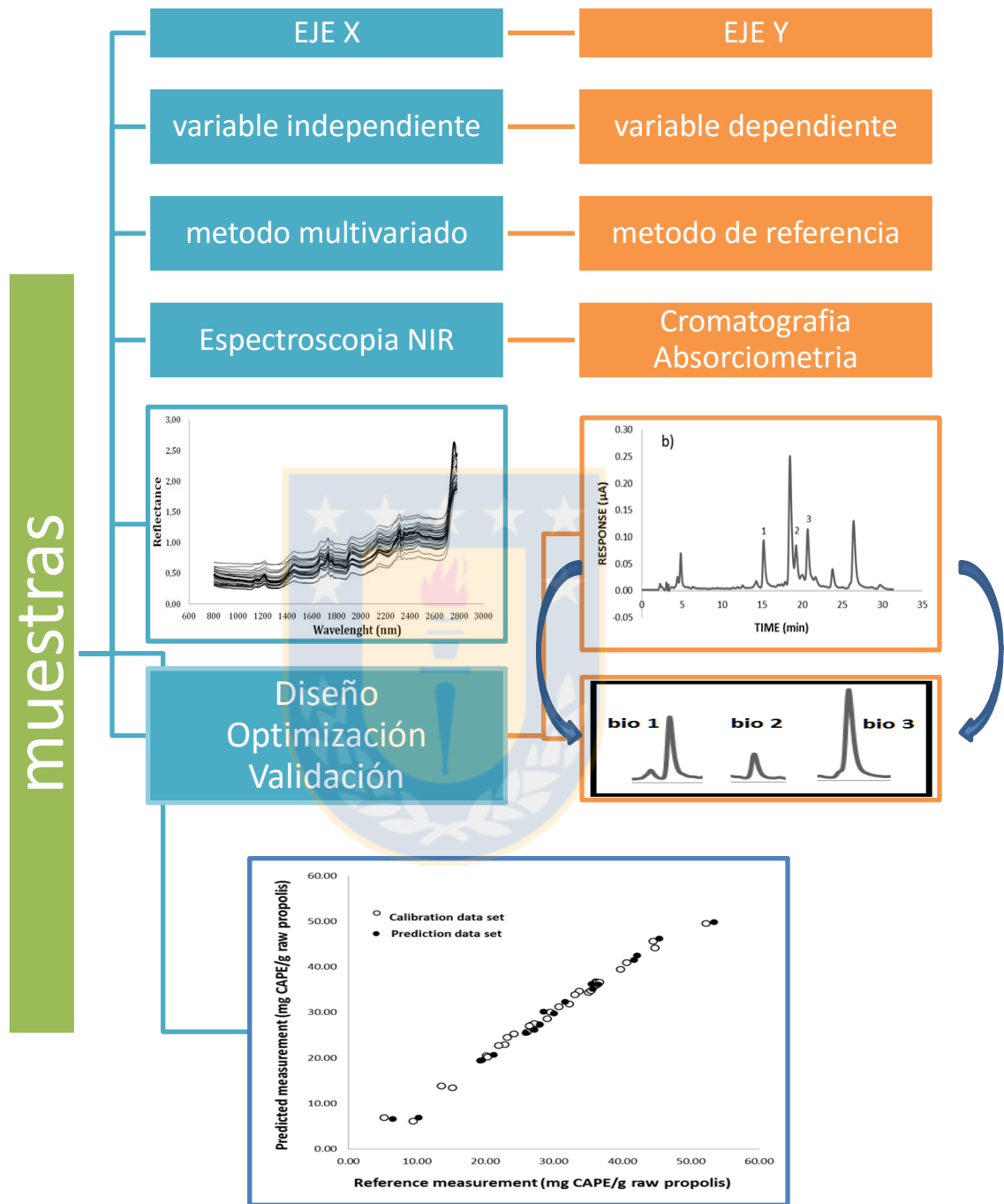


Figura 4: Representación de un estudio multivariado a partir de un método de referencia.

1. Diseño del modelo predictivo con espectroscopia NIR

En el diseño del modelo predictivo se utiliza toda la información disponible de los espectros NIR, así como también la información que se puede obtener del análisis exploratorio de datos. Tres parámetros que pueden ser útiles para evaluar esta primera etapa de diseño son los ensayos de selección de factores (*factor select*), predicción de las muestras de entrenamiento (*y fit*) y diagnóstico de outliers (*outlier diagnostics*). La selección de factores entrega información sobre el número óptimo de componentes principales, la predicción de muestras de entrenamiento permite evaluar la correlación existente entre el valor Y medido, obtenido desde el método de referencia y el valor Y predicho denominado Pred Cal. Finalmente, el diagnóstico de outliers proporciona ayuda para identificar muestras que difieren significativamente del perfil promedio del set de entrenamiento. De esta manera, la evaluación conjunta de estos tres criterios permite realizar una estimación de la idoneidad del modelo predictivo, utilizando para ello ensayos con las diferentes herramientas de análisis que detallaremos a continuación.

A. Visualización de espectros NIR

La primera etapa de visualización de los espectros permite estimar las diferencias más significativas de las muestras y poder detectar rápidamente valores anómalos tal como se muestra en la Figura 5. Esta primera observación nos permite discriminar que existen dos tipos de muestras que a simple vista presentan diferencias.

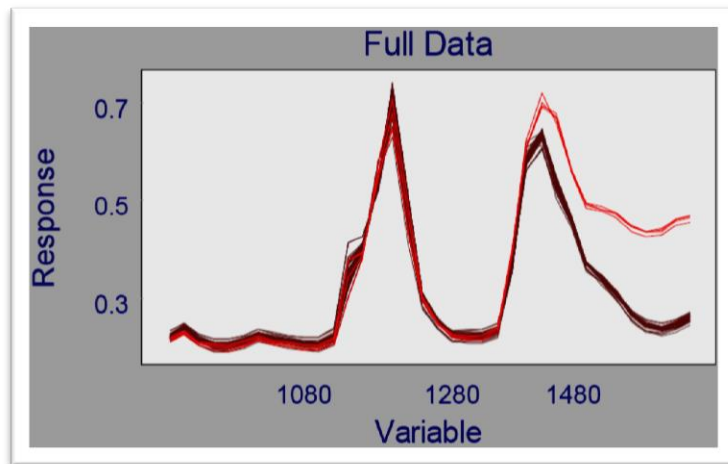


Figura 5: Espectro NIR que discrimina en al menos dos tipos de muestras.

B. Transformación de datos

Para algunos tipos de datos, es beneficioso transformar las variables independientes (el bloque x) antes de su análisis. Esto es particularmente importante cuando las variables independientes consisten en mediciones que varían en el tiempo (como en un cromatograma) o en su longitud de onda (como en un espectro). Por ejemplo, puede haber picos de ruido en un cromatograma. Suavizar puede disminuir los efectos de estas variaciones aleatorias. Alternativamente, un espectro puede contener hombros sutiles que pueden ser mejorados mediante el cálculo de una primera o segunda derivada. Existen diferentes tipos de transformaciones de datos dependiendo de la necesidad de la información. Entre ellas podemos mencionar:

1) Derivadas y suavizado (smoothing)

Las transformaciones de primera y segunda derivada, así como el suavizado se basan en un polinomio de Savitzky-Golay. Este método aplica una convolución de variables independientes en una ventana que contiene un punto

de datos central y n puntos a cada lado. Un segundo orden polinomial ponderado es apto para estas $2n + 1$ puntos y el punto central se sustituye por el valor ajustado. Los tres tipos de transformaciones difieren en los coeficientes de ponderación. La Figura 6 a) muestra el efecto del suavizado sobre dos señales, y en b) el cambio de magnitud y respuesta que produce la primera derivada (en rojo) y la segunda derivada (en verde).

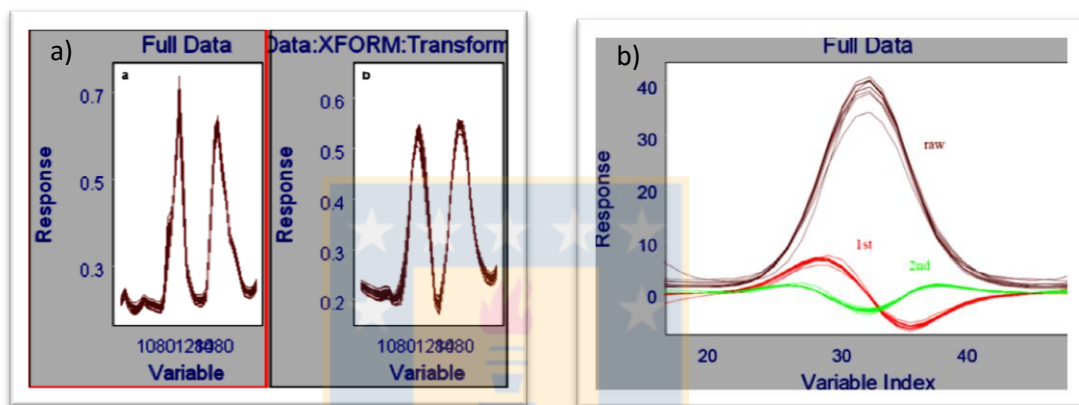


Figura 6: a) Efecto de suavizado; b) Influencia de la aplicación de primera y segunda derivada (1d y 2d) en la disminución del ruido y valores aberrantes

2) Corrección de línea base

La corrección de línea base corrige compensaciones restando un perfil, en lugar de un solo punto. Este perfil puede ser una fila de la tabla de datos o puede ser derivado de un ajuste de la curva. Las opciones de mejora de la línea base pueden ser una función cuadrática, cubica o lineal.

3) Corrección Multiplicativa de Dispersión (MSC)

MSC es un método estándar para la compensación de la dispersión de sólidos en espectrometría NIR. Cada espectro muestra una regresión lineal contra un espectro ideal, obteniéndose una pendiente y la intersección. El

espectro de la muestra es entonces "corregido" en cada longitud de onda restando la intersección, y luego dividiendo por la pendiente. El espectro ideal más a menudo es simplemente la media de muestras incluidas. Porque el espectro medio se calcula a partir de las muestras incluidas, la corrección de una muestra varía según el número y los espectros de las muestras incluidas.

4) Variación Normal Estándar (SNV)

SNV es otro método para la compensación de la dispersión de sólidos en espectrometría NIR. Puede ser descrito como auto-escalado de fila. La media y la desviación estándar de una muestra se calcula primero basado en las variables incluidas; el valor de cada variable incluida se corrige restando la media y dividiendo por la desviación estándar. El resultado suele ser similar al MSC.

5) Alineamiento (Align)

Los datos cromatográficos crudos a menudo sufren de una falta de reproducibilidad del tiempo de retención a través de las muestras, lo que puede dificultar gravemente el análisis multivariante. El software cromatográfico puede compensar estos cambios con un estándar interno. El tiempo de retención de los picos de análisis se compara con el de un estándar interno (o pico marcador), y un factor de corrección, derivado de una corrida de calibración ajusta el tiempo de elución del pico de análisis. El Alineamiento permite realizar una corrección similar para todo el perfil. La alineación mejora considerablemente en los casos en que la diferencia entre la señal del analito y del estándar interno es pequeña, y cuando ambos tienen igual comportamiento de interacción con la fase móvil y estacionaria. El alineamiento se realiza utilizando una muestra como referencia.

C. Pre-procesamiento de datos

A diferencia de la transformación de datos, es una operación orientada a la columna de manera que los resultados del pre-procesamiento de datos son específicos para un conjunto de muestras. La adición de una muestra a un conjunto de datos puede influir en gran medida el efecto de una técnica de pre-procesamiento. Esta etapa es necesaria porque varios algoritmos multivariados calculan los resultados impulsados por los patrones de variación en las variables independientes. Algunos tipos de pre-procesamiento de datos son:

1) Centrado en la media (Mean-Centering)

Las relaciones entre las muestras se visualizan más claramente colocando el origen del trazado en el centro del conjunto de datos. Así, los puntos se centran alrededor de la media. Este tipo de pre-procesamiento se recomienda para la mayoría de los datos, sin embargo debe prestarse atención en el análisis multivariado de muestras que tengan diferencias de señal significativas.

La media se calcula para cada variable por la fórmula:

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_i^n x_{ij} \quad (1)$$

Entonces la media se restó de cada valor de datos para producir una matriz centrada en la media definida por la ecuación (1), donde i es la muestra y j es la variable.

$$x_{ij(mc)} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad (2)$$

2) Escalamiento de varianza (Variance scale)

Cuando los datos de dos (o más) variables dispares abarcan diferentes rangos de magnitud, la variable más grande domina cualquier cálculo de la varianza. Consideremos, por ejemplo, las mediciones de diferentes propiedades (por ejemplo, temperatura, pH, humedad, etc.) donde las unidades crean rangos de variables arbitrarias. O en el caso de un cromatograma, donde algunos compuestos se encuentran en rangos diferentes de concentración y por ende tienen diferencias en el tamaño de la señal (área o altura), el compuesto con mayor señal enmascara la influencia del compuesto con menor área. En tales situaciones, la influencia de enmascaramiento de la variable dominante puede ser removida por escalamiento de varianza.

Una manera de abordar este problema es dividiendo todos los valores para una variable por su desviación estándar. Por lo tanto, primero calculamos la varianza de cada variable:

$$s_j^2 = \frac{1}{n-1} \sum_i^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 \quad (3)$$

Entonces, cada variable independiente se divide por la desviación estándar apropiada, s_j :

$$x_{ij(vs)} = \frac{x_{ij}}{s_j} \quad (4)$$

3) Autoescalamiento (Autoscaling)

Implica la aplicación del escalamiento de la varianza luego de centrar en la media. El escalamiento iguala la importancia de cada variable en el análisis

multivariado. En este caso, la matriz de escalamiento consiste en la desviación estándar de cada variable alrededor de las muestras.

El autoescalamiento de los datos es calculado por la siguiente ecuación:

$$x_{ij(as)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad (5)$$

Donde s_j es la varianza para la variable j .

Cuando se investiga un nuevo conjunto de datos, no se puede saber *a priori* qué forma de pre-procesamiento de datos será la más apropiada y se deben evaluar varias opciones diferentes a un subconjunto de datos y comparar sus resultados. Sin embargo, hay algunas reglas básicas:

- Para los datos espectroscópicos, es muy útil centrar en la media
- Para los datos de picos cromatográficos, por lo general autoescalado
- Para los datos de medidas físicas no correlacionadas, autoescalado

2. Optimización del modelo predictivo

Para desarrollar un modelo predictivo podemos utilizar la regresión de cuadrados mínimos parciales (PLS, también conocido como proyección a estructuras latentes). Este modelo de regresión contiene información acerca de la variable independiente X y las correlaciones con las variables dependientes Y , a menudo y en algunas situaciones, los modelos resultan ser más fiables que los obtenidos con PCR. Luego de realizar un siempre útil análisis exploratorio

de datos que permite conocer la forma en que estos se agrupan y detectar la existencia de posibles valores anómalos se debe ensayar diferentes tipos de transformación y pre-procesamiento de datos, evaluando los potenciales modelos predictivos con ayuda de las herramientas de selección de factores, predicción en el set de entrenamiento (Y fit) y diagnóstico de outliers. Una vez ajustada esta etapa, estamos en condiciones de separar aleatoriamente las muestras en dos grupos: Set de entrenamiento o de calibración y set de validación.

Si en el set de entrenamiento incluimos valores que pudieran ser anómalos estamos asignando “peso”, es decir, damos importancia a valores que no representan a todas las muestras posibles y distorsionan nuestro set de muestras de calibración. Si ello ocurriera, nuestro modelo de calibración contendría errores que se relacionan con esta falta de homogeneidad. Estos valores anómalos pueden ser detectados durante el modelamiento de la regresión con PLS, mejorando de esta forma la capacidad predictiva del modelo de regresión. Así mismo, es necesario optimizar la forma como se agrupan los datos, seleccionando adecuadamente el número de factores; derivados del análisis de componentes principales (PCA), que tendrá el modelo de regresión. Similar situación a la eliminación de outliers es lo que ocurre con la optimización del rango de variables independientes. Al eliminar del modelo de regresión variables que no aportan información útil mejoramos ostensiblemente su capacidad predictiva. Estas tres etapas de optimización tendrán una incidencia directa en el error del modelo predictivo, tal como se verá a continuación.

A. Eliminación de outliers.

El pre-procesamiento de datos aumenta la influencia de los valores atípicos. Esto explica la importancia del diagnóstico de valores atípicos en los algoritmos basados en la varianza. Los outliers o valores atípicos pueden

distorsionar una estimación correcta del número óptimo de factores. Si una muestra tiene un patrón único de variación, un factor adicional puede ser necesario para adaptarse a él. Por lo tanto, los valores atípicos deben ser eliminados del conjunto de entrenamiento antes de estimar correctamente el número óptimo de factores.

B. Selección del número de factores

El número óptimo de factores o PCs (componentes principales) para utilizar en el modelo implica tomar una decisión: si se utilizan muy pocos factores, se podría no haber modelado adecuadamente la información disponible para permitir predicciones futuras confiables; si se eligen demasiados factores, el modelo será más ruidoso, así como también la información y las predicciones futuras podrían ser menos fiables. Cuando dejar de seleccionar factores es una decisión difícil de tomar. Ha sido objeto de mucha investigación teórica y práctica. Muchas maneras se han sugerido para automatizar esta decisión, siendo este un factor clave a la hora de elaborar un modelo de regresión. Debido a que una gran cantidad de varianza se comprime en los primeros factores, hay un punto más allá del cual la variación restante es esencialmente ruido. Por lo tanto, suponemos que podemos dividir los factores en dos tipos: uno que contiene información relevante y otro que contiene información irrelevante (o ruido). El número óptimo de factores puede ser determinado usando criterios basados en la capacidad de predicción del modelo, es decir evaluando el error asociado a los ensayos de predicción.

C. Selección del rango de variable independientes.

Con las variables continuas (espectros o cromatogramas enteros por ejemplo) puede resultar muy beneficioso seleccionar las regiones que más

contribuyen al modelo predictivo y descartar las zonas con poca información útil. Con ello, al igual que en los pasos anteriores, refinamos la información contenida en el set de calibración y aumentamos la posibilidad de obtener predicciones más certeras y confiables. La Figura 7 muestra cómo se puede utilizar esta herramienta, seleccionando las zonas que aportan al modelo y eliminando las áreas que solo aportan ruido. El resultado de esta optimización será un modelo predictivo con menores errores y estimaciones de la variable dependiente más cercanas al método de referencia.

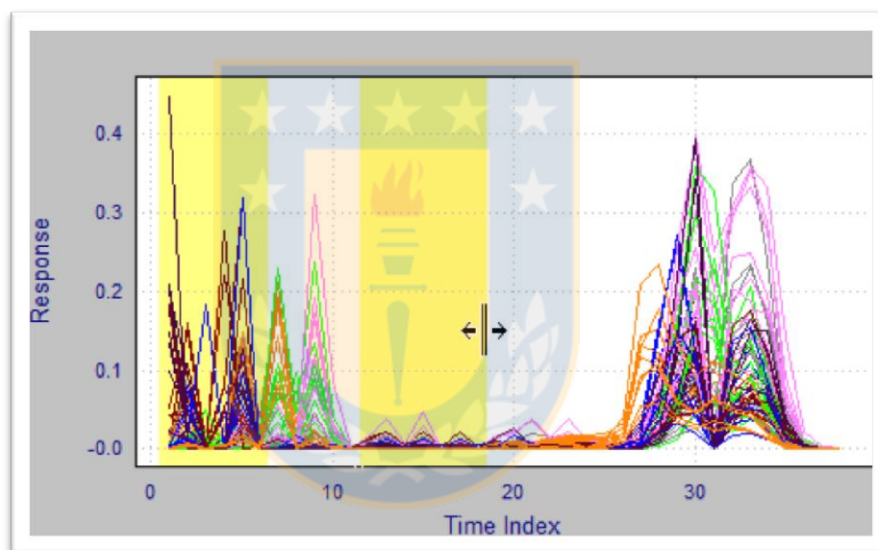


Figura 7: Eliminación de variables que no contribuyen al modelo predictivo en un espectro NIR .

D. Análisis de error

Evaluar el error de predicción que presenta el modelo es una buena forma de comparar modelos con diferentes procesos de optimización. Cada una de las etapas previas debe ser optimizada y evaluar si la modificación tiene incidencia sobre el error del modelo. La forma de medir este error está dada por las formulas:

El error cuadrático medio de la calibración (RMSEC), el error cuadrático medio de la validación cruzada (RMSECV) y el error estándar de predicción (SEP) se utilizaron para el análisis de errores en la calibración, validación cruzada y en la validación externa respectivamente (Ragno et al, 2004; Afkhami et al, 2007).

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_c} (y - \hat{y})^2}{n_c - k}} \quad (6)$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{cv}} (y - \hat{y})^2}{n_{cv}}} \quad (7)$$

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_p} (y - \hat{y})^2}{n_p}} \quad (8)$$

Donde n_c , n_{cv} and n_p representan el número de muestras de calibración, validación cruzada o externa y predicción; y corresponde a las determinaciones obtenidas por métodos de referencia; \hat{y} es la estimación obtenida por el modelo predictivo y k es el número óptimo de componentes o factores utilizados en el modelo PLS.

3. Validación del modelo predictivo

Esta etapa consiste en poner a prueba la capacidad predictiva del modelo. Para ello se utilizan los datos de las muestras que fueron excluidas del set de entrenamiento, que generalmente representan entre el 25 al 50% del número total de datos disponibles. El resultado de esta etapa será una gráfica donde se observa la correlación entre el valor estimado por la predicción y el valor obtenido por el método de referencia. La Figura 8 además entrega información diferenciada del set de calibración (cuadrados en contorno rojo), como del set de validación (cuadrados de contorno verde) Esto, unido al análisis de los errores de calibración (RMSEC), de predicción (SEP) y el error estándar de la validación cruzada (RMSECV) permiten estimar cual será la capacidad predictiva del modelo y tener una idea de su desempeño con muestras desconocidas.

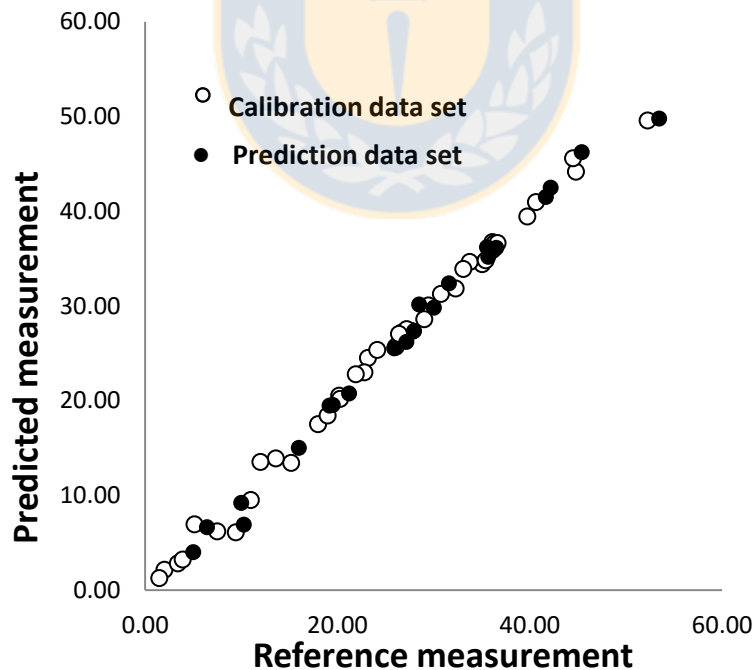


Figura 8: Representación gráfica de la etapa de validación de un modelo predictivo.

A. Mejoramiento del modelo predictivo

El número de muestras del estudio es un factor importante a la hora de evaluar el comportamiento de la varianza del muestreo. A medida que aumenta el n de muestras nos acercaremos a una varianza más representativa de la población, lo que genera modelos predictivos más robustos que cubren rangos más amplios de concentración y que reducen la posibilidad de obtener valores anómalos. Por ello, luego de concluida la etapa de construcción del modelo predictivo, es importante continuar mejorándolo, incorporando más muestras a la población aumentando el número de muestras del set de entrenamiento y de esta manera se fortalecerá su capacidad predictiva. No olvidar que luego de cualquier modificación en el modelo predictivo debemos re-optimizar el set de calibración de manera que estas nuevas muestras sean un aporte a la comprensión de la distribución y varianza de la población en estudio.

REFERENCIAS

- AFKHAMI, A; SARLAK, N; ZAREI, A (2007) Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of cyanide and thiocyanate using the partial least squares (PLS) regression. *Talanta*, 71: 893-897.
- ARVANITOYANNIS, I. S., CHALHOUB, C., GOTSIOU, P., LYDAKIS-SIMANTIRIS, N. & KEFALAS, P. (2005) Novel Quality Control Methods in Conjunction with Chemometrics (Multivariate Analysis) for Detecting Honey Authenticity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 193-203.
- BEEBE K ET AL, (1998) "Chemometrics: A practical Guide" Ed Wiley Inter Science, Chapter 5:183-185.

- BRERETON, R. G. (2014). "A short history of chemometrics: a personal view." Journal of Chemometrics **28**(10): 749-760.
- CANTARELLI, M. A. N., CAMIÑA, J. M., PETTENATI, E. M., MARCHEVSKY, E. J. & PELLERANO, R. G. (2011). Trace mineral content of Argentinean raw propolis by neutron activation analysis (NAA): Assessment of geographical provenance by chemometrics. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 256-260.
- CHEN, Q., ZHAO, J., CHAITEP, S. & GUO, Z. (2009) Simultaneous analysis of main catechins contents in green tea (*Camellia sinensis* (L.)) by Fourier transform near infrared reflectance (FT-NIR) spectroscopy. *Food Chemistry*, 113, 1272-1277.
- CORDELLA, C., MILITÃO, J. S. L. T., CLEMENT, M.-C., DRAJNUDEL, P. & CABROL-BASS, D. (2005) Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 531, 239-248.
- NECEMER, M., KOSIR, I. J., KUMP, P., KROPF, URSKA., JAMNIK, M., BERTONCELJ, J., OGRINC, N. & GOLOB, T. (2009) Application of Total Reflection X-ray Spectrometry in Combination with Chemometric Methods for Determination of the Botanical Origin of Slovenian Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4409-4414.
- RAGNO, G; IOELE, G; RISOLI, A (2004) Multivariate calibration techniques applied to the spectrophotometric analysis of one-to-four component systems. *Anal. Chim. Acta*, 512: 173-180.
- SCHIEVANO, E., PEGGION, E. & MAMMI, S. (2010) ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Chloroform Extracts of Honey for Chemometric Determination of Its Botanical Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 57-65.

WOLD S. (1972) Spline functions, a new tool in data-analysis. *Kemisk Tidskrift*; 3: 34

ZHU, X., LI, S., SHAN, Y., ZHANG, Z., LI, G., SU, D. & LIU, F. (2010) Detection of adulterants such as sweeteners materials in honey using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Food Engineering*, 101, 92-97.



CAPÍTULO 4

Hipótesis y objetivos del estudio

Investigación propuesta

El Propóleo es un producto resinoso recolectado, procesado y utilizado por las abejas melíferas, cuya principal función es mantener las condiciones sanitarias al interior de la colmena. Este producto natural es una fuente de moléculas bio-activas con potenciales aplicaciones biomédicas. No obstante, se ha observado una elevada variación cualitativa y cuantitativa en la composición química de las muestras de Propóleo de diferente origen. Tal problema dificulta la prospección de las estructuras químicas responsables de dichas actividades, puesto que su complejidad química está estrechamente asociada a las diferentes actividades biológicas reportadas. Tal variación se origina, entre otros factores, en la diversidad botánica y localización geográfica de las colmenas. Por tal motivo, en este trabajo se propone la siguiente hipótesis:

Existe una relación entre la actividad biológica y la composición química del propóleo factible de ser caracterizada por espectroscopía NIR y modelada mediante el uso de herramientas quimiométricas.

1. Objetivo General

Desarrollar modelos quimiométricos de calibración multivariada que correlacionen la actividad biológica in vitro de propóleos provenientes de diferentes zonas geográficas de las regiones del Biobío y Araucanía, en función de su composición química y propiedades espectroscópicas, que permita desarrollar un modelo de estudio capaz de abordar la problemática de la estandarización de propóleos de manera rápida, eficiente, automatizable y de bajo costo.

2. Objetivos Específicos

Desarrollo de métodos espectroscópicos para la caracterización de propóleos por espectroscopia NIR

Desarrollo de métodos de análisis cromatográfico y espectroscopia UV-Vis de compuestos polifenólicos característicos de propóleos.

Evaluación de la actividad biológica de muestras de propóleo como antibacteriano, antioxidante e inhibidor enzimático (α -glucosidasa, α -amilasa, anti-ureasa, xantino oxidasa).

Desarrollo y validación de modelos predictivos de regresión multivariada PLS para relacionar la actividad biológica con la composición química y propiedades espectroscópicas de propóleos obtenidos en diferentes zonas geográficas del sur de Chile.

CAPÍTULO 5

Simultaneous determination of total polyphenols and total flavonoids in propolis by Near Infrared Spectroscopy and PLS

Yovani Venegas^{1,3}, **Andrés Freire**⁴, **Edgar Pastene**¹ and **David Contreras**^{2,3*}

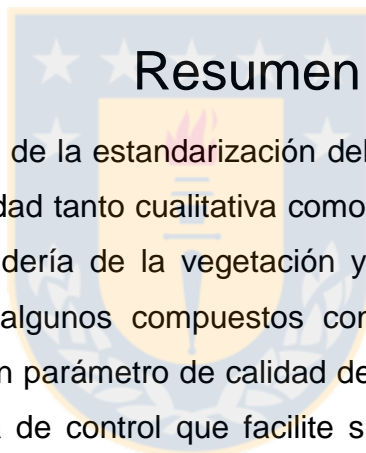
¹Facultad de Farmacia, ²Facultad de Cs. Químicas, ³Centro de Biotecnología, ⁴ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

Summary

The standardization of Propolis is complex, due to the qualitative and quantitative variability of its chemical composition. This depends on the phenology and vegetation of the local flora. The selective analysis of some compounds with biological activity can establish a quality parameter to facilitate the standardization. Because the complexity of the matrix these chemical analyses are expensive, time demanding and require several analytical techniques available. In this study, a near-infrared spectroscopy (NIR) method is proposed for the simultaneous determination of total polyphenols and total

flavonoids in propolis. For the calibration, a Partial Least Squares (PLS) multivariate method was used. These models were previously calibrated by measuring the total polyphenols and total flavonoids content by high-throughput microplate assay. The PLS models were validated by cross-validation and external validation. The validated NIR method was a non-destructive, simple to use and low cost. This method can be utilized as quality parameter and for standardization of raw propolis samples.

Keywords: Propolis, NIR, PLS, Flavonoids



La problemática de la estandarización del propóleo es un tema complejo y radica en la variabilidad tanto cualitativa como cuantitativa de su composición química la que dependería de la vegetación y fenología de la flora local. El análisis selectivo de algunos compuestos con actividad biológica relevante permitiría establecer un parámetro de calidad de las muestras que nos ayude a desarrollar un sistema de control que facilite su estandarización. Debido a la complejidad de la matriz, estos análisis químicos son caros, demandan mucho tiempo y requiere la disponibilidad de varias técnicas analíticas. En este trabajo, se propone un método de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) para la determinación simultánea de polifenoles totales y flavonoides totales. Para la calibración se utilizó un método multivariado de mínimos cuadrados parciales (PLS). Estos modelos fueron previamente calibrados midiendo el contenido de polifenoles y flavonoides totales por espectroscopia UV-Vis con el método de microplaca de alto rendimiento. Los modelos PLS fueron estudiados mediante validación cruzada y validación externa. El método NIR desarrollado resulto ser un método no destructivo, simple de usar y de bajo costo. Este modelo de

estudio se puede utilizar como parámetro de calidad y en la normalización de muestras de propóleo crudas sin ningún tipo de procesamiento.

Palabras Clave: Propóleo, NIR, PLS, Flavonoides

Introduction

There are several reports that validate the biological activity of propolis as an antiseptic, antifungal, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, immunomodulatory, liver protective, anti-diabetic, anti-tumor and antioxidant (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Banskota et al., 2001; Castaldo & Capasso, 2002; Kumazawa et al., 2004; Matsui et al., 2004; Fuliang et al., 2005; Viuda-Martos et al., 2008; Omene et al., 2014).

The composition of propolis depends on phenology and flora of the recollection place. (Marcucci, 1995, Bankova, 2005) Consequently, the standardization of propolis is difficult. (Medic-Saric et al., 2009; Bankova, 2005) Nevertheless, samples from different geographic and climatic zones show similar biological activity against microorganisms in spite of that different chemical composition (Markham et al., 1996; Kujumgiev et al., 1999; Bankova, 2005)

In general, propolis is made of 50% of plant balsam and resin, 30% beeswax, 10% essential oils, 5% pollen and 5% other substances (Dobrowolski et al., 1991). Over 300 compounds have been reported as constituents of propolis including alcohols, aldehydes, aliphatic esters, aromatic esters, amino acids, phenolic acids and esters, ketones, steroids and sugars (Marcucci, 1995; Gómez-Caravaca et al., 2006). The main biological activity compounds in propolis are Polyphenols such as flavonoids, phenolic acids and their esters principally. Flavonoids are secondary metabolites of plants and may act as

phytoalexins and have an important role in plant growth processes, UV protection and chemistry signaling. (Ignat et al., 2011; Massaro et al., 2014).

Different analytical methods have been used for chemical characterization of propolis. The most used is HPLC coupled with UV, DAAD or PAD detector, especially for phenolic compounds characterization (Cuesta-Rubio et al., 2007; Pellati et al., 2011). Also, GC-MS have been used to volatile compound characterization (Bankova et al., 2014) and NMR (Lotti et al., 2010). These techniques in general, are time demanding and have high operating costs. The near infrared spectroscopy (NIR) is a fast, easy and non-destructive method. This technique implies a low operation cost and fast sample preparation. The NIR spectroscopy is associated with chemometrics to extract chemical information. This technique is useful to detect adulterants (Cozzolino & Corbella, 2003) or prove the origin of raw material (Cheng et al., 2013). Therefore, its use in beekeeping industry as quality control tool proposes several possibilities for research to approach the problem of standardization of propolis (Escudero et al., 2013; Xu et al., 2013). Kumazawa showed the importance to know total polyphenols content and total flavonoids in propolis antioxidant activity research. They reported ethanolic extract propolis from different places had relatively strong antioxidant activities, and were also correlated with the total polyphenols and flavonoids contents. Some authors have studied this ratio and have been observed 25-40% of total polyphenols corresponds to flavonoids. (Kumazawa et al., 2004; Lima et al., 2009; Yang et al., 2011; Ribeiro et al., 2012).

In this study, a new method for simultaneous determination of total polyphenols and total flavonoids in propolis has been developed. This method is based on NIR spectroscopy with calibration by Partial Least Squares (PLS). The proposed NIR method is feasible to be automated and modified for in field applications.

Materials and Methods

2.1. Propolis samples

In the present study 26 samples (n = 2) of propolis from different geographic areas of the Biobío and Araucanía Regions, Chile (36'20 N; S 39'32 S ; 71'26 E; 73'32 W) were analyzed, Samples were obtained by mesh collection method (Sales et al., 2006; Abu Fares et al., 2008). After analysis, samples were stored at 4 °C in dark.

2.2. Total Polyphenols determination.

Total polyphenols analysis was performed by Folin-Ciocalteu method (Singleton & Rossi, 1965) adapted to microplate modified from Herald (Herald et al., 2011). First, 10 mg of propolis were dissolved in 5 ml of methanol and then was diluted four times. Later, 10 µL of this solution or Gallic acid (Sigma) solution were diluted on 200 µL of deionized water. In each well, 15 µL of Folin-Ciocalteu reactive 50% was added. After 5 minutes 40 µL of Na₂CO₃ 20% were added. The total polyphenols content was determined by:

$$\text{Total Polyphenols} = \text{DF} \times \frac{(\text{ABS}_{\text{sample}} - \text{ABS}_{\text{blank}}) - \text{INT}}{\text{SLO}} \quad (1)$$

SLO

Where DF represents a dilution factor (DF=2), ABS sample and ABS blank is the sample or blank absorbance at 765 nm respectively, INT represents the intercept in calibration curve of Gallic acid, and SLO represents the slope in calibration curve of Gallic acid.

The measurements at 765 nm were performed after 45 minutes (BioTek microplate reader EPOCH Instruments, coupled to Gen5 software version 1.11).

The Gallic acid was used as a standard solution (25-200 mg / L). Results were expressed as Gallic acid equivalents (in mg) per gram of propolis (EAG).

2.3. Total Flavonoids determination.

For the analysis of total flavonoids a colorimetric method with AlCl_3 (Yang et al., 2011) was performed with some modifications. 10 mg of propolis were dissolved in 5 ml of methanol (Merck, HPLC grade) and then was diluted 4 times. Then, 50 μL of sample or Quercetin (Sigma) solution was added to each well and then added 50 μL of methanol. Finally, 100 μL of AlCl_3 was added in 10% methanol and then 20 min in dark the sample was read at 435 nm wavelength in microplate reader (BioTek Instruments mod. EPOCH coupled to Gen5 software version 1.11). The total flavonoids content was determined by:

$$\text{Total Flavonoids} = \text{DF} \times \frac{(\text{ABS}_{\text{sample}} - \text{ABS}_{\text{blank}}) - \text{INT}}{\text{SLO}} \quad (2)$$

Where DF represents dilution factor (DF=2), ABS sample and ABS blank is the sample or blank absorbance at 435 nm respectively, INT represents the intercept in calibration curve of Quercetin and SLO represents the slope in calibration curve of Quercetin.

Quercetin solutions were prepared as a reference standard (from 3.125 to 100.000 mg / L). The result was expressed as Quercetin Equivalents (in mg) per gram of propolis (EQ).

2.4. Acquisition of NIR spectra

A NIR reflectance Bruker spectrometer (Opus MPA with v. 6.5.) was used for the collection of NIR reflectance spectra expressed as percentage of reflectance (%R). For the NIR spectra acquisition, 0.5 g of propolis were frozen at -20 ° C pulverized, then 32 scans in a range of wavenumber from 12500 to 3600 cm⁻¹ (800-2780 nm) with resolution of 8 cm⁻¹ were performed for each sample. Duplicate spectra were measured. Spectra were transformed into absorbance using log (1/R) for chemometric analysis.

2.5. Multivariate data analysis

Spectra were pre-treated by mean center (MC) pre-processing. In addition, spectra were transformed by Align and Multiplicative Scatter Correction (MSC) (Geladi et al., 1985).

Align transformation involves aligning the maximum of NIR spectra from the different samples (Infometrix Inc, 1985-2014). This algorithm permits decide which sample in the data set is the calibration sample, that is, to which sample will all other samples be aligned. For this reason, was elected a range mean calibration sample, in both models.

MSC is a standard approach to compensate for scattering by solids in NIR spectrometry.

MC permits to center the data about the mean. This mean was computed for each variable according to:

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_i^n x_{ij} \quad (3)$$

The mean was then subtracted from each data value to produce a mean-centered matrix defined by Eq. (2), where i is the sample and j is the variable.

$$x_{ij(mc)} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad (4)$$

26 samples of propolis (n=2) were utilized for the X matrix (independent variable). The spectral data were divided into two sets: calibration data set (34) and external validation data set (18) for the PLS modelling and validation respectively.

The calibration model was constructed with the PLS algorithm using the NIR spectra as the X matrix and the total Polyphenols and total Flavonoids as the Y vectors. The optimization of the PLS model was performed by cross-validation. The root mean square error of calibration (RMSEC), the root mean square error of cross-validation (RMSECV) and the standard error of prediction (SEP) were used for error analysis in calibration, cross-validation and external prediction respectively (Ragno et al., 2004; Afkhami et al., 2007).

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_c} (y - \hat{y})^2}{n_c - k}} \quad (5)$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{cv}} (y - \hat{y})^2}{n_{cv}}} \quad (6)$$

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_p} (y - \hat{y})^2}{n_p}} \quad (7)$$

Where n_c , n_{cv} and n_p represents the number of samples of calibration, cross validation or external validation and prediction sets respectively; y is the total polyphenols or total flavonoids content determined by reference methods; \hat{y} are the NIR predicted values and k is the optimal number of PLS components used in the model.

Outliers can distort an estimate of the optimal number of factors. The outlier diagnoses for total flavonoids and total polyphenols was performed considering Leverage, Sample Residual and Mahalanobis distance. The outlier diagnosis for PLS was carried out through the cross validation performed, considering the Studentized residual together with Leverage with thresholds based on a 95%. The unusual samples were eliminated, and then the models were reconstructed, being optimized, validated and utilized for all the calculations (Infometrix Inc, 1985-2014).

The detection limits (LOD and LOQ) for multivariate calibrations were determined creating a surrogate signal variable (SSV) in order to create a pseudo-univariate model. (Olivieri et al., 2006; Saurina et al., 2001) The selected SSVs were the model predicted values (Soto et al., 2009).

The optimal wavelength range was selected, according its correlation with dependent variables (correlation spectra) and selecting the main wavelengths coefficient in the PLS model (regression vector).

PLS calculation and validations were performed by pirouette 4.5 software (Infometrix Inc. , Woodinville, WA, USA).

Results

3.1. Total Polyphenols and total Flavonoids content

The contents of polyphenolic compounds in methanolic extract of raw propolis samples ranged from 66.42 to 229.89 μg of gallic acid units per raw propolis mass (mg). Also, the total flavonoids content was found between 12.87 to 69.10 μg of quercetin units per raw propolis mass (mg). Some merit figures of these determinations are shown in Table 7. As much polyphenols as flavonoids content in propolis are in range reported in literature. The used criteria to establish the quality of propolis samples is the ratio of flavonoids / total phenolic content close to 30%. (Kumazawa et al., 2004; Lima et al., 2009; Yang et al., 2011; Ribeiro et al., 2012).

Tabla 7: Merit figures for total polyphenolic and flavonoids content in methanolic extract by high-throughput microplate assay.*

	TOTAL POLYPHENOLS	TOTAL FLAVONOIDS
SLOPE	0.0024	0.0094
INTERCEPT	0.0059	0.0041
r^2	0.9989	0.9999
TYPICAL ERROR	0.0073	0.0038
LOD	11.8 (a)	1.7 (b)
LOQ	33.4 (a)	4.5 (b)

*Mean Center pre-processing selected

(a) The results were expressed in μg gallic acid per mg raw propolis

(b) The results were expressed in μg quercetin per mg raw propolis.

3.2. NIR Spectra

Figure 9 shows the raw NIR spectra of propolis samples between 800 nm and 2780 nm. The 26 (n=2) samples analyzed have similar NIR spectrum.

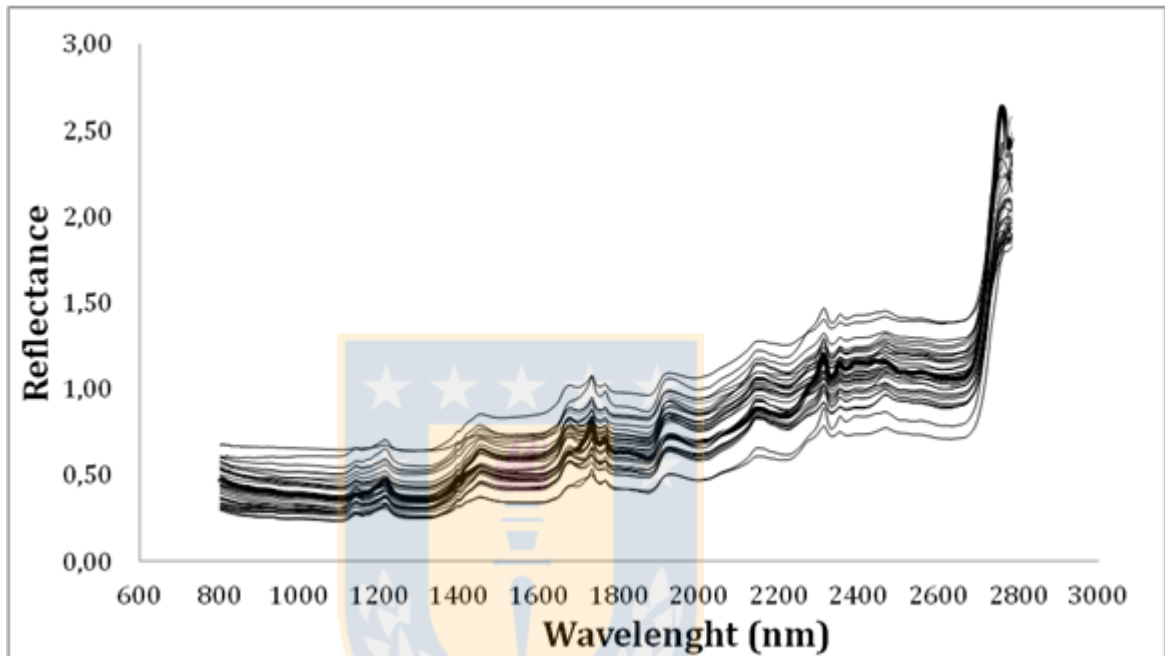


Figura 9: Raw NIR spectra of 26 (n=2) propolis samples between 800 nm and 2780 nm.

3.3. Optimization of PLS in Cross Validation

3.3.1. Pre-processing and Transform data.

The calibration data set consisted of 52 spectra. Table 8 shows the influence of data transformation into the predictive model. Consecutive data transformation Align + MSC decreases the optimal principal components number in flavonoids case, and decrease rmSEV and rmSECV errors in validation process.

Tabla 8: Effect of transform data in predictive model optimization. *			
		ALIGN	ALIGN + MSC
TOTAL	PC NUMBER	3	5
POLYPHENOLS 66.4 to 230.0 µg of gallic acid units (GAU) per raw propolis gram (P)	rmSEC (µg of GAU/g P)	18.12	6.07
	r ² Cal	0.86	0.99
	rmSECV (µg of GAU/g P)	22.55	20.32
	r ² Val	0.75	0.80
	SEP (µg of GAU/g P)	17.09	5.50
TOTAL	PC NUMBER	5	4
FLAVONOIDS 13.0 to 69.1 µg of quercetin units (QU) per raw propolis gram (P)	rmSEC (µg of QU/g P)	5.04	3.36
	r ² Cal	0.87	0.94
	rmSECV (µg of QU/g P)	3.62	2.43
	r ² Val	0.94	0.97
	SEP (µg of QU/g P)	3.31	2.70
*Mean Center pre-processing, Cross Validation Leave Out = 1			

Calibration set contained 34 samples, from which the rmSEC and rmSECV errors with their respective correlation coefficients were obtained. Prediction set contained 18 samples and SEP value was calculated from these set.

3.3.2. Outlier identification

Table 9 shows outliers identified and excluded from calibration set. For total polyphenols was observed that excluding two outliers does not improve significantly the optimized model in the previous stage. With four outliers excluded improves the correlation coefficient (0.877 - 0.963) but increases the optimal number of factors. The exclusion of one or three outliers in total

flavonoids did not improve significantly the predictive model. Thus, outlier exclusion not improves this optimization in cross validation.

Tabla 9: Effect of outlier exclusion in predictive model optimization.**			
TOTAL POLYPHENOLS 66.4 to 230.0 µg of gallic acid units (GAU) per raw propolis gram (P)	OUTLIER EXCLUDE	2 OUT	4 OUT
	PC NUMBER	5	4
	rmSEC (µg of GAU/g P)	4.8	3.8
	PRESS cal	949	563
	r2 cal	0.980	0.978
	rmSECV * (µg of GAU/g P)	15.1	5.3
	PRESS val	10904	1216
	r ² val	0.766	0.954
TOTAL FLAVONOIDS 13.0 to 69.1 µg of quercetin units (QU) per raw propolis gram (P)	OUTLIER EXCLUDE	1 OUT	3 OUT
	PC NUMBER	4	3
	rmSEC (µg of QU/g P)	2.4	2.3
	PRESS cal	250	216
	r2 cal	0.960	0.937
	rmSECV * (µg of QU/g P)	2.8	2.6
	PRESS val	402	302
	r ² val	0.937	0.912
* Cross Validation Leave Out = 1.			
**Mean Center pre-processing. Align + MSC transform.			

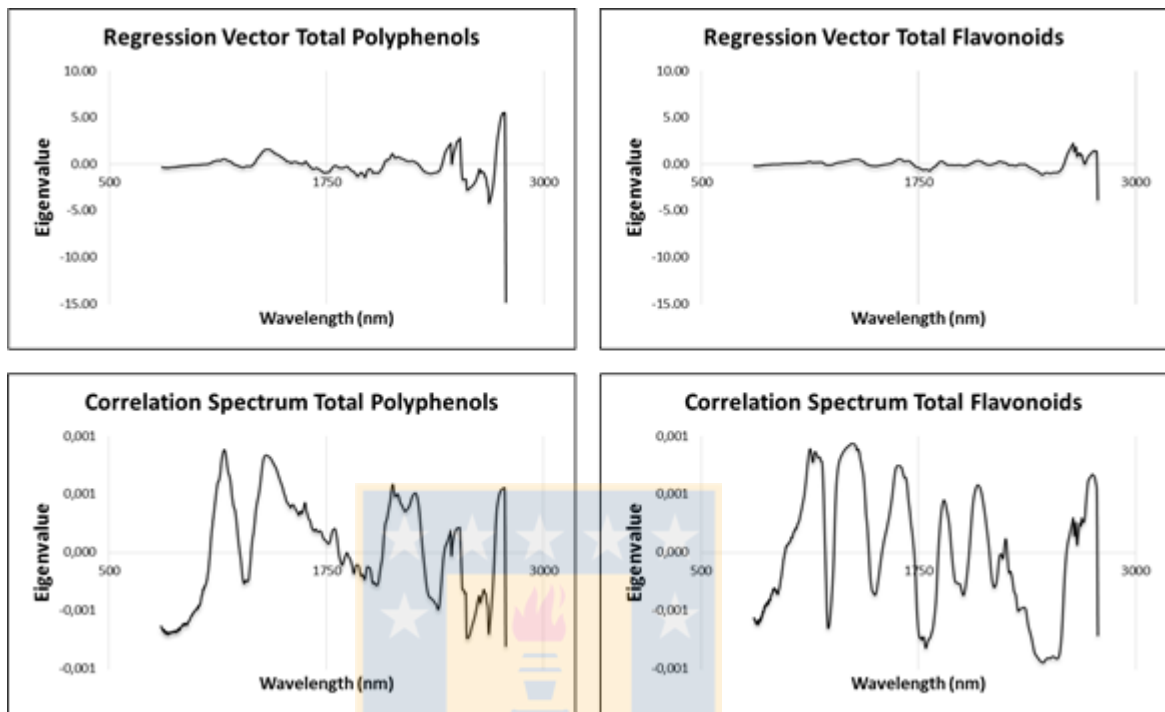


Figura 10: Regression Vector and Correlation Spectrum for Total Polyphenols and Total Flavonoids in External Validation between 800-2780 nm wavelengths

3.4. External validation.

3.4.1 Optimization of NIR spectral data

Figure 10 shows the Regression Vector and Correlation Spectrum from the PLS analysis obtained as from external validation with two principal components selected for both analysis. They was utilized to select the spectral zone that most contribute to increase the predict ability of the model. Figure 11 represents the reference sample utilized as reference to Align transformation. The gray zones in the NIR spectrum are the wavelength range that most contributes to predictive model according to regression vector and correlation spectrum. Figure 11.a) shows the area between 800-1480 nm provides higher predictive power of

correlation spectrum total polyphenols. Moreover, the area between 1880-2700 nm (Figure 11.b) is the one that more contributes to regression vector. These two zones were selected to study if the predictive ability of total polyphenols model is improved. The results are shown in Table 5.4. The optimized NIR spectrum with two outliers excluded was the most suitable total polyphenols model.

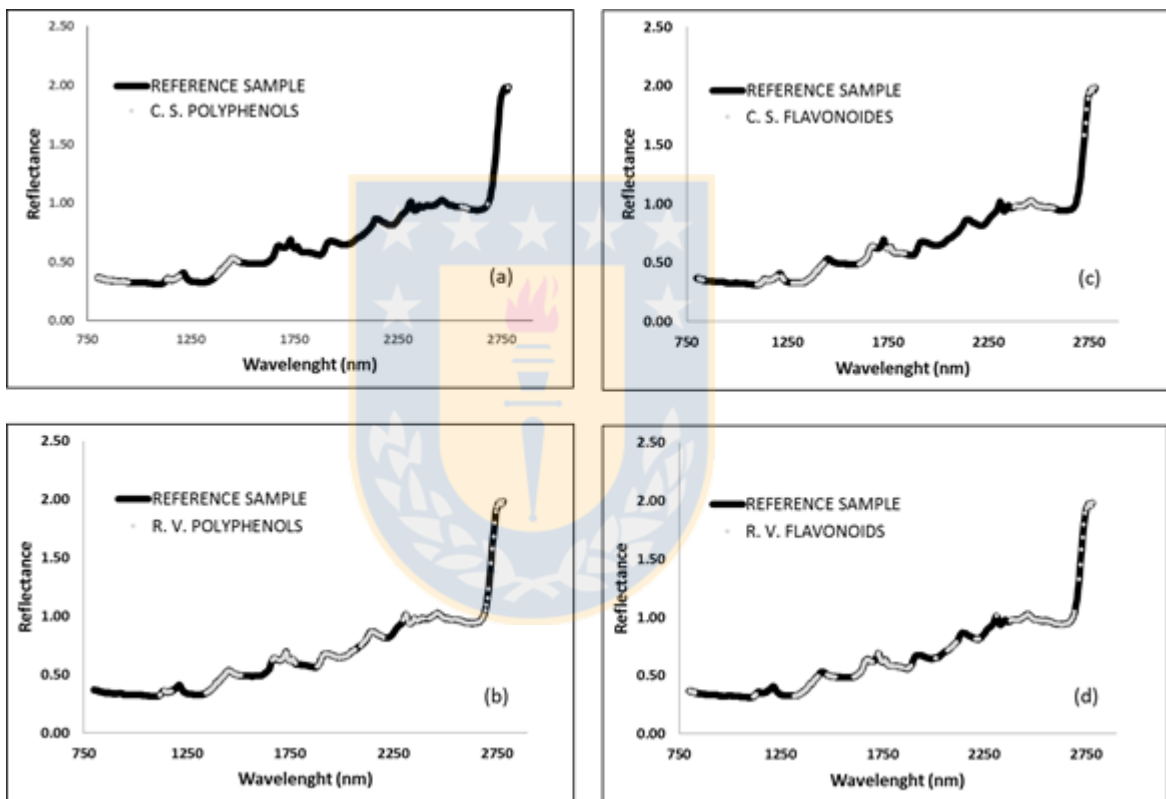


Figura 11: NIR spectrum of Reference Sample used in align transform. It shows clearer the spectral zone that most contributes in predictive power obtained from the scan of: (a) Correlation Spectrum Total Polyphenols, (b) Regression Vector Total Polyphenols, (c) Correlation Spectrum Total Flavonoids, (d) Regression Vector Total Flavonoids.

Tabla 10: Impact of wavelength selected in External Validation by Total Polyphenols				
	Total NIR spectral zone (a)	Optimized NIR spectral zone (b)		
OUTLIER EXCLUDE	NO	SI (n=2)	NO	SI (n=2)
PRINC COMP N°	2	2	2	2
SEP ((µg of GAU/g P)	12.51	10.76	7.40	7.23
SLOPE	0.85	0.97	0.95	0.86
INTERCEPT	18.95	-0.33	9.09	24.7
r ²	0.82	0.86	0.90	0.91
(a) Wavelength selected 800-2780 nm				
(b) Wavelength selected 800-1480 nm and 1880-2700 nm				

For total flavonoids there are three areas that provide the highest predictive power of correlation spectrum (Figure 11.c): one zone between 1100-1435 nm, a second zone between 1600 y 1840 nm and a third zone between 2380-2580 nm. However, for the regression vector predictive ability is not possible to establish an area that is clearly distinguished from other, being area between 1120-2700 nm (Figure 11.d) that more contributes to regression vector. Therefore, zone between 1100-2580 nm was selected to assay if improves the predictive power of total flavonoids model. The results are shown in table 11. The optimized NIR spectrum with two outliers excluded was the most suitable total flavonoids model.

Tabla 11: Impact of wavelength selected in External Validation by Total Flavonoids				
	Total NIR spectral zone (a)	SI (n=2)	Optimized NIR spectral zone (b)	SI (n=2)
OUTLIER EXCLUDE	NO	SI (n=2)	NO	SI (n=2)
PRINC COMP N°	2.00	3.00	2.00	3.00
SEP (µg of QU/g P)	3.29	2.72	2.43	1.48
SLOPE	1.13	1.04	0.97	0.98
INTERCEPT	-6.89	-2.42	1.21	0.95
r ²	0.87	0.88	0.88	0.95
(a) Wavelength selected 800-2780 nm				
(b) Wavelength selected 1100-2580 nm				

3.4.2. LOD and LOQ estimation for predictive models

Table 12 shows the LOD and LOQ for multivariate calibration using a surrogate signal variable (SSV) corresponding to the estimation value of the predictive model. The results show a good performance considering the sample ranges: Polyphenols 66.42 to 229.89 µg of gallic acid units per raw propolis mass (mg) and Flavonoids 12.87 to 69.10 µg of quercetin units per raw propolis mass (mg).

Tabla 12: LOD and LOQ estimations for POLYPHENOLS and FLAVONOIDS		
PREDICTIVE MODEL	POLYPHENOLS	FLAVONOIDS
SLOPE	0.98	0.97
INTERCEPT	2.90	1.20
r^2	0.984	0.974
TYPICAL ERROR	4.65	1.74
LOD * (mg GAU OR QU/propolis gram)	17.1	6.6
LOQ * (mg mg GAU OR QU/propolis gram)	50.2	19.1
* LOD and LOQ were determined creating a surrogate signal variable (SSV) (Soto et al., 2009)		

Discussion

The results obtained from the analyses of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method and colorimetric $AlCl_3$ method adapted to microplate are found in similar concentration ranges described in the literature.

In both cases the optimized NIR spectrum method was the most suitable for external validation of predictive model.

Figure 12 shows experimental and predicted values by PLS external validation for total polyphenols and total flavonoids. The results show that Align transformation and MSC transformation to solid propolis samples give high predictive ability in both models.

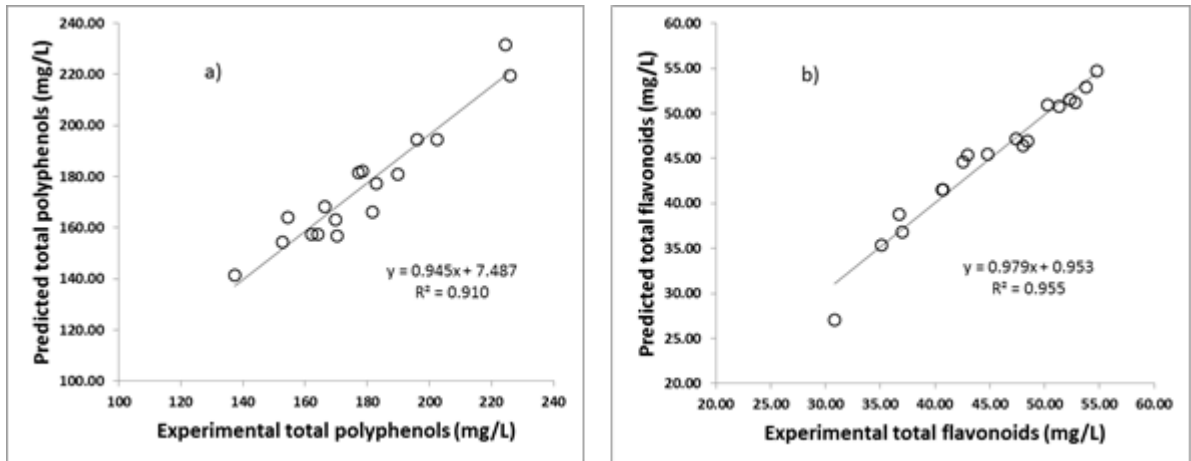


Figura 12: Experimental and predicted values for the optimized NIR spectrum zone to external validation in PLS analysis: a) Total polyphenols concentration, b) Total flavonoids concentration.

The NIR methodology developed in this study is a low cost and very fast method to determine concentrations of both polyphenols and flavonoids in propolis. Moreover, this type of NIR methods can be automatized or implemented for in situ determinations. The polyphenols and flavonoids ratio can be used to discriminate between different propolis samples as quality parameter of the raw samples.

Acknowledgments

The financial support for this work was granted by INNOVA (Grant 11-CH S2.980 F11), FONDECYT (Grants 1131101, 11110442 and 115904), Red Doctoral REDOC.CTA, MINEDUC project UCO1202 at U. de Concepción.

REFERENCES

- ABU FARES, R; NAZER, I; DARWISH R; ABU ZARQA M; (2008) Honey Bee Hive Modification for Propolis Collection. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(2): 138-147
- AFKHAMI, A; SARLAK, N; ZAREI, A (2007) Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of cyanide and thiocyanate using the partial least squares (PLS) regression. *Talanta*, 71: 893-897.
- BANKOVA V. (2005) Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal Ethnopharmacology*, 100: 114-117.
- BANKOVA, V; M. POPOVA; TRUSHEVA, B (2014) Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal* 8:28
- BANSKOTA, A; TEZUKA, Y; KADOTA S (2001) Recent Progress in Pharmacological Research of *Propolis*. *Phytotherapy Research*, 15: 561-571.
- INFOMETRIX, INC. (1985-2014) Pirouette Multivariate Data Analysis Software ver 4.5. <http://www.infometrix.com>
- BURDOCK, G. (1998) Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363.
- CASTALDO, S; CAPASSO, F (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73(1): S1-S6.

CHENG, H; QIN, Z; GUO, X; HU, X; WU, J (2013) Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*, 51(2): 813-822

COZZOLINO, D; CORBELLA, E (2003) Determination of honey quality components by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Apicultural Research*. 42 (1-2): 16 – 20

CUESTA-RUBIO, O; PICCINELLI, A; CAMPO, M; MARQUEZ, I; ROSADO, A; RASTRELLI L (2007) Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(18): 7502-7509.

DOBROWOLSKI J; VOHORA S; SHARMA K; SHAH S; NAQVI S; DANDIYA P (1991) Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacology* 35(1):77-82.

ESCUREDO, O; SEIJO, M C; SALVADOR, J; GONZÁLEZ-MARTÍN M (2013) Near infrared spectroscopy for prediction of antioxidant compounds in the honey. *Food Chemistry* 141: 3409–3414

FULIANG, H; HEPBURNB, H R; XUAN H; CHEN, M; DAYA, S; RADLOFF, S (2005) Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacological Research*, 51: 147–152

GELADI, P; MACDOUGALL, D; MARTENS, H (1985) Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Appl. Spectros.*, 39(3): 491-500

GÓMEZ-CARAVACA, A.M., GÓMEZ-ROMERO, M., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTÉRREZ, A., (2006) Advances in

the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1220–1234

HERALD, T; GADGIL, P; TILLEY, M (2012) High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *J Sci Food Agric* 92: 2326–2331

IGNAT, I; VOLF, I; POPA, V (2011) A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126: 1821–1835

KUJUMGIEV, A; TSVETKOVA, I; SERKEDJIEVA, Y; BANKOVA, V; CHRISTOV, R; POPOV, S (1999) Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64 (3): 235–240. Doi:10.1016/S0378-8741(98)00131-7. KUMAZAWA, S; HAMASAKA, L; NAKAYAMA, T (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84(3): 329-339.

LIMA, B; TAPIA, A; LUNA, L; FABANI, M; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G; PODIO, N; WUNDERLIN, D; FERESIN, G (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.* 2009 57: 2691–2698

LOTTI, C; CAMPO FERNANDEZ, M; PICCINELLI, A L; CUESTA-RUBIO, O; MARQUEZ, I; RASTRELLI, L (2010) Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 58(4): 2209-2213

MARCUCCI, M (1995) Propolis: Chemicals composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26: 83-99.

MARKHAM, K; MITCHELL, K; WILKINS, A; DALDY, J; LU, Y (1996) HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42 (1) : 205-211

MASSARO, C; KATOULI M; GRKOVIC T; VUB, H; QUINN, R F; HEARD T A; CARVALHO, C; MANLEY-HARRIS, M; WALLACE; H M; BROOKS, P (2014) Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). *Fitoterapia* 95: 247-257

MATSUI, T.; EBUCHI, S; FUJISE, T; ABESUNDARA, K; (2004) Strong Antihyperglycemic Effects of Water-Soluble Fraction of Brazilian Propolis and Its Bioactive Constituent, 3,4,5-Tri-O-caffeoylquinic acid. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(11): 1797—1803

MEDIC-SARIC M; RASTIJA, V; BOJIK, M; MALES, Z (2009). From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutrition Journal*, 8: 33.

OLIVIERI, A; FABER, N; FERRÉ, J; BOQUÉ, R; KALIVAS, J; MARK, H. (2006) Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 78(3): 633–661

OMENE, C; KALAC, M; WU, J; MARCHI, E; FRENKEL, K; O'CONNOR, O. (2014) Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action. *J Cancer Sci Ther.* 5(10): 334–342

PELLATI, F; ORLANDINI, G; PINNETI, 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.

RAGNO, G; IOELE, G; RISOLI, A (2004) Multivariate calibration techniques applied to the spectrophotometric analysis of one-to-four component systems. *Anal. Chim. Acta*, 512: 173-180.

RIBEIRO, I; CADORIN, T; DE ALENCAR, S; ROSALEN, P; IKEGAKI, M. (2012) The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 48, (3) jul./sep.,

SAURINA, J; LEAL, C; COMPANO, R; GRANADOS, M; PRAT, M; TAULER, R. (2001) Estimation of figures of merit using univariate statistics for quantitative second-order multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta* 432: 241–251

SALES, A; ALVAREZ, A; RODRIGUEZ AREAL M; MALDONADO, L; MARCHISIO, P; RODRÍGUEZ, M; BEDASCARRASBURE, E (2006) The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-visS. *J Hazard Mater.* 137(3):1352-1356.

SINGLETON, V L; ROSSI, J A (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16(3): 144-

SOTO, C; CONTRERAS, D; TORAL, M; BASAEZ, L; FREER J. (2009) Simultaneous determination of Dibucaine and Chlorphenamine maleate using different mathematical spectrophotometric approaches. *J. Chil. Chem. Soc.* 54: 113.

VIUDA-MARTOS; M; RUIZ-NAVAJAS O; FERNANDEZ-LOPEZ, J; PEREZ-ALVAREZ, J (2008) Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science*, 73(9): 117-124.

XU, L; YAN, S; CAI, C; YU, X (2013) Untargeted detection and quantitative analysis of poplar balata (PB) in Chinese propolis by FT-NIR spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*, 141(4): 4132-4137

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



CAPÍTULO 6

A new near infrared method for simultaneous determination of Caffeic acid phenethyl ester and antioxidant activity of propolis.

Yovani Venegas ^{1,3}, Carlos Peña ¹, Edgar Pastene ¹ and David Contreras ^{2,3*}

¹Facultad de Farmacia, ²Facultad de Cs. Químicas, ³Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Chile.

Summary

The problematic of standardization of propolis is a complex issue that has been approached by different researchers based on the elucidation of their chemical composition and its correlation with their biological activity. Due to variability of the matrix and the particular characteristics of the various types of propolis, this work is complex, time consuming, it requires the availability of several analytical techniques and generally leaves out the interactions between

the different compounds that constitute the matrix. A complete analysis of the matrix together with the selective determination of some compounds with relevant biological activity could establish a quality parameter of the samples that helped us to develop a control system that facilitates their standardization. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is a derivative of caffeic acid that has been extensively studied because it has various types of biological activity beneficial to human health. In addition, it is present in different proportions in all the samples studied. In this work, a new method based on near-infrared spectroscopy (NIR) to estimate equivalents of CAPE in propolis samples is proposed. Simultaneously, a new method for estimating antioxidant activity expressed as EC₅₀ is also presented. A multivariate partial least squares method (PLS) was used for calibration. These models were previously calibrated by measuring the content of CAPE by HPLC-EC, and antioxidant activity by UV-Vis spectroscopy with the high performance microplate reader method. PLS models were studied by cross-validation and external validation. The NIR methods developed proved to be a non-destructive, simple, fast and inexpensive to use. This study model can be used as a quality parameter of in situ raw propolis samples, without any pre-processing and contributes to solve the problematic of standardization of propolis.

Keywords: Propolis, NIR, PLS, CAPE, EC₅₀

Resumen

La problemática de la estandarización del propóleo es un tema complejo que ha sido abordado por diferentes investigadores mediante la elucidación de su composición química y la correlación de esta con su actividad biológica. Dada la variabilidad de la matriz y las características particulares de los distintos tipos de propóleo que se han investigado esta labor resulta compleja, demanda

mucho tiempo, requiere la disponibilidad de varias técnicas analíticas y generalmente deja de lado las interacciones entre los diferentes compuestos que constituyen la matriz. El análisis completo de la matriz en conjunto con la determinación selectiva de algunos compuestos con actividad biológica relevante permitiría establecer un parámetro de calidad de las muestras que nos ayude a desarrollar un sistema de control que facilite su estandarización. Entre estos compuestos relevantes se destaca un derivado del ácido cafeico (caffeic acid phenethyl ester, CAPE) que ha demostrado poseer algunos tipos de actividad biológica y se encuentra presente en la totalidad de las muestras estudiadas. En este trabajo, se propone un método de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) para la estimación de equivalentes de CAPE en muestras de propóleo. Simultáneamente, se presenta un método para la estimación de la actividad antioxidante expresado como EC_{50} . Para la calibración se utilizó un método multivariado de mínimos cuadrados parciales (PLS). Estos modelos fueron previamente calibrados midiendo el contenido de CAPE por HPLC-EC y la actividad antioxidante por espectroscopia UV-Vis con el método de microplaca de alto rendimiento. Los modelos PLS fueron estudiados mediante validación cruzada y validación externa. Los métodos NIR desarrollados resultaron ser un método no destructivo, simple de usar y de bajo costo. Este modelo de estudio se puede utilizar como un parámetro de calidad de muestras de propóleos crudas, in-situ, sin ningún pre-procesamiento y contribuye en resolver la problemática de la normalización de los propóleos.

Palabras Clave: Propóleo, NIR, PLS, CAPE, EC_{50}

Introduction

Propolis is a natural product elaborated by the species *Apis mellifera* and recognized by a large number of beneficial properties for human health. After honey, propolis is the second product in quantity fabricated by the bees and its principal function is maintaining sanitation of the hive. Propolis is synthesized from resins obtained from trees and plants collected by *A. mellifera* within an approximate radius of 5 km around the hive. These resins are mixed with beeswax and salivary enzymes from *A. mellifera*. Therefore, propolis is formed from the available vegetation in the bee flight radius and its chemical composition and organoleptic characteristics will depend on the flora and phenology of recollection place. (Marcucci, 1995; Bankova, 2005).

The problematic of the standardization of propolis is a complex issue. Many researchers have conducted investigations upon their chemical composition and the correlation with its biological activity (Bankova, 2005; Medic-Saric et al., 2009). Because of the matrix variability and particular features associated with the different types of propolis, this approach is complex and demands too much time. Also, its analysis requires the availability of several techniques and generally leaves aside interactions between compounds that constitute propolis. Moreover, it has been observed that samples from different geographic and climatic zones show similar biological activity against some microorganisms in spite of a different chemical composition (Markham et al., 1996; Kujumgiev et al., 1999; Bankova, 2005). This suggests that *A. mellifera* is able to synthesize propolis in any condition, just depending on the available vegetation in the collection place.

Until recently, the chemical composition of Chilean propolis remained unknown. It was not known if among its components there were some beneficial properties for the human body. On the other hand it was unclear whether some characteristic chemical marker from Chilean propolis existed. Early studies on

propolis reported the presence of some flavonoids such as pinocembrin, chrysin and galangin in samples from the Chilean Los Ríos Region; and lignans (Valcic et al, 1998), pinocembrin, acacetin, galangin, izalpin, cinnamic acid were identified from Central Chile. It was not known if among its components there were some beneficial properties (Munoz et al, 2001). From the locality of San Vicente de Tagua Tagua, galangin, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) (Russo et al, 2004) were reported. In samples from Central Chile, the presence of caffeic acid, CAPE, ferulic acid, galangin, genistein, kaempferol, pinocembrin, quercetin and vainillina, among other compounds, (Castro et al, 2014) was recently reported. Currently we know that Chilean propolis collected from central south zone contains high levels of polyphenols, flavonoids type principally, and its bioactivity is associated to antioxidant and immunostimulant capacity.

There are several reports that validate the biological activity of propolis as an antiseptic, antifungal, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, immunomodulator, hepatoprotective, anti-diabetic, anti-tumor and antioxidant agent (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Banskota et al., 2001; Castaldo & Capasso, 2002; Kumazawa et al., 2004; Matsui et al., 2004; Fuliang et al., 2005; Viuda-Martos et al., 2008; Omene et al., 2014). Due its importance and abundance in propolis, the main studied compounds have corresponded to polyphenols like flavonoids and phenolic acids and their esters.

Among this last type of phenolic compounds, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) has been syndicated as one of the most active isolated from propolis. This compound has been studied for its immunomodulatory and antitumor properties (Omene et al, 2012; Chi-Fung Chan et al, 2013). Currently, interest in CAPE has increased as a prospective raw material for the pharmaceutical industry due to its reported properties as anti-inflammatory, immunomodulatory, antiproliferative and antioxidant (Rossi et al, 2002; Russo et al, 2002). For all

these antecedents, CAPE content in raw propolis and related products may be used as criterion to assess the quality of a sample.

A series of analytical methods have been used for chemical characterization of propolis. The most used is HPLC coupled with UV, DAD or MS detectors, especially for characterizing phenolic compounds (Cuesta-Rubio et al., 2007; Pellati et al., 2011). Liquid chromatography coupled to direct amperometric electrochemical detection (HPLC-EC) is a method useful to detect compounds in very low concentrations. This detector has proved to be more sensitive and selective than others modes of detection, simplifying both sample preparation and data interpretation. This detector is especially helpful in the analysis of compounds with antioxidant activity because the oxidation-reduction potential can be correlated with the antioxidant capacity. (Skrinjar W. et al., 2007; Cao W et al., 2011). Given that detector response is not-dependent on the optical path length or sample turbidity, its signal has low noise (Blasco A. et al, 2007). However, these techniques often are time demanding as they have high operating costs. The near infrared spectroscopy (NIR) is a fast, easy and non-destructive method that can record spectra from solid and liquid samples with no pretreatment. One of the main advantages is that it implies a low operation cost and provides spectra in a quick way, being able to predict physical and chemical parameters from a single spectrum. The analytical information contained in the typically broad, extensively overlapped bands of NIR spectra is hardly selective and influenced by a number of physical, chemical and structural variables. In addition, differences between samples may cause very slight spectral differences which are difficult to distinguish with the naked eye (Blanco and Villarroya, 2002). As the NIR instruments currently available quickly provides vast amounts of data that require speedy and efficient processing, NIR spectroscopy requires chemometrics to extract as much relevant information as possible from the analytical data. Both techniques are closely related, and may be useful to detect adulterants (Cozzolino and Corbella, 2003) or to trace the

origin of raw materials (Cheng et al., 2013). Therefore, its use in beekeeping industry as a quality control tool provides several possibilities to assess the problem of standardization of propolis (Escudero et al., 2013; Xu et al., 2013).

In this study we developed a new method for the simultaneous evaluation of CAPE content and antioxidant activity in propolis by NIR spectroscopy with calibration by Partial Least Squares (PLS). This method is cheaper and faster than chromatographic methods and it is available to be implemented in field applications.

Materials and Methods

2.1. Propolis samples

In the present study 26 samples ($n = 2$) of propolis from different geographic areas of the Biobío and Araucanía Regions, Chile (36'20 N; 39'32 S; 71'26 E; 73'32 W) were analyzed. Samples were obtained by mesh collection method (Sales et al., 2006; Abu Fares et al., 2008). After analysis, samples were stored at 4 °C in dark containers.

2.2. Reference Methods

2.2.1. CAPE equivalents determination in propolis samples

Analyses of CAPE equivalents in propolis samples were performed by HPLC with amperometric electrochemical detector (HPLC-EC). The chromatographic system consisted of a quaternary pump Hitachi Elite LaChrom L-2130 and an electrochemical detector CC-5E BASJ. An HPLC Supelcosil ABZ + PLUS column, length 25 cm, 4.6 mm internal diameter and 5 μ m particle size was used for the separation at a flow rate of 1.0 mL/min. The separation was performed by

means of a linear gradient elution: eluent A, acetonitrile / trifluoroacetic acid 0.05%; eluent B, water / trifluoroacetic acid 0.05% (Merck, HPLC grade). The gradient was as follows: 0 min 25% B; 3 min 32% B; 10 min 42% B; 20 min 51% B; 25 min 57% B; 30 min 25% B. The electrochemical detector was operated at 900 mV in oxidative mode (Cao W. et al, 2011) and 30 min was the chromatographic run time. For the analysis of CAPE equivalents, 10 mg of propolis were dissolved in 5 ml of methanol (Merck, HPLC grade) then was diluted 4 times, filtered (0.45 μm) and injected using the 20 μL loop of the HPLC system. The calibration curve was obtained by dissolving 2 mg of an authentic standard of CAPE (Sigma) in 2mL methanol. Calibration curves were prepared by dilution in the range of 6.25–100.00 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.2. Estimation of antioxidant capacity by High-throughput DPPH Assay.

In order to set a quality parameter of propolis samples the free radical scavenging activity by DPPH assay was used as estimate of antioxidant capacity. A modification of the 96-well plate assays described by Herald (Herald et al., 2012; Yang et al, 2011) was used. DPPH solution (150 $\mu\text{mol/L}$, Sigma) was prepared in methanol daily, and 200 μL of this solution was added to all wells except the blank test wells. Sample, control or standard solutions (25 μL) were added. The solutions were mixed and the absorption at 517 nm was determined immediately after shaking. The absorbance of each plate was continuously read during 30 min using a EPOCH microplate reader (BioTek Instruments). Data were processed with Gen5 software version 1.11.

For each propolis sample, different concentrations ranging from 3.52 to 225.00 mg/L were prepared in methanol. All determinations were performed in duplicates.

The percentage scavenging effect was calculated as:

$$\text{Scavenging rate} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

Where A_0 is the absorbance of the control (without sample) and A_1 is the absorbance in the presence of the sample, and A_2 is the absorbance of sample without DPPH radical. The free radical scavenging ability of the samples was expressed as EC_{50} value, which is the effective concentration at which 50% of DPPH radicals were scavenged. The EC_{50} values were calculated from the area under the curve of scavenging activities (%) versus the logarithm of concentrations of respective sample.

Also, we calculated $TEAC_{50}$ index (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity obtained from EC_{50} values) for each propolis sample and were expressed in mmol of Trolox equivalents per mass (in grams) of raw propolis. The TEAC values were determined by means of a standard curve prepared with Trolox (Sigma). AUC values of six Trolox solutions of different concentrations within the linear range of 2.81-50.00 μM were determined (Figure 13). The AUC values (y) were graphed against the Trolox concentrations (x), and was obtained a linear regression equation it was used to interpolate TEAC as from to EC_{50} values ($TEAC_{50}$ index)

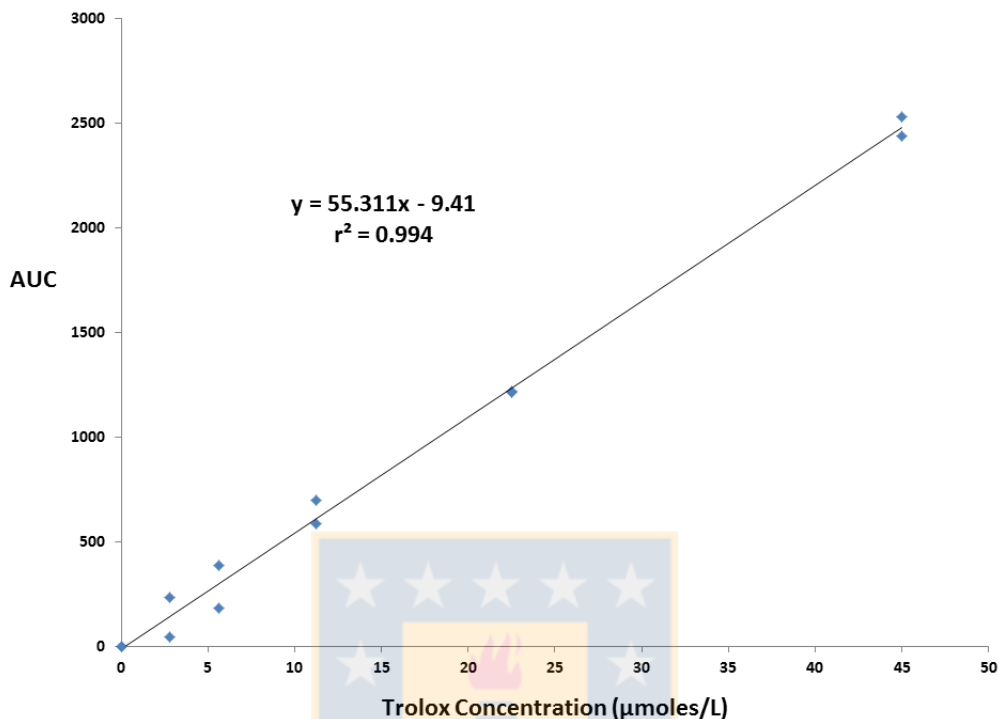


Figura 13: Area under curve (AUC) for DPPH scavenging versus trolox concentration (2.81-50.00 µM) for TEAC determination.

2.3. Acquisition of NIR spectra and HPLC-EC chromatograms.

A NIR reflectance Bruker spectrometer (Opus MPA with v. 6.5.) was used for the collection of NIR reflectance spectra expressed as percentage of reflectance (%R). For the NIR spectra acquisition, 0.5 g of propolis were frozen at -20 ° C pulverized. Then, 32 scans in a range of wavenumber from 12500 to 3600 cm⁻¹ (800-2780 nm) with resolution of 8 cm⁻¹ were performed for each sample. Spectra were measured in duplicate. Spectra were transformed into absorbance using log (1/R) for chemometric analysis.

An HPLC chromatograph (Hitachi LaChrom Elite) coupled to an amperometric electrochemical detector (CC-5E BASJ) to obtain the

chromatograms was used. For electrochemical detection, a glassy carbon rod was the working electrode with an Ag/AgCl reference electrode and a stainless steel tube as auxiliary electrode was used in flow cell. The electrochemical detector was operated at 900 mV in oxidative mode and 30 min was the chromatographic run time. The chromatographic conditions used were described in CAPE equivalents determination.

2.4. Multivariate data analysis

Spectra were pre-treated by mean center (MC) and autoscale (AS) pre-processing. In addition, signal filtering in some models, orthogonal signal correction (OSC) and calibration was applied to enhance predictive power (Wold et al, 1998). Furthermore, spectra were transformed by Align and Multiplicative Scatter Correction (MSC) (Geladi et al., 1985).

Align transformation involves aligning the maximum of NIR spectra from the different samples (Infometrix Inc, 1985-2014). First (FD) derivate transformations (Savitzky & Golay, 1964) were used to optimize the predictive model.

MC permits to center the data about the mean. This mean was computed for each variable according to:

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_i^n x_{ij} \quad (2)$$

The mean was then subtracted from each data value to produce a mean-centered matrix defined by Eq. (2), where i is the sample and j is the variable.

$$x_{ij(mc)} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad (3)$$

AS, is a preprocessing technique that apply a mean-centering followed by variance scaling on the data. Autoscaling of the data was calculated according to the following equation:

$$x_{ij(as)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad (4)$$

Where S_j is the variance for the variable j .

MSC is a standard approach to compensate for scattering by solids in NIR spectrometry.

FD is based on a Savitzky – Golay polynomial filter. This method applies a convolution to independent variables in a window containing a center data point and n points on either side. A weighted second-order polynomial is fit to these $2n + 1$ points and the center point is replaced by the fitted value.

OSC was used to remove one component at a time from X using the non-linear iterative partial least squares (NIPALS) algorithm. This has the advantage that the approach will cope also with moderate amounts of missing data as PCA and PLS.

Twenty six samples of raw propolis ($n=2$) were utilized for the X matrix (independent variable). The spectral data were divided into two sets: calibration data set (34) and external validation data set (18) for the PLS modeling and validation respectively.

The calibration model was constructed with the PLS algorithm using the NIR spectra as the X matrix and the CAPE equivalents and EC_{50} estimation as the Y vectors. The optimization of the PLS model was performed by cross-validation. The root mean square error of calibration (RMSEC), the root mean square error of cross- validation (RMSECV) and the standard error of prediction (SEP) were

used for error analysis in calibration, cross-validation and external prediction respectively (Ragno et al., 2004; Afkhami et al., 2007).

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_c} (y - \hat{y})^2}{n_c - k}} \quad (5)$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{cv}} (y - \hat{y})^2}{n_{cv}}} \quad (6)$$

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_p} (y - \hat{y})^2}{n_p}} \quad (7)$$

Where n_c , n_{cv} and n_p represent the number of samples of calibration, cross validation or external validation and prediction sets respectively; y is the CAPE equivalents content or EC_{50} estimation determined by reference methods; \hat{y} is the NIR predicted values and k is the optimal number of PLS components used in the model.

Outliers can distort an estimate of the optimal number of factors. The outlier diagnoses for CAPE equivalents content and EC_{50} estimation were performed considering Leverage, Sample Residual and Mahalanobis distance. The outlier diagnosis for PLS was carried out through the cross validation performed, considering the Studentized residual together with Leverage with thresholds based on a 95%. The unusual samples were eliminated, and then the models were reconstructed, being optimized, validated and utilized for all the calculations (Infometrix Inc, 1985-2014).

The detection limits (LOD and LOQ) for multivariate calibrations were determined creating a surrogate signal variable (SSV) in order to create a pseudo-univariate model. (Olivieri et al., 2006; Saurina et al., 2001) The selected SSVs corresponded to the model predicted values (Soto et al., 2009).

Regression vector was used to estimate which variables of X matrix are major contributors to predictive model. Furthermore, it was utilized to select wavelength or retention time optimal intervals, as from absolute value of regression vector and allowed select the zone from highest predictive power. The absolute value of this vector was ordered from largest to smallest, and the X matrix zones that most contribute to predictive power of the model were selected.

PLS calculation and validations were performed by Pirouette 4.5 software (Infometrix Inc. , Woodinville, WA, USA).



Results

3.1. Determination of CAPE equivalents in propolis samples.

Figure 14 a) shows a representative chromatogram obtained from the analysis of CAPE equivalents, and Figure 14 b) after the addition of a known concentration of quercetin (Sigma) kaempferol (Sigma) and CAPE (Sigma). The contents of CAPE equivalents in methanolic extract of raw propolis samples ranged from 5.78 to 52.87 mg of CAPE equivalents per raw propolis mass (g). Table 13 shows some merit figures obtained for the determination of CAPE equivalents in methanolic extract of raw propolis.

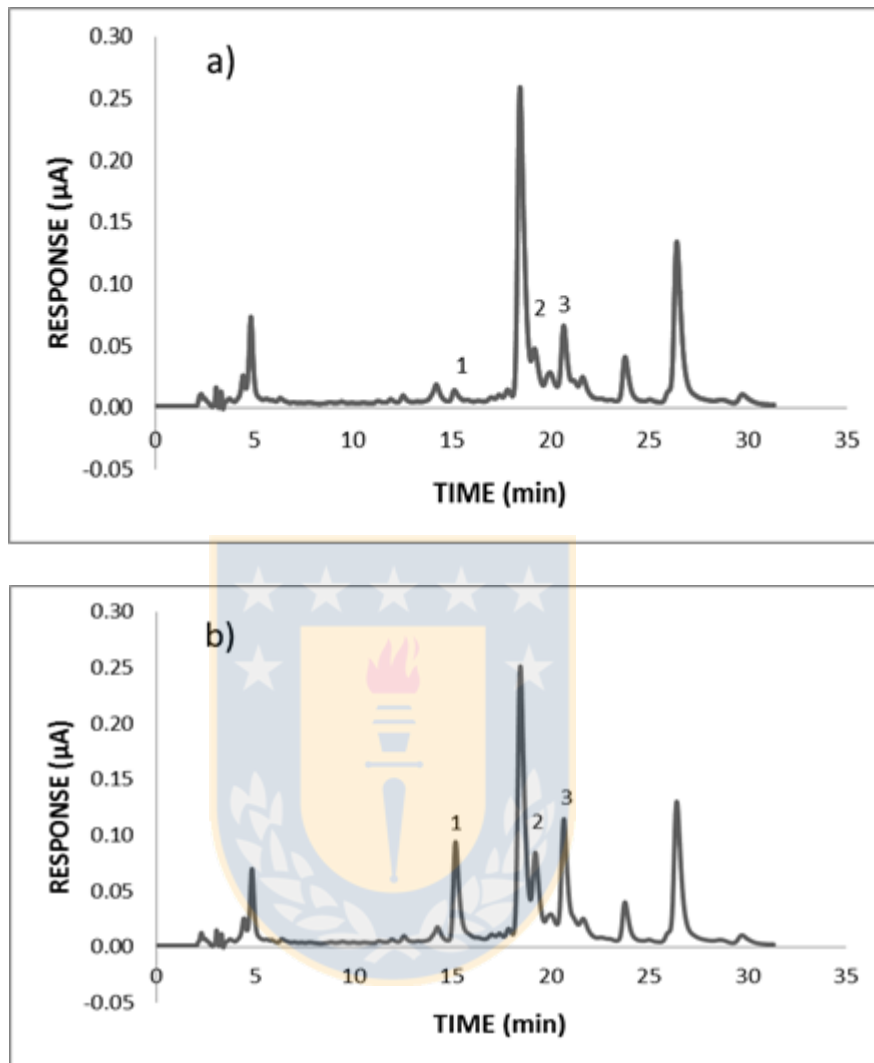


Figura 14: Chromatograms obtained from propolis extracts: a) Control Sample
 b) Spiked with Quercetin (1), Kaempferol (2) and CAPE (3).

Tabla 13: Merit figures for CAPE equivalents by HPLC-EC in

methanolic extract of raw propolis	
SLOPE	0.0966
INTERCEPT	-0.0246
r²	0.9995
TYPICAL ERROR	0.0869
LOD (a)	2.4
LOQ (a)	8.7
(a) The results were expressed in mg of CAPE EQUIV per mass of raw propolis (mg/g).	

3.2. Estimation of antioxidant capacity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay.

In order to set a quality parameter for propolis samples, we used the measurement of their antioxidant capacity by DPPH-scavenging assay. Figure 15.a) shows the reaction rates of a propolis sample at different concentrations levels. From this graph, the area under the curve (AUC) was calculated and propolis concentration was transformed to logarithm function in order to obtain EC₅₀ values (Figure 15.b). The results were expressed as mg of propolis per liter (mg/L). Also, we calculated TEAC₅₀ index (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity obtained from EC₅₀) for each propolis sample and were expressed in mmol of Trolox equivalents per mass (in grams) of raw propolis. Table 14 shows the results obtained to each propolis sample according their precedence and geolocalization.

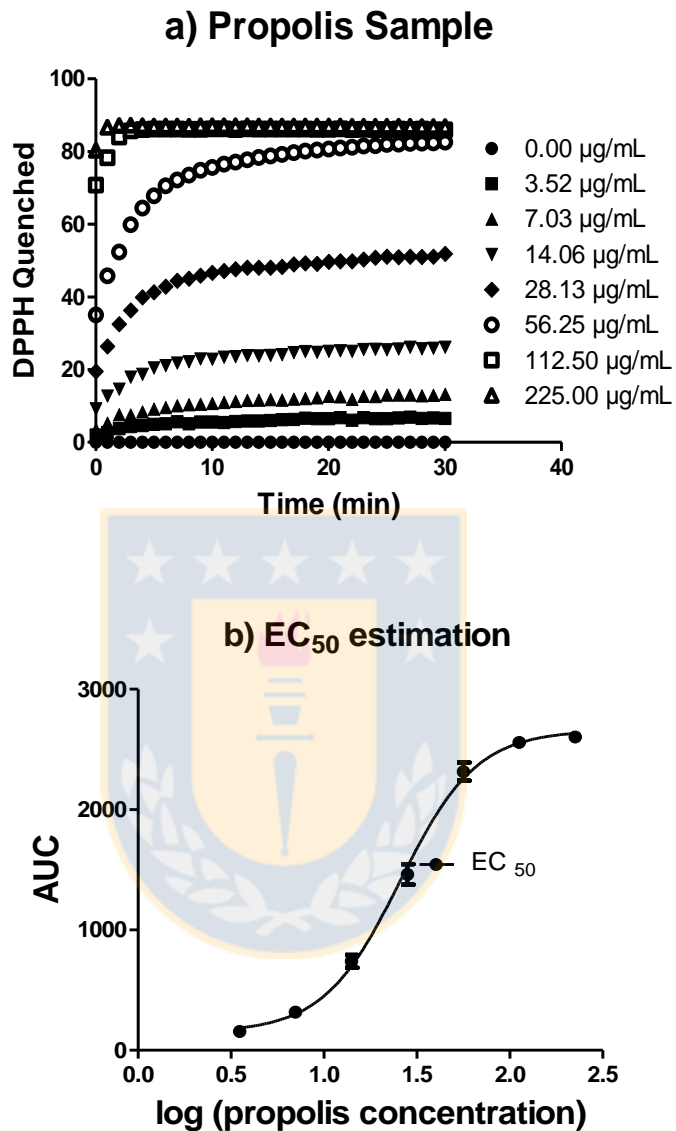


Figura 15: a) Reaction rates of a propolis sample to different concentrations levels to estimate area under the curve (AUC) b) AUC vs log (propolis concentration) for calculate EC_{50} concentration of each propolis sample.

Tabla 14: Antioxidant activity expressed as EC ₅₀ and TEAC ₅₀ from propolis samples according their origin.				
SAMPLE PROCEDENCE	GEOLOCATION OF THE SAMPLE (GM)	OF	EC₅₀ (a)	TEAC₅₀ (b)
ARAUCANIA	39°26'37.7"S 72°11'09.4"W		22.80	1.15
BIOBIO CORDILLERA	36°33'29.1"S 71°33'43.1"W 36°33'57.9"S 71°32'27.6"W		17.58 32.12	0.74 0.77
BIOBIO COSTA	36°39'57.6"S 72°57'35.7"W 36°51'06.9"S 73°00'21.3"W 36°55'34.0"S 73°08'59.6"W 36°49'54.6"S 72°59'49.0"W 36°57'49.2"S 73°09'31.9"W		19.49 17.86 24.44 26.67 43.08	1.39 1.50 1.38 1.06 0.71
BIOBIO CENTRAL	36°25'48.5"S 71°58'35.4"W 36°15'22.3"S 72°05'22.4"W 36°36'05.7"S 72°32'28.5"W 36°25'04.5"S 71°56'28.7"W 36°36'28.6"S 72°31'45.9"W 36°48'03.7"S 72°27'10.6"W 36°14'29.6"S 72°05'04.5"W 36°45'29.3"S 72°33'38.5"W 36°46'40.7"S		31.19 29.81 28.87 26.02 28.07 26.58 15.27 16.02 14.28	0.84 0.95 0.88 0.96 0.88 0.92 1.68 1.22 2.11

	72°49'00.3"W		
	36°44'34.7"S		
	72°18'41.3"W	14.98	1.10
	36°58'39.9"S		
	72°54'45.8"W	22.83	1.51
	37°04'37.3"S		
	72°33'55.6"W	33.78	0.88
	36°47'25.9"S		
	72°49'59.1"W	32.40	0.90
	36°16'55.5"S		
	72°31'36.5"W	24.34	1.12
	37°28'50.1"S		
	72°17'27.0"W	23.22	1.17
	36°19'00.6"S		
	72°33'34.8"W	25.68	0.95
UNKNOWN	UNKNOWN	15.29	1.67
	RANGE	14.28-43.08	0.71-2.11
	MEAN	24.51	1.14
	SD	7.16	0.35
	%CV	29.22	30.61
(GM)	Coordinate system using GOOGLE MAPS		
(mg/L)	(a)	The results were expressed in mg Propolis / solution volume	
	(b)	The results were expressed in mmoles Trolox equiv /propolis mass (mmoles/g)	

3.3. Optimization of PLS algorithm using the NIR spectra by Cross Validation

Figure 16 shows the overlay NIR spectra of 26 raw propolis samples (n=2) recorded at wavelengths between 800 nm and 2780 nm. From these spectral data two predictive models with the PLS algorithm were built using the NIR spectra as the X matrix and the CAPE equivalents and EC₅₀ estimation as the Y vectors. The optimization of PLS model was performed by Cross Validation.

Later, the spectral data were randomly divided into two sets: calibration and prediction sets for the PLS modelling and External Validation, respectively. The results obtained are shown below.

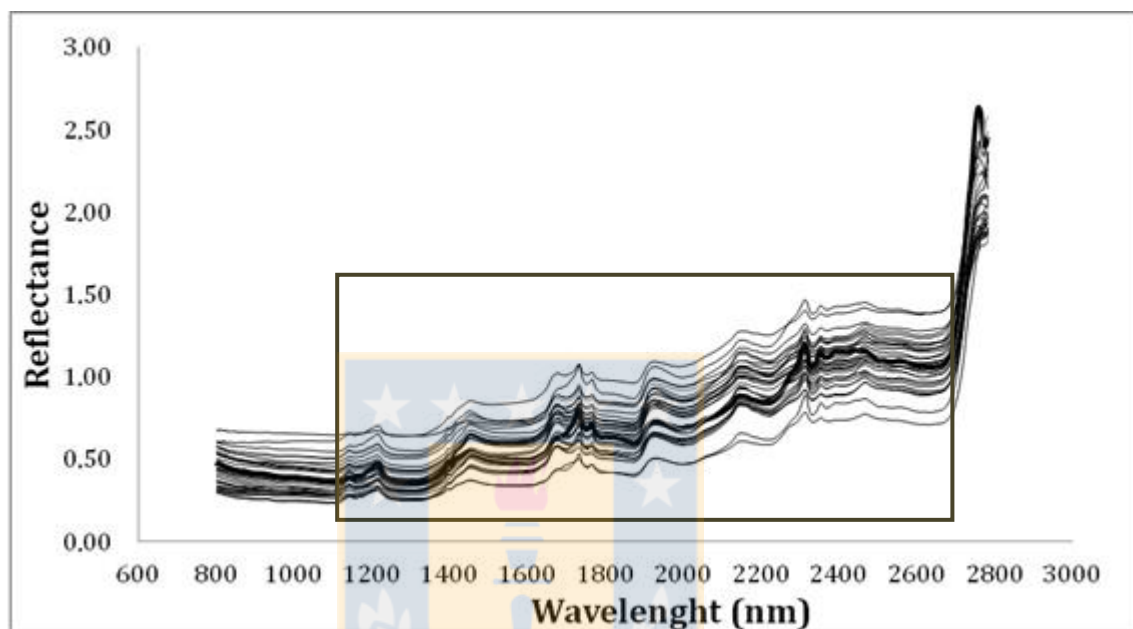


Figura 16: Raw NIR spectra of 26 (n=2) propolis samples between 800 nm and 2780 nm. Inset represents the NIR spectrum zone (1090-2780 nm) selected to optimize the predictive models of CAPE content and EC50 estimation.

3.3.1. External Validation in predictive model of CAPE content.

The calibration set for external validation consisted of 34 NIR spectra and the prediction set consisted of 18 spectra not included in the calibration set. Table 15 shows predicted and observed values for CAPE content model and a resume of data treatment and error analyses of the most suitable predictive model. We used Mean-Center (MC) preprocessing and ALIGN-MSC data transformation, aligning the spectra to one sample with average value of CAPE. One outlier value was identified and its exclusion improved the principal components number selected (it was 3). Regression vector was used to select the spectral zone that most contribute to increase the model predictive ability. Figure 16 inset

represents the NIR spectrum zone selected to optimize the predictive model of CAPE content. Figure 17 shows a scatter plot between PLS prediction value and reference measurement for CAPE content. The good performance of linear regression equation and its low value of SEP and RMSEP errors showed a good ability of predictive model obtained by PLS.

Tabla 15 : Predictive model for CAPE content obtained from NIR spectra during External Validation.

VALIDATION SET	OBSERVED	PREDICTED	Δ PRED-OBS
PT1	6.42	6.64	0.22
PT4d	35.55	36.20	0.65
PT6	19.19	19.46	0.27
PT7	31.61	32.37	0.76
PT9d	21.21	20.73	-0.48
PT10	19.51	19.53	0.02
PT11	53.46	49.77	-3.69
PT12	36.54	36.12	-0.42
PT13d	30.05	29.79	-0.26
PT14d	42.18	42.48	0.30
PT15	45.42	46.21	0.79
PT16	41.69	41.48	-0.21
PT17	27.96	27.34	-0.62
PT18d	35.70	35.16	-0.54
PT20	10.27	6.91	-3.36
PT23d	27.18	26.19	-0.99
PT25d	25.90	25.51	-0.39
PT26d	28.51	30.14	1.63
PREPROCESSING USED		MEAN -CENTER	
TRANSFORM DATA		ALIGN (13)-MSC	
OUTLIER EXCLUDE		1	
WAVELENGTH SELECTED		(nm) 1090-2780	
FACTORS SELECT		3	
SEP ERROR		1.33	

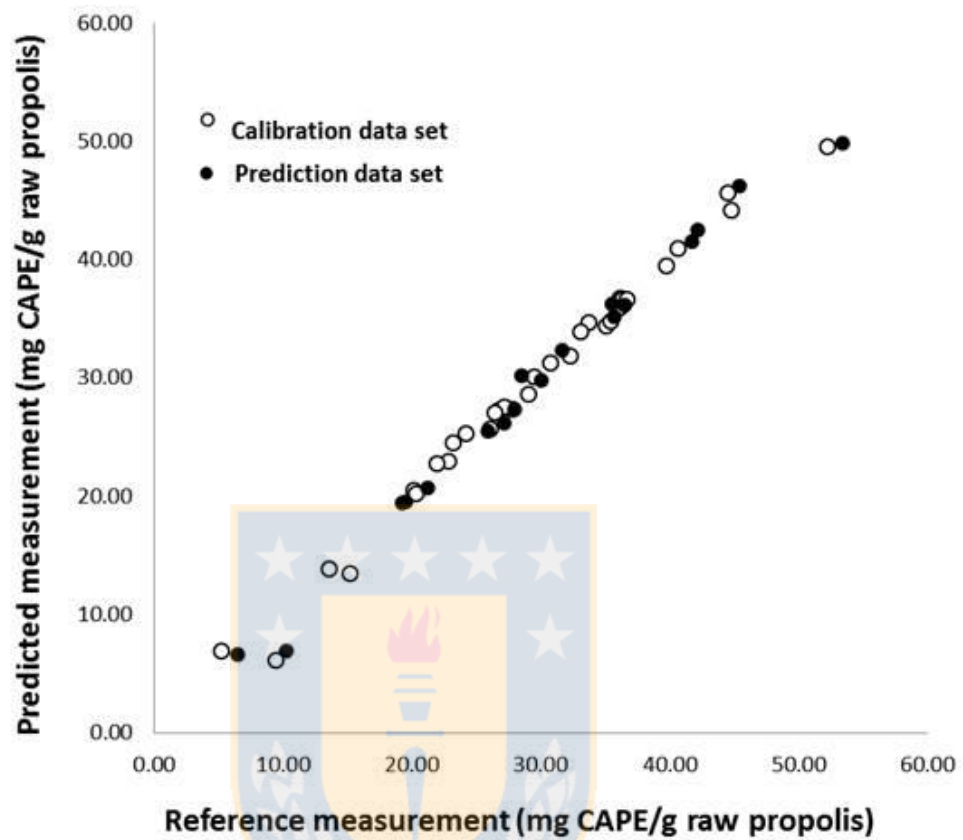


Figura 17: Scatter plot showing a correlation between PLS prediction value and reference measurement for CAPE content. The circles white and black represent calibration and prediction data, respectively. The calibration and prediction sets have good correlation with reference measurement data and the correlation coefficients for these models equal to 0.9895 and 0.9881 for the training and test sets, respectively.

3.3.2. External Validation in predictive model of Antioxidant Activity of propolis samples by EC₅₀ estimation.

The calibration set for external validation consisted of 33 NIR spectra and the prediction set consisted of 17 spectra not included in the calibration set. Table 16 shows predicted and observed values for EC₅₀ estimation and a resume of data treatment and error analyses of the most suitable predictive model. We used Mean-Center (MC) preprocessing and ALIGN-FD data transformation, aligning the spectra to one sample with average value of EC₅₀. Outlier values were not identified. In calibration and predictive sets the optimal principal components was three. Finally, regression vector was used to select the spectral zone that most contribute to increase the model predictive ability. The NIR spectrum zone between 1090-2780 nm was selected to optimize the predictive model of EC₅₀ estimation (Figure 16 inset). Figure 18 shows a graph of PLS prediction value versus reference measurements for calibration and prediction sets. The good performance of linear regression equation and its low value of SEP and RMSEP errors shown an adequate prediction power of the model obtained by PLS.

Tabla 16: Predictive model for EC 50 obtained from NIR spectra during External Validation.

VALIDATION SET	OBSERVED	PREDICTED	Δ PRED-OBS
PT1	19.49	20.43	0.94
PT2	31.19	32.97	1.78
PT3d	29.81	29.05	-0.76
PT4	28.87	27.71	-1.16
PT5	26.02	25.28	-0.74
PT6d	17.58	16.34	-1.24
PT7d	32.12	33.12	1.00
PT8	28.07	30.23	2.16
PT9	26.58	25.85	-0.73
PT10d	17.86	16.61	-1.25
PT11d	15.27	13.33	-1.94
PT12d	16.02	16.87	0.85
PT14d	14.98	14.46	-0.52
PT19	15.29	12.57	-2.72
PT20	32.40	31.10	-1.30
PT21d	43.08	42.10	-0.98
PT22d	24.34	25.97	1.63

PREPROCESSING USED	MEAN -CENTER
TRANSFORM DATA	ALIGN (17)-FD
OUTLIER EXCLUDE	0
WAVELENGTH SELECTED (nm)	1090-2780
FACTORS SELECT	3
SEP ERROR	1.39

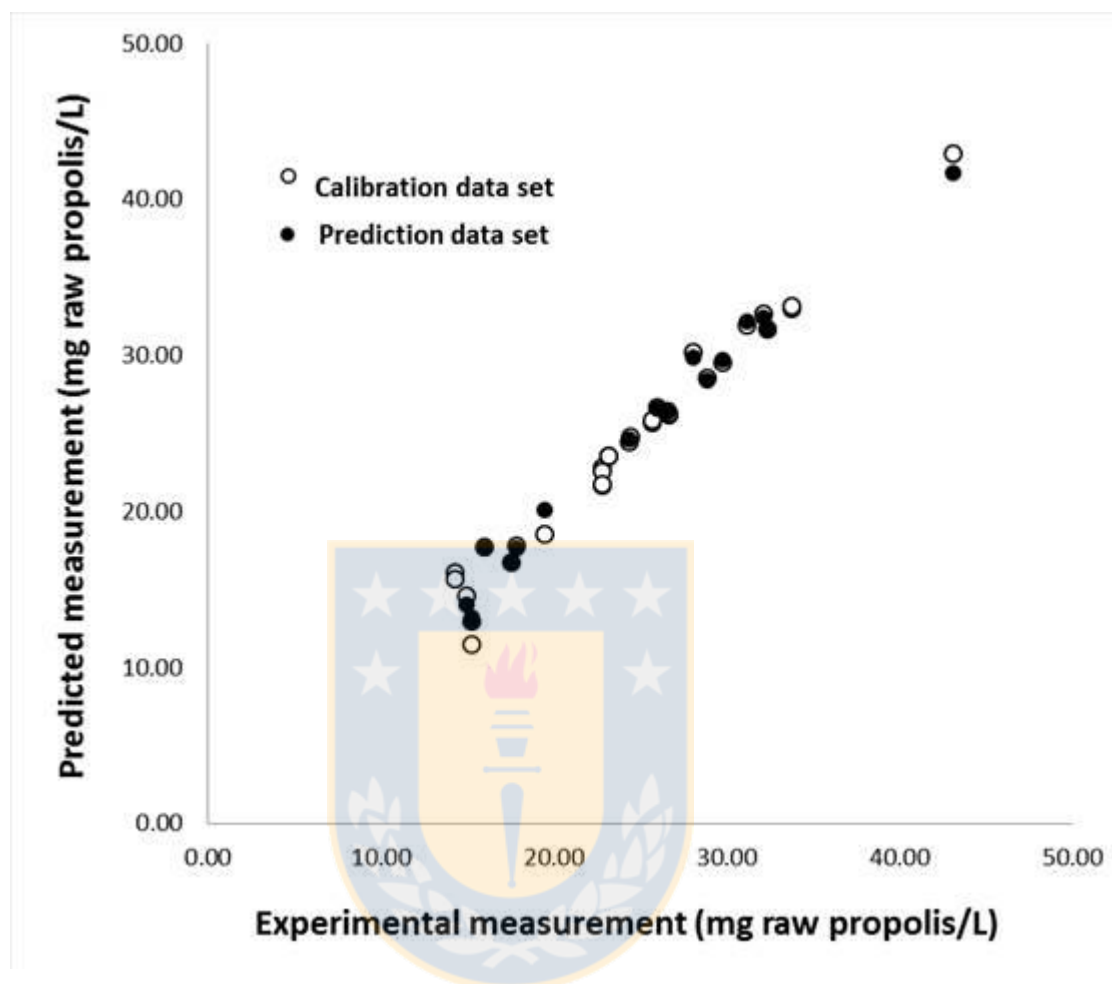


Figura 18: Scatter plot showing a correlation between PLS prediction value and reference measurement for EC50 estimation. The correlation coefficients for these models equal to 0.9738 and 0.9814 for the training and test sets, respectively.

3.3.3. LOD and LOQ estimation for predictive models

Table 17 shows the LOD and LOQ for multivariate calibration using a surrogate signal variable (SSV) corresponding to the estimation value of the predictive model. The results show a good performance considering the sample ranges (5.78 to 52.87 mg of CAPE equivalents per raw propolis mass (g) and 14.28 to 43.08 mg of propolis per liter solution).

Tabla 17: LOD and LOQ estimations for CAPE content and EC50		
PREDICTIVE MODEL	NIR-CAPE	NIR-EC50
SLOPE	0.99	1.01
INTERCEPT	0.31	-0.46
r^2	0.989	0.974
TYPICAL ERROR	1.065	1.131
LOD * (mg CAPE/propolis gram)	3.5	2.9
LOQ * (mg CAPE/propolis gram)	11.1	10.7
* LOD and LOQ were determined creating a surrogate signal variable (SSV) (Soto et al., 2009)		

Discussion

Because of the high complexity and variability of Propolis, in this work we propose a new approach for its standardization. First, we choose a selective chemical analysis of compounds with relevant biological activity to establish quality parameters that allow propolis standardization using multivariate calibration and NIR spectroscopy. As biological activity model we used antioxidant activity of raw propolis using DPPH assay in 96-well microplate format. Results of this analysis were expressed as EC50 or TEAC50. These

approaches take into account both the kinetic and the thermodynamic measurements of the radical-antioxidant reactions and make it possible to compare data between laboratories. However, more assays involving different radicals are needed for a proper antioxidant characterization.

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is a phenolic derivative of caffeic acid isolated from propolis. This substance has been used in the design of new drugs based on its adequate security profile. Currently, this molecule is under pre-clinical evaluation, in particular due to its potential for the treatment of patients with some types of cancer (Burdock, 1998; Basista-Soltys, 2013; Murtaza et al, 2014).

For its determination, HPLC-CE method was used due to the good selectivity and sensibility achieved by the electrochemical detector. High sensitivity measurements are necessary to trace low antioxidants levels (e.g. quercetin). Electrochemical detectors generate chromatograms with lower noise level allowing its use coupled with chemometric tools. It simplifies both sample preparation and data interpretation.

Figure 19 shows the chromatogram used as a reference to align the samples for HPLC-EC analysis (b). Simultaneously, the regression vector obtained for this predictive model is observed in the top (a). The preprocessing autoscale (AS) proved be the most suitable for this chromatogram-PLS predictive model. Orthogonal signal correction (OSC) was used to remove components in the X block that are orthogonal to the Y block before performing the regression. Thus, obtaining a robust model with low prediction errors is the main objective of OSC correction.

The regression vector in Figure 19 (a) shows the most important zones that contributed in predictive model. Importantly, we observed that CAPE (2) and quercetin (1) have strong influence in predictive model, despite signal difference found in the chromatogram. Quercetin and CAPE have been studied for their

beneficial use in health as antioxidant and immunomodulator. For this reason, the presence of both compounds can be used as an indicator of quality in propolis samples.

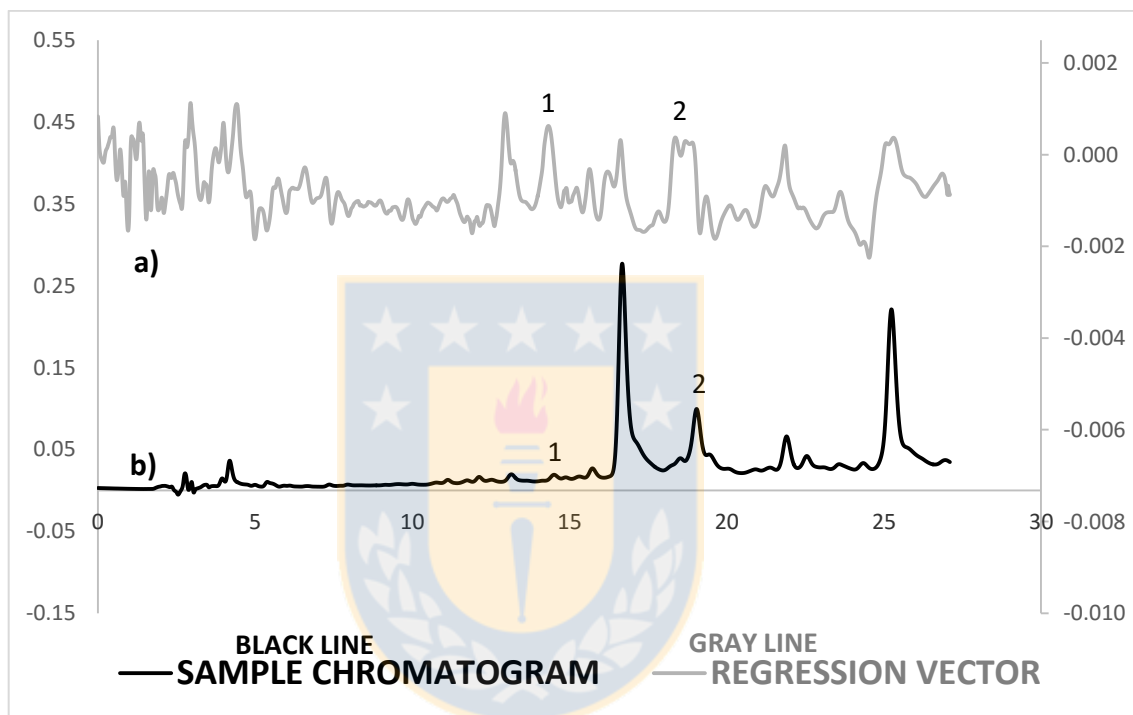


Figura 19: Chromatogram used as reference to align the samples for HPLC-EC analysis using multivariate calibration PLS (b). Simultaneously in the top, the regression vector obtained for this predictive model is observed (a). Quercetin (1) and CAPE (2) Have strong influence in predictive model, despite signal difference found in the chromatogram.

Acknowledgments

The financial support for this work was granted by INNOVA (Grant 11-CH S2.980 F11), FONDECYT (Grants 1131101, 11110442 and 115904), Red Doctoral REDOC.CTA, and MINEDUC project UCO1202 at U. de Concepción,

In addition, we thank beekeepers in the region of Biobio and Araucania who provided samples for this study.

References

ABU FARES, R; NAZER, I; DARWISH R; ABU ZARQA M; (2008) Honey Bee Hive Modification for Propolis Collection. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(2): 138-147

AFKHAMI, A; SARLAK, N; ZAREI, A (2007) Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of cyanide and thiocyanate using the partial least squares (PLS) regression. *Talanta*, 71: 893-897.

BANKOVA V. (2005) Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal Ethnopharmacology*, 100: 114-117.

BANSKOTA, A; TEZUKA, Y; KADOTA S (2001) Recent Progress in Pharmacological Research of *Propolis*. *Phytotherapy Research*, 15: 561-571.

BASISTA-SOLTYS K (2013) Allergy to propolis in Polish beekeepers. *Postepy Dermatologii I Alergologii*, 29(6): 440-445.

BLANCO, M. AND I. VILLARROYA (2002). "NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21(4): 240-250.

BLASCO, A. J., A. GONZÁLEZ CREVILLÉN, ET AL. (2007). "Direct Electrochemical Sensing and Detection of Natural Antioxidants and Antioxidant Capacity in Vitro Systems." *Electroanalysis* 19(22): 2275-2286.

BURDOCK, G. (1998) Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363.

CAO, W., H.-F. LIU, ET AL. (2011). "LC with Electrochemical Detection for Analysis of Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenyl Ester in Propolis." *Chromatographia* 73(3-4): 411-414.

CASTALDO, S; CAPASSO, F (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73(1): S1-S6.

CASTRO, C., F. MURA, ET AL. (2014). "Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis." *Food Research International* 64: 873-879.

CHAN, G. C.-F., K.-W. CHEUNG, ET AL. (2013). "The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis." *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 44(3): 262-273.

CHENG, H; QIN, Z; GUO, X; HU, X; WU, J (2013) Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*, 51(2): 813-822

COZZOLINO, D; CORBELLA, E (2003) Determination of honey quality components by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Apicultural Research*. 42 (1-2): 16 – 20

CUESTA-RUBIO, O; PICCINELLI, A; CAMPO, M; MARQUEZ, I; ROSADO, A; RASTRELLI L (2007) Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(18): 7502-7509.

ESCUREDO, O; SEIJO, M C; SALVADOR, J; GONZÁLEZ-MARTÍN M (2013) Near infrared spectroscopy for prediction of antioxidant compounds in the honey. *Food Chemistry* 141: 3409–3414

FULIANG, H; HEPBURNB, H R; XUAN H; CHEN, M; DAYA, S; RADLOFF, S (2005) Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacological Research*, 51: 147–152

GELADI, P; MACDOUGALL, D; MARTENS, H (1985) Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Appl. Spectros.*, 39(3): 491-500

HERALD, T; GADGIL, P; TILLEY, M (2012) High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *J Sci Food Agric* 92: 2326–2331

INFOMETRIX, INC. (1985-2014) Pirouette Multivariate Data Analysis Software ver 4.5. <http://www.infometrix.com>

KUJUMGIEV, A; TSVETKOVA, I; SERKEDJIEVA, Y; BANKOVA, V; CHRISTOV, R; POPOV, S (1999) Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64 (3): 235–240. doi:10.1016/S0378-8741(98)00131-7.

KUMAZAWA, S; HAMASAKA, L; NAKAYAMA, T (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84(3): 329-339.

MARCUCCI, M (1995) Propolis: Chemicals composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26: 83-99.

MARKHAM, K; MITCHELL, K; WILKINS, A; DALDY, J; LU, Y (1996) HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42 (1) : 205-211

MATSUI, T.; EBUCHI, S; FUJISE, T; ABESUNDARA, K; (2004) Strong Antihyperglycemic Effects of Water-Soluble Fraction of Brazilian Propolis and Its Bioactive Constituent, 3,4,5-Tri-O-caffeoylquinic acid. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(11): 1797—1803

MEDIC-SARIC M; RASTIJA, V; BOJIK, M; MALES, Z (2009) From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutrition Journal*, 8: 33.

MISHRA, K., H. OJHA, ET AL. (2012). "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results." *Food Chemistry* 130(4): 1036-1043.

MUÑOZ, O., C. PEÑA RAÚL, ET AL. (2001). Phenolic Compounds of Propolis from Central Chilean Matorral. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 56: 273-277.

MURTAZA, G; KARIM, S; ROUF AKRAM, M; KHAN, S; AZHAR, S; MUMTAZ, A; HASSAN BIN ASAD, M (2014) Caffeic Acid Phenethyl Ester and Therapeutic Potentials BioMed Research International 1: 1-9

OLIVIERI, A; FABER, N; FERRÉ, J; BOQUÉ, R; KALIVAS, J; MARK, H. (2006) Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 78(3): 633–661

OMENE, C; KALAC, M; WU, J; MARCHI, E; FRENKEL, K; O'CONNOR, O. (2014) Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE),

Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action. *J Cancer Sci Ther.* 5(10): 334–342

OMENE, C. O., J. WU, ET AL. (2012). "Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells." *Investigational New Drugs* 30(4): 1279-1288.

PELLATI, F; ORLANDINI, G; PINNETI, 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.

RAGNO, G; IOELE, G; RISOLI, A (2004) Multivariate calibration techniques applied to the spectrophotometric analysis of one-to-four component systems. *Anal. Chim. Acta*, 512: 173-180.

ROSSI, A., A. LIGRESTI, ET AL. (2002). "The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages." *Phytomedicine* 9(6): 530-535.

RUSSO, A., R. LONGO, ET AL. (2002). "Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin." *Fitoterapia* 73, Supplement 1: S21-S29.

RUSSO, A., V. CARDILE, ET AL. (2004). "Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines." *Life Sciences* 76(5): 545-558.

SALES, A; ALVAREZ, A; RODRIGUEZ AREAL M; MALDONADO, L; MARCHISIO, P; RODRÍGUEZ, M; BEDASCARRASBURE, E (2006) The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-visS. *J Hazard Mater.* 137(3):1352-1356.

SAURINA, J; LEAL, C; COMPANO, R; GRANADOS, M; PRAT, M; TAULER, R. (2001) Estimation of figures of merit using univariate statistics for quantitative second-order multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta* 432: 241–251

SAVITZKY, A. AND M. J. E. GOLAY (1964). "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures." *Analytical Chemistry* 36(8): 1627-1639.

SKRINJAR, M., M. H. KOLAR, ET AL. (2007). "Application of HPLC with electrochemical detection for the determination of low levels of antioxidants." *Journal of Food Composition and Analysis* 20(7): 539-545.

SOTO, C; CONTRERAS, D; TORAL, M; BASAEZ, L; FREER J. (2009) Simultaneous determination of Dibucaine and Chlorphenamine maleate using different mathematical spectrophotometric approaches. *J. Chil. Chem. Soc.* 54: 113.

VALCIC, S., G. MONTENEGRO, et al. (1998). "Lignans from Chilean Propolis." *Journal of Natural Products* 61(6): 771-775.

VIUDA-MARTOS; M; RUIZ-NAVAJAS O; FERNANDEZ-LOPEZ, J; PEREZ-ALVAREZ, J (2008) Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science*, 73(9): 117-124.

WOLD, S., H. ANTTI, ET AL. (1998). "Orthogonal signal correction of near-infrared spectra." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 44(1-2): 175-185.

XU, L; YAN, S; CAI, C; YU, X (2013) Untargeted detection and quantitative analysis of poplar balata (PB) in Chinese propolis by FT-NIR spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*, 141(4): 4132-4137

YANG, H; DONG, Y; DU, H;, SH,I H; PENG, Y; LI, X (2011) Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. *Molecules*, 16: 3444-3455



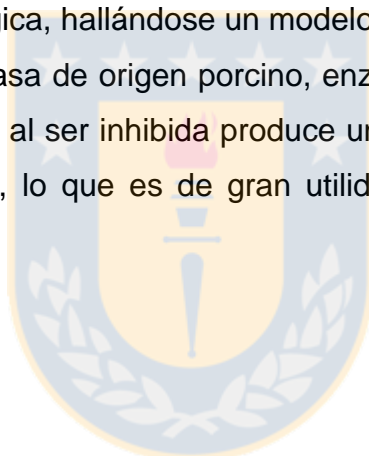
CAPÍTULO 7

OTROS ENSAYOS Y EXPERIMENTOS. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta tesis se realizaron algunos experimentos que no han sido publicados y que también contribuyen al estudio del propoleo. Uno de los problemas más frecuentes que se presentaron se relacionó con la solubilidad de la muestra y las dificultades asociadas a su escasa solubilidad en agua a temperatura ambiente. La ventaja de mantener enzimas en un medio acuoso con pH regulado no pudo ser aprovechada en la mayoría de los ensayos de actividad biológica in vitro, debido a la baja solubilidad entre las muestras y el medio acuoso de la enzima. El resultado de esta incompatibilidad fue la presencia de turbidez debida probablemente a la precipitación de ceras, que afectó la lectura de los pocillos en el ensayo de microplaca, detectándose una baja reproducibilidad en los ensayos y resultados erráticos al momento de implementar estas metodologías. La utilización de otro tipo de solventes no acuosos como medio de la reacción, tales como alcoholes u otro solvente orgánico afectó la viabilidad enzimática, aumentando los límites de detección de la técnica, situación no deseada y que se descartó en más de una determinación.

Mejores resultados se obtuvieron en el fraccionamiento con solventes orgánicos de las muestras de propoleo. Se ensayó un sistema trifásico que resulto ser rápido y adecuado para obtener tres fracciones bien definidas, que son capaces de separar compuestos basado en la afinidad que tienen con la polaridad de los solventes utilizados. El análisis cromatográfico de estas fracciones fue realizado, observándose diferencias en la distribución de compuestos que pueden ser de gran utilidad en el aislamiento de compuestos bioactivos.

Finalmente se realizó el desarrollo de un modelo quimiométrico para otro tipo de actividad biológica, hallándose un modelo predictivo capaz de predecir la inhibición de la α -amilasa de origen porcino, enzima involucrada en la hidrólisis de polisacáridos y que al ser inhibida produce una disminución de los azúcares disponibles en sangre, lo que es de gran utilidad en el manejo de pacientes diabéticos.



Fraccionamiento rápido de muestras de propóleos por un sistema trifásico de extracción líquido-líquido.

1. Introducción

El enfoque clásico de la búsqueda de compuestos bioactivos en productos naturales requiere de estudios que permitan aislar aquel compuesto que sea candidato a ser estudiado por sus potenciales aplicaciones biomédicas. Se ha observado que si su efecto aislado tiene resultados promisorios el efecto del fitocomplejo puede llegar a ser incluso superior, posiblemente asociado a un efecto sinérgico con otras moléculas bioactivas.

Es deseable que este aislamiento de compuestos bioactivos sea un proceso selectivo, reproducible, simple y rápido, con el fin de no incorporar muchos pasos que afecten el rendimiento de la extracción. En este estudio se ensayó un sistema trifásico de extracción líquido-líquido que ha permitido separar algunos compuestos presentes en propoleo en tres fracciones: Fracción alta o apolar, Fracción media de polaridad intermedia y fracción baja o polar, permitiendo una separación reproducible de algunos compuestos detectados por cromatografía líquida HPLC acoplada a detección electroquímica. En el análisis cromatográfico de estas tres fracciones se ha observado un patrón de fraccionamiento constante que puede ser de gran utilidad en el estudio de nuevos compuestos bioactivos del propoleo.

2. Materiales y Métodos

A. Muestras de Propoleo

En el presente estudio se analizaron 26 muestras ($n = 2$) de propóleos de diferentes áreas geográficas del Biobío y Araucanía Regiones, Chile (36'20 N; S 39'32 S; 71'26 E; 73'32 W) Las muestras fueron obtenidas por el método de recogida de malla. (Sales et al., 2006; Abu Fares et al., 2008). Después del análisis, las muestras se almacenaron a 4 ° C en la oscuridad.

B. Fraccionamiento de las muestras de propoleo

Para realizar el fraccionamiento de las muestras de propoleo se pulverizo y se pesó 10 mg de propoleo crudo en una mezcla de solventes hexano / t-butil metil éter / acetonitrilo / agua en la relación 2 / 2 / 3 / 2. Los solventes utilizados (Merck® y agua ultrapura) formaron un sistema trifásico que fue separado mediante un embudo de decantación en una extracción líquido-líquido. Las tres fases obtenidas fueron evaporadas a temperatura ambiente y reconstituidas en diferentes volúmenes de metanol grado HPLC Merck. La fracción A (alta) se reconstituyo en 2 mL de metanol; la fracción M (media) fue reconstituida en 7 mL de metanol y la fracción B (baja) se reconstituyo en 1 mL de metanol. Todas las fracciones fueron diluidas 4 veces y luego analizadas por cromatografía HPLC acoplada con detector electroquímico.

C. Análisis de las fracciones de propoleo por HPLC-CE

El análisis de las tres fracciones de propóleo se realizó por HPLC acoplado a un detector electroquímico amperométrico (HPLC-CE). El sistema

cromatográfico consistió en una bomba cuaternaria Hitachi Elite LaChrom L-2130 y un detector electroquímico BASJ CC-5E. Para la detección electroquímica, se utilizó en la celda de flujo una barra de carbono vítreo fue utilizada como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag / AgCl como referencia y una barra de acero inoxidable como electrodo auxiliar. Una columna HPLC Supelcosil ABZ + PLUS, longitud de 25 cm, 4,6 mm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula fue utilizada para la separación a una velocidad de flujo de 1,0 mL / min. La separación se realizó por medio de una elución de gradiente: eluyente A, acetonitrilo / ácido trifluoroacético al 0,05%; eluyente B, agua / ácido trifluoroacético al 0,05% (Merck, grado HPLC). El gradiente fue como sigue: 0 min 25% de B; 3 min 32% de B; 10 min 42% de B; 20 min 51% de B; 25 min 57% de B; 30 min 25% de B. El detector electroquímico se hizo funcionar a 900 mV en el modo oxidativo (Cao W. et al, 2011) y 30 minutos fue el tiempo de la corrida cromatográfica. Para el análisis de las fracciones, se diluyeron 4 veces, se filtró (0,45 micras) e inyectó usando un loop de 20 μ L en el sistema HPLC-CE.

D. Análisis del contenido de polifenoles y flavonoides totales en las fracciones de propóleo.

1) Determinación de polifenoles totales.

El análisis de polifenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) adaptados para microplaca modificado por Herald (Herald et al., 2011). Para el análisis del extracto total, 10 mg de propóleo se disolvieron en 5 ml de metanol y luego se diluyó cuatro veces. Las fracciones obtenidas fueron diluidas 4 veces y luego, una alícuota de 10 μ L de esta solución o solución de ácido gálico (Sigma) se diluyó en 200 μ L de agua

desionizada. En cada pocillo se añadió 15 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50%. Después de 5 minutos se añadieron 40 µL de Na₂CO₃ al 20%. El contenido de polifenoles totales se determinó por:

$$\text{Polifenoles totales} = \text{DF} \times \frac{(\text{ABS}_{\text{sample}} - \text{ABS}_{\text{blank}}) - \text{INT}}{\text{SLO}} \quad (1)$$

SLO

Donde DF representa un factor de dilución (DF = 2), ABS_{sample} y ABS_{blanco} es la absorbancia de la muestra o el blanco a 765 nm respectivamente, INT representa el intercepto de la curva de calibración de ácido gálico, y SLO representa la pendiente en la curva de calibración de ácido gálico.

Las mediciones a 765 nm se realizaron después de 45 minutos en la oscuridad en un lector de microplacas BioTek EPOCH Instruments, acoplado a un software Gen5 versión 1.11. Como solución estándar se utilizó ácido gálico (de 25-200 mg / L). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de propolis.

2) Determinación de flavonoides totales.

Para el análisis de flavonoides totales se realizó un método colorimétrico con AlCl₃ (Yang et al., 2011) con algunas modificaciones. 10 mg de propóleos se disolvieron en 5 ml de metanol para el análisis del extracto total (Merck, grado HPLC) y después se diluyó 4 veces. Las tres fracciones obtenidas también fueron diluidas 4 veces, tomándose una alícuota de 50 µL de muestra o solución de quercetina (Sigma) para cada pocillo, y luego se añaden 50 µL de metanol. Finalmente, se añadió 100 µL de AlCl₃ al 10% en metanol y se dejó 20 min en la oscuridad. La muestra fue leída a 435 nm de longitud de onda en un

lector de microplaca (BioTek Instruments mod. EPOCH acoplado al software Gen5 versión 1.11). El contenido de flavonoides totales se determinó por:

$$\text{Flavonoides totales} = \text{DF} \times \frac{(\text{ABS}_{\text{sample}} - \text{ABS}_{\text{blank}}) - \text{INT}}{\text{SLO}} \quad (2)$$

Donde DF representa el factor de dilución (DF = 2), $\text{ABS}_{\text{sample}}$ y $\text{ABS}_{\text{blanco}}$ es la absorbancia de la muestra o el blanco a 435 nm respectivamente, INT representa el intercepto de la curva de calibración de Quercetina y SLO representa la pendiente en la curva de calibración de Quercetina.

Las soluciones de Quercetina se prepararon como patrón de referencia (de 3.125 a 100.000 mg / L). El resultado se expresó como mg equivalentes de Quercetina (EQ) por gramo de propóleo.

3. Resultados

A. Fraccionamiento de las muestras de propóleo

La Figura 20 a) y b) muestra dos cromatogramas representativos de las tres fracciones de propóleo. El gradiente de fase móvil utilizado permite afirmar que los compuestos más polares (ej. Ácidos fenólicos) son los primeros en aparecer y se pre-concentran mejor en la Fracción Baja, (fase más polar) observándose una escasa presencia de estos compuestos en la Fracción Alta (fase más apolar). Esta eficiencia no se comporta de la misma forma en los compuestos más apolares donde se observa una distribución más equitativa en las tres fracciones, observándose una menor selectividad en la separación.

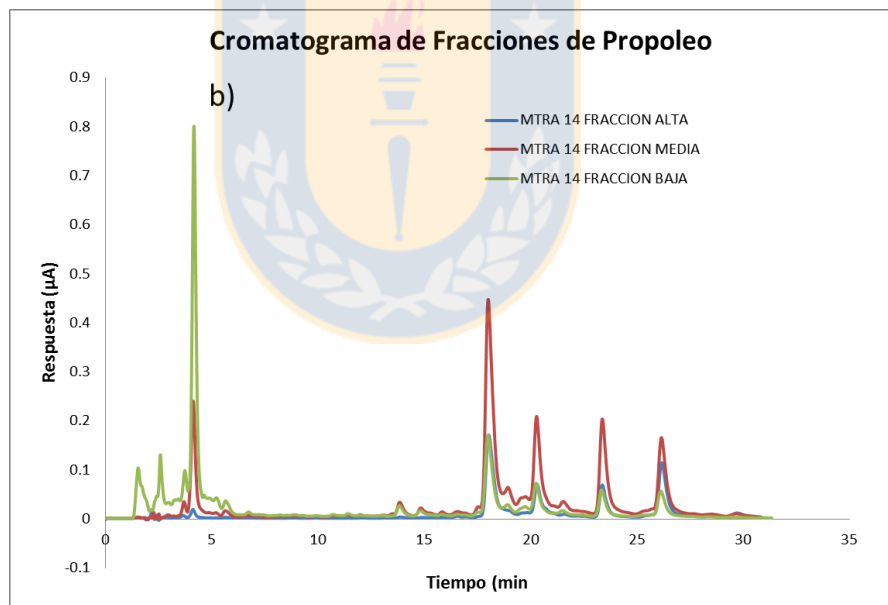
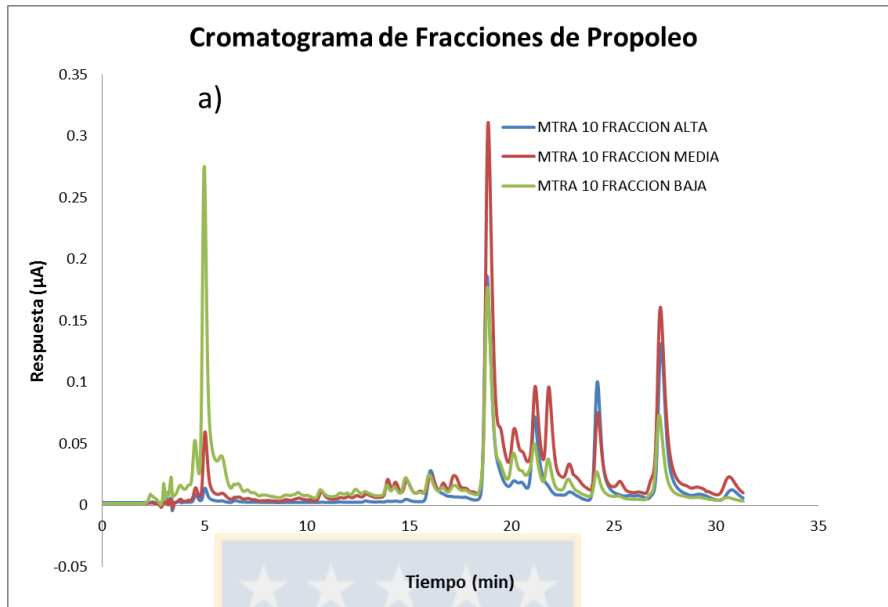


Figura 20 a) y b) son cromatogramas superpuestos del fraccionamiento de la muestra 10 y 14 del estudio.

B. Contenido de polifenoles y flavonoides totales

Asimismo, se determinó que el contenido de polifenoles y de flavonoides totales (ver figura 21 y 22) se distribuye de manera similar. En ambas muestras, tanto M26 como M21 el resultado mayor se obtuvo en la fracción media, obteniéndose un rendimiento promedio del fraccionamiento cercano al 80% y un porcentaje de recuperación en la fracción media de un 60% para el caso de polifenoles totales.

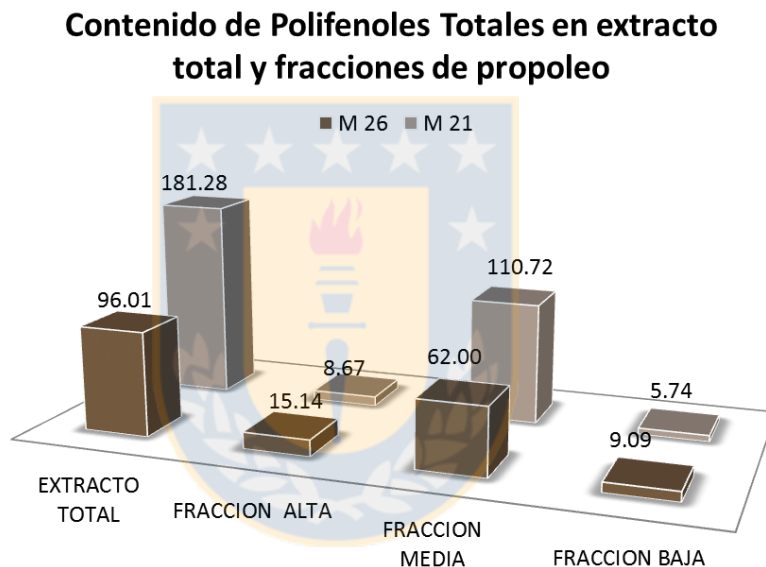


Figura 21: Medición del contenido de polifenoles totales en extracto total y fracciones de propóleo. Los resultados corresponden a mg de equivalentes de Ac Gálico por gramo de propóleo (mg Equiv Ac Gal/ g propóleo crudo).

Para el caso del contenido de Flavonoides totales se estimó que el rendimiento promedio del fraccionamiento fue de 95% para ambas muestras en estudio, y el porcentaje de recuperación promedio de flavonoides en la fracción media fue del 83%.

Contenido de Flavonoides totales en extracto total y fracciones de propoleo

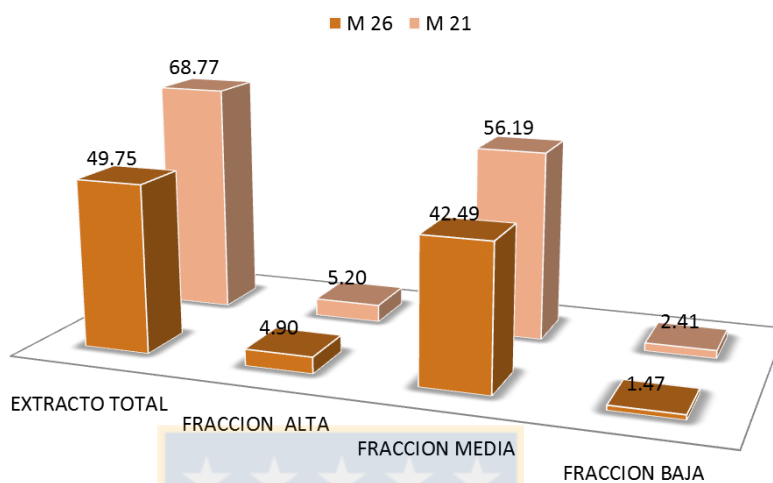


Figura 22: Medición del contenido de Flavonoides totales en extracto total y fracciones de propoleo. Los resultados corresponden a mg de equivalentes de Quercetina por gramo de propóleo (mg Equiv Quer/ g propoleo crudo).

4. Discusión

El fraccionamiento de las muestras de propoleo realizado por este sistema trifásico ha demostrado ser capaz de separar eficientemente los compuestos más polares detectados por cromatografía HPLC-CE. Sin embargo, la fracción mayoritaria se concentra en la fase de polaridad intermedia (Fracción media) donde se ha observado la pre-concentración mayoritaria de los compuestos bioactivos estudiados. Es así como la figura 23 muestra cómo se distribuye el fenetil ester del ácido cafeico en las tres fracciones en estudio, observándose que, en promedio el 78% de CAPE se encuentra en la fracción media.

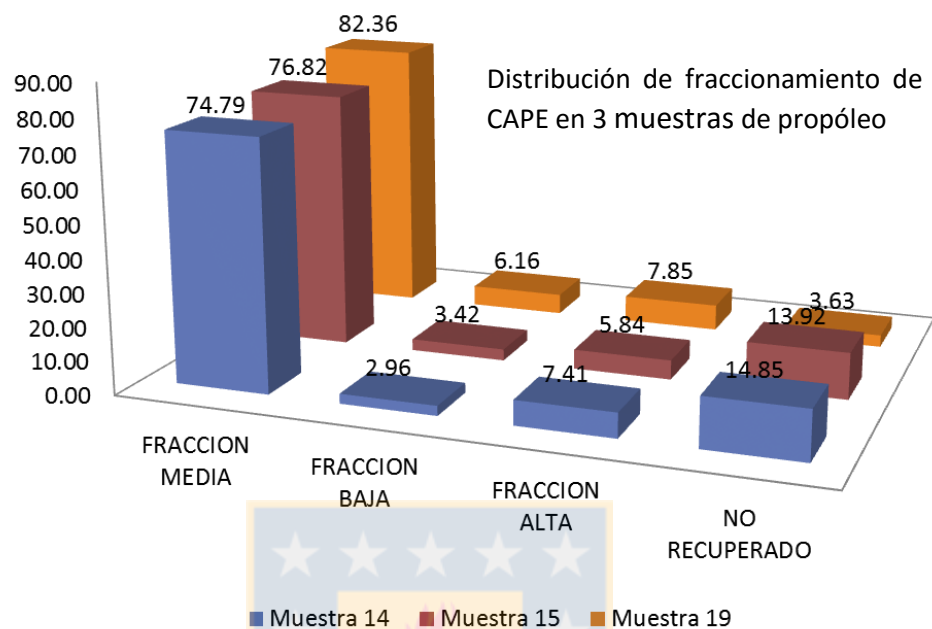


Figura 23: Distribución de CAPE en tres fracciones de propóleo por sistema trifásico de extracción.

En conclusión, este estudio permite afirmar que la fracción media concentra la mayor cantidad de los compuestos bioactivos que han sido foco de este estudio, y que la fracción más polar resulta ser más selectiva que la fracción apolar en la pre-concentración de compuestos afines. El fraccionamiento trifásico resulta ser rápido y de una selectividad adecuada para este enfoque del estudio, y puede ser utilizado como una etapa preliminar, previa a un análisis más selectivo en la búsqueda individual de compuestos bioactivos.

5. REFERENCIAS

ABU FARES, R; NAZER, I; DARWISH R; ABU ZARQA M; (2008) Honey Bee Hive Modification for Propolis Collection. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(2): 138-147

HERALD, T; GADGIL, P; TILLEY, M (2012) High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *J Sci Food Agric* 92: 2326–2331

SALES, A; ALVAREZ, A; RODRIGUEZ AREAL M; MALDONADO, L; MARCHISIO, P; RODRÍGUEZ, M; BEDASCARRASBURE, E (2006) The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-visS. *J Hazard Mater.* 137(3):1352-1356.

SINGLETON, V L; ROSSI, J A (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16(3): 144-158

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

Estudio de inhibición de α -amilasa por espectrofotometría UV en microplaca de alto rendimiento.

1. Introducción

DM (Diabetes mellitus) es un trastorno metabólico caracterizado por hiperglicemia crónica o aumento de los niveles de glucosa en sangre con perturbaciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, resultante de la absoluta o relativa falta de secreción de insulina. La insulina es una hormona producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. Esta hormona interviene en el aprovechamiento metabólico de los nutrientes, sobre todo con el anabolismo de los glúcidos. (Report WHO consultation, 1999). Esta función anabólica permite disponer a las células del aporte necesario de glucosa para los procesos de síntesis con gasto de energía, obteniendo la energía que necesita en forma de ATP.

Diversas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (también llamada no-insulino dependiente) están en uso actualmente. Las terapias disponibles convencionales para la diabetes incluyen la estimulación de la secreción de insulina endógena, la mejora de la acción de la insulina en los tejidos diana, el uso de agentes hipoglicemiantes orales, tales como biguanidas y sulfonilureas y la inhibición de la degradación de almidón de la dieta por glicosidasas tales como α -amilasa y α -glucosidasa (Sudha et al, 2011). α -amilasa de origen pancreático es una enzima clave en el sistema digestivo y cataliza la etapa inicial en la hidrólisis del almidón a una mezcla de oligosacáridos más pequeños que consisten en maltosa, maltotriosa, y un

número de α -oligoglucanos. Entonces, estos son intervenidos por α -glucosidasas y nuevamente degradados, esta vez a glucosa, que entra en la etapa de absorción desde el torrente sanguíneo. La degradación de este almidón de la dieta procede rápidamente y conduce a elevar el indicador PPHG (hiperglicemia post-prandial). Se ha demostrado que la actividad de α -amilasa pancreática humana en el intestino delgado se correlaciona con un aumento en los niveles de glucosa post-prandial, por lo tanto, el control de este factor es un aspecto importante en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Eichler et al, 1984). Por lo anterior, el retraso de la digestión del almidón mediante la inhibición de enzimas como la α -amilasa juega un papel clave en el control de la diabetes. (Tarling et al, 2008).

Por todo lo anterior, se evaluó el efecto inhibitorio de los propóleos en estudio sobre la enzima α -amilasa de origen porcino por espectrofotometría UV en microplaca de alto rendimiento. La capacidad de inhibir la actividad enzimática de α -amilasa fue evaluada mediante un ensayo que incluye las etapas de degradación de almidón y posterior reacción del azúcar producida con solución reactiva de yodo. Los resultados preliminares de este ensayo se observan a continuación.

2. Materiales y Métodos

A. Muestras de Propoleos

En el presente estudio se analizaron 19 muestras ($n = 2$) de propóleos de diferentes áreas geográficas del Biobío y Araucanía Regiones, Chile (36'20 N; S 39'32 S; 71'26 E; 73'32 W) Las muestras fueron obtenidas por el método de recogida de malla. Después del análisis, las muestras se almacenaron a 4 ° C en la oscuridad.

B. Ensayo de Inhibición de Amilasa Pancreática de origen porcino.

Se realizó el análisis de Inhibición de amilasa por el método de microplaca de 96 pocillos desarrollado por Xiao (Xiao & Storms, 2006) y Sudha (Sudha et al. 2011) con modificaciones. 40 μ L de solución de propóleo de 0.50 mg/mL disuelto en DMSO/Agua 1:1 fue agregado a 40 μ L de solución acuosa de α -amilasa pancreática porcina de 0.02 unidades, pre-incubando por 10 min a 37 °C. Luego se agrega 40 μ L de almidón disuelto en buffer fosfato 0.02 M (pH =6.9 ; 10 mg/mL) y se deja incubar a 37° C por 30 min. Posteriormente, se interrumpe la reacción agregando 20 μ L de HCl 1M seguido de la adición de 100 μ L de reactivo de iodo (5 mM de I₂ y 5 mM de KI) Finalmente, se lee la absorbancia de la muestra en lector de microplacas BioTek EPOCH Instruments, acoplado a un software Gen5 versión 1.11. a 620 nm; el control sin extracto de propóleo representa el 100% de la actividad enzimática. Para eliminar la absorbancia producida por interferencias, se realiza la medición de la absorbancia del blanco (DMSO/Agua 1:1). Los resultados fueron expresados como % de inhibición de α -amilasa.

3. Resultados

1) Ensayo de Inhibición de Amilasa Pancreática de origen porcino.

La tabla 18 muestra los resultados obtenidos para el análisis inhibitorio de α -amilasa. En ella podemos ver que hay algunas variaciones significativas entre muestras, observándose en promedio un porcentaje de inhibición de 72.41% con un CV de 4.22%.

Tabla 18: Porcentaje de inhibición de amilasa por espectrometría UV

Muestra	M1	M2	Promedio	CV
1	79.26	78.29	78.77	0.87
2	79.26	87.95	83.60	7.35
3	65.91	71.69	68.80	5.95
4	32.11	36.14	34.13	8.36
6	66.86	68.83	67.84	2.05
7	46.33	49.02	47.67	3.98
8	49.22	50.47	49.85	1.79
9	83.73	89.25	86.49	4.52
10	61.00	61.47	61.23	0.54
11	81.41	87.05	84.23	4.74
13	72.18	66.33	69.26	5.97
14	70.96	77.47	74.21	6.19
15	78.90	80.13	79.30	0.91
17	75.87	77.76	75.44	3.40
18	78.27	85.91	82.09	6.58
20	83.14	88.43	85.78	4.36
23	82.17	92.92	87.55	8.69
24	73.06	73.33	73.19	0.26
25	84.09	88.51	86.30	3.62
PROMEDIO Y COEF VARIACION			72.41	4.22

4. Discusión

La principal dificultad de este ensayo se debió a la escasa solubilidad de las muestras de propóleo en el solvente utilizado. El alto porcentaje de agua de la mezcla DMSO / H₂O 1:1 dificultó la solubilidad de siete muestras que no pudieron ser incluidas en el análisis. Sin embargo este solvente permitió una buena viabilidad de la enzima α -amilasa lo que impone el desafío de lograr una solubilización más eficiente en ensayos futuros. Es deseable incorporar ensayos donde se calcule IC 50 para cada muestra de propóleo, siendo lo presentado en esta tesis una primera aproximación para un estudio más profundo de la actividad antidiabética en propóleos del sur de Chile.

5. REFERENCIAS

- ABU FARES, R; NAZER, I; DARWISH R; ABU ZARQA M; (2008) Honey Bee Hive Modification for Propolis Collection. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(2): 138-147
- EICHLER, H. G., KORN, A., GASIC, S., PIRSON, W. & BUSINGER, J. (1984) The effect of a new specific α -amylase inhibitor on post-prandial glucose and insulin excursions in normal subjects and Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 26, 278-281.
- SALES, A; ALVAREZ, A; RODRIGUEZ AREAL M; MALDONADO, L; MARCHISIO, P; RODRÍGUEZ, M; BEDASCARRASBURE, E (2006) The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-visS. *J Hazard Mater*. 137(3):1352-1356.
- SUDHA, P., ZINJARDE, S., BHARGAVA, S. & KUMAR, A. (2011) Potent alpha-amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 5.
- TARLING, C. A., WOODS, K., ZHANG, R., BRASTIANOS, H. C., BRAYER, G. D., ANDERSEN, R. J. & WITHERS, S. G. (2008) The Search for Novel Human Pancreatic α -Amylase Inhibitors: High-Throughput Screening of Terrestrial and Marine Natural Product Extracts. *ChemBioChem*, 9, 433-438.
- WORLD HEALTH ORGANISATION CONSULTATION: (1999) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation Geneva.
- XIAO, Z., STORMS, R. & TSANG, A. (2006) A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*, 351, 146-148.

Estimación del porcentaje de inhibición de α -amilasa de origen porcino por espectrometría NIR y PLS.

1. Introducción

Tal como en los Capítulos 5 y 6 se diseñaron y validaron modelos quimiométricos utilizando espectroscopia NIR y PLS para predecir el contenido de polifenoles y flavonoides totales y de la actividad antioxidante expresado como EC₅₀, también se estudió si es posible diseñar y validar un modelo capaz de predecir la actividad antidiabética de propóleos. La metodología de estudio es similar a lo desarrollado en los capítulos mencionados. Por ello se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

2. Materiales y Métodos

A. Muestras de Propóleos

En el presente estudio se analizaron 19 muestras (n = 2) de propóleos de diferentes áreas geográficas de las regiones del Biobío y Araucanía, Chile (36'20 N; S 39'32 S; 71'26 E; 73'32 W) Las muestras fueron obtenidas por el método de recogida de malla. (Sales et al., 2006; Abu Fares et al., 2008). Después del análisis, las muestras se almacenaron a 4 ° C en la oscuridad.

B. Ensayo de Inhibición de Amilasa Pancreática de origen porcino

Tal como se describió en el punto 7.2 el análisis de las muestras fue realizado por espectroscopia UV en un lector de microplacas BioTek EPOCH Instruments, acoplado a un software Gen5 versión 1.11. a 620 nm.

C. Adquisición de espectros NIR.

Para la adquisición de espectros de reflectancia NIR se utilizó un espectrómetro de reflectancia NIR Bruker (MPA Opus con v. 6.5.) El resultado se expresó como porcentaje de reflectancia (% R). En el tratamiento de la muestra se congelaron 0,5 g de propóleos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ el que luego fue pulverizado. A continuación, se realizaron 32 exploraciones en un intervalo de número de onda a partir de 12500 a 3600 cm^{-1} (800 hasta 2780 nm) con una resolución de 8 cm^{-1} para cada muestra. Los espectros se midieron por duplicado.

D. Análisis de datos espectrales

19 muestras de propóleos en bruto ($n = 2$) se utilizaron para la matriz X (variable independiente). Los datos espectrales fueron divididos en dos grupos: conjunto de datos de calibración (29) y el conjunto de datos de validación externa (9) para el modelado PLS y validación respectivamente.

El modelo de calibración se construyó con el algoritmo PLS usando los espectros NIR como la matriz X y el porcentaje de inhibición de la amilasa como los vectores y. La optimización del modelo de PLS se realizó mediante validación cruzada. El error cuadrático medio de la calibración (RMSEC), el error cuadrático medio de la validación cruzada (RMSECV) y el error estándar

de predicción (RMSEP) se utilizaron para el análisis de errores en la calibración, validación cruzada o externa y predicción respectivamente.

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_c} (y - \hat{y})^2}{n_c - k}} \quad (1)$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{cv}} (y - \hat{y})^2}{n_{cv}}} \quad (2)$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_p} (y - \hat{y})^2}{n_p}} \quad (3)$$

Donde n_c , n_{cv} y n_p representan el número de muestras de calibración, validación cruzada o validación externa y predicción respectivamente; y es el porcentaje de inhibición de α -amilasa determinada por métodos de referencia; \hat{y} es el valor NIR pronosticados y k es el número óptimo de componentes PLS utilizados en el modelo.

El vector de regresión se utilizó para estimar las variables de la matriz X que más contribuyen al modelo predictivo. Además, se utilizó para seleccionar los intervalos óptimos de longitud de onda, a partir del valor absoluto de vector de regresión y permitió seleccionar la zona del espectro con mayor poder predictivo. El valor absoluto de este vector fue ordenada de mayor a menor, y se seleccionaron las zonas de la matriz X que más contribuyen a la capacidad de predicción del modelo.

El cálculo de PLS y validaciones se realizaron con software Pirouette 4.5 (Infometrix Inc., Woodinville, WA, EE.UU.).

3. Resultados

1) Ensayo de Inhibición de Amilasa Pancreática de origen porcino.

El resultado de este análisis se indicó en la tabla 7.1

2) Optimización del algoritmo PLS usando espectros NIR.

La Tabla 19 muestra los resultados obtenidos para el rango de longitud de onda optimizado.

Tabla 19: Análisis de error y tratamiento de datos para modelos predictivos de α -amilasa		
PREPROCESAMIENTO	MEAN CENTER	MEAN CENTER
LONGITUD DE ONDA (nm)	1400-2680	1400-2680
TRANSFORM DATA	ALIGN	ALIGN-MSC
FACTORS SELECT	4	3
SEP	2.78	1.99
r^2	0.99	0.99
SLOPE	1.12	1.02
INTERCEPT	-8.32	-1.37

De ella se observa que fue determinado un rango óptimo de trabajo a partir del coeficiente de correlación entre 1400 a 2680 nm. La Figura 7.5 muestra que fue factible desarrollar un modelo predictivo adecuado para la estimación de la actividad inhibitoria del propoleo sobre la actividad de amilasa pancreática de origen porcino.

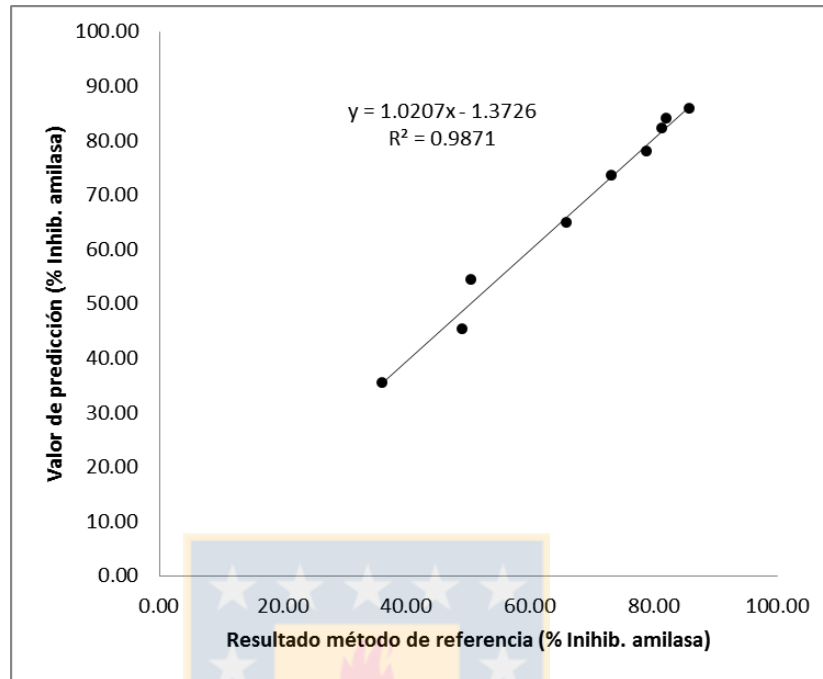


Figura 24: Gráfico de correlación entre el método de referencia y el valor de predicción del modelo predictivo de la actividad inhibitoria del propoleo sobre la actividad de amilasa pancreática.

4. Discusión

La construcción de un modelo predictivo de actividad antidiabética más robusto sugiere incorporar el ensayo de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa, otra enzima involucrada en el metabolismo del azúcar. Al mismo tiempo mejorar la solubilidad de las muestras y establecer estudios de IC_{50} sin duda mejoraría la representatividad de la predicción.

5. REFERENCIAS

ABU FARES, R; NAZER, I; DARWISH R; ABU ZARQA M; (2008) Honey Bee Hive Modification for Propolis Collection. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(2): 138-147

SALES, A; ALVAREZ, A; RODRIGUEZ AREAL M; MALDONADO, L; MARCHISIO, P; RODRÍGUEZ, M; BEDASCARRASBURE, E (2006) The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-visS. *J Hazard Mater*. 137(3):1352-1356.



CONCLUSIONES

El desarrollo de esta tesis ha permitido comprobar que se acepta la hipótesis de estudio en que existe una relación entre la actividad biológica y la composición química del propóleo factible de ser modelada con el uso de herramientas quimiométricas. Este estudio ha permitido desarrollar, optimizar y validar 5 modelos predictivos; 3 relacionados a la composición química y 2 a la actividad biológica del propóleo, a partir de la información obtenida por espectroscopia NIR y cromatografía líquida HPLC-EC, lo que trasciende y aporta mucha información cruzada que contribuye en el estudio de la problemática relacionada con la estandarización de propóleos.

Se realizó el análisis de 26 muestras de propóleo por espectroscopia NIR para el desarrollo de modelos predictivos de calibración multivariada.

Se desarrollaron métodos espectroscópicos UV-Vis en microplaca para la estimación del contenido de polifenoles totales y flavonoides totales como marcadores de la calidad de una muestra de propóleos.

Se desarrolló un método cromatográfico por HPLC-EC para la determinación cuantitativa de algunos compuestos fenólicos (flavonoides) con actividad biológica relevante contenidos en propóleos tales como fenetil ester del ácido cafeico (CAPE), quercetina y canferol.

Se implementó un método espectroscópico UV-Vis en microplaca para la estimación de la actividad antioxidante del propóleo mediante el ensayo de decoloración de DPPH. Asimismo, se desarrolló un modelo de actividad antidiabética basado en la inhibición de la enzima amilasa pancreática de origen porcino.

Todos estos resultados fueron utilizados como métodos de referencia para desarrollar modelos capaces de predecir la actividad biológica de una muestra de propoleo o su contenido de fenoles totales, flavonoides totales o contenido de CAPE

En el estudio de la actividad antioxidante se comprobaron las ventajas que supone trabajar con un sistema de detección electroquímica, muy adecuado para este tipo de análisis debido a la buena sensibilidad y selectividad alcanzada por este detector, pero por sobre todo por el bajo nivel de ruido que ha permitido estudiar la cromatografía obtenida dando un enfoque distinto, donde la información del cromatograma también puede ser utilizada como vector X en un modelo predictivo. Esto convierte a esta técnica en la más ventajosa para el estudio de antioxidantes por calibración multivariada, desplazando a otro tipo de detectores cuyos principios de operación no dependen de una reacción redox.

El modelo de estudio es exportable a otros campos de aplicación, puede ser automatizado y miniaturizado para aplicaciones en terreno, permite disminuir los costos operativos de este tipo de análisis y es capaz de detectar las posibles interacciones sinérgicas que pudieran existir en el fitocomplejo siendo esta una ventaja superior que tienen los ensayos de calibración multivariada.

Las dificultades generales del estudio radican principalmente en problemas de gestión de los experimentos y en lo particular, la solubilidad de la muestra resultó ser un problema que requiere un diseño experimental más profundo que permita acceder a nuevos esquemas de extracción. En ello, el fraccionamiento trifásico desarrollado durante el estudio puede contribuir en esta problemática, ya sea como una etapa preliminar antes de la búsqueda más profunda de compuestos bioactivos.

Con todo lo anterior, no dejar de mencionar que este estudio es una contribución para los apicultores locales, que esperamos aporte en mejorar su productividad y otorgar un mayor valor agregado a sus productos basado en las herramientas de I+D desarrolladas en esta tesis. En síntesis:

Existe una relación entre la actividad biológica y la composición química del propóleo que fue factible de ser caracterizada por espectroscopia NIR y modelada mediante el uso de herramientas quimiométricas. Los resultados de esta investigación permiten inferir que es posible abordar la problemática de la estandarización de propóleos de manera rápida, eficiente, automatizable y a un bajo costo operativo, siendo este modelo de estudio extrapolable a otro tipo de investigación de productos naturales.



AGRADECIMIENTOS

El apoyo financiero para este trabajo fue aportado por INNOVA BIOBIO (Grant 11-CH S2.980 F11), FONDECYT 1131101 (Grants, 11110442 y 115904), Doctoral Red REDOC.CTA, y UCO1202 proyecto MINEDUC de la Universidad de Concepción. Además, agradecemos a los apicultores de la región del Biobío y la Araucanía agrupados en la Red Apícola Nacional que proporcionaron muestras para este estudio.

Al apoyo formador ilimitado y permanente del Dr. Edgar Pastene Navarrete y Dr. David Contreras Pérez. Al apoyo irrestricto en la gestión académica de la Dra. Claudia Mardones y el Dr. Carlos Peña, así como también a la obra del Dr. Carlos Bruhn Fernández en el impulso creador y visión del Programa de Doctorado en Ciencias y Tecnología Analítica.

Al apoyo logístico de mi empleador, el Servicio Médico Legal, representado en el Dr. Darío Benavente Aldea y la Dra. Viera Barrientos Orloff, así como también toda la gestión realizada por Richard Salgado van Diest de la Red Apícola Nacional.

Al apoyo emocional de mi familia y a todos los que comprendieron la importancia que esta formación tiene en mi vida.