

CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEOS

Quantification of flavonoids in the ethanol extract of propolis

Rengifo Penadillos Roger Antonio¹

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la cantidad de flavonoides que contiene el extracto etanólico de propóleos. Se recolectaron las muestras de propóleos en los diferentes puestos del mercado de la ciudad de Otuzco. Se realizó la extracción de flavonoides utilizando el extractor soxhlet, empleando como solvente etanol 96°G.L. Se obtuvo el espectro de absorción ultravioleta del extracto etanólico, así mismo se hicieron pruebas de identificación de grupos fenólicos y de flavonoides, para la cuantificación de estos últimos se usó estándar de quercetina. Los resultados indican que el extracto etanólico de propóleos contiene en su composición flavonoides al presentar respuestas positivas en todas las pruebas realizadas. El porcentaje de flavonoides totales expresados en quercetina fue 8,71 g/100g de extracto seco.

Palabras claves: Propóleos, extracto etanólico, flavonoides.

ABSTRACT

The purpose of this work is to determine the amount of flavonoids contained in the ethanol extract of propolis. The samples of propolis were collected in different areas of the market from Otuzco city. Flavonoids extraction was performed by the method of the soxhlet extractor, using ethanol 96° G.L. as solvent. It was obtained the ultraviolet absorption spectrum of the ethanol extract, likewise identification testing of phenolic groups and flavonoids were made, to quantify these latter, quercetin standard was used. The results indicate that the ethanol extract of propolis contains flavonoids in its composition to present positive responses in all tests performed. The percentage of total flavonoids expressed as quercetin was 8.71g/100g of dried extract.

Key words: Propolis, ethanol extract, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

Los propóleos son un conjunto de sustancias que se obtiene por la adición de cera y secreciones salivales de las abejas al material resinoso, gomoso y balsámico, de consistencia viscosa recogido por éstas, de algunas especies vegetales (pino, abeto, sauce, abedul, varias especies de álamo, fresno, roble, etc.) (1). Las abejas utilizan los propóleos para barnizar el interior de la colmena (incluidos los panales) con fines desinfectantes, cerrar grietas, reducir vías de accesos y consolidar los componentes estructurales.

También es utilizado para recubrir los cadáveres de los enemigos que se hayan introducido en la colmena (escarabajos, roedores, lagartijas, etc.), que quedan embalsamados evitando su descomposición; esta propiedad que era ya conocida por los egipcios y sus sacerdotes quienes lo utilizaban para embalsamar momias (2).

En la actualidad existen en el mercado farmacéutico internacional una infinita gama de productos que usan los propóleos y cada vez adquiere más importancia en las farmacopeas y cosmética moderna debido a sus valiosas propiedades terapéuticas.

¹ Docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

Los propóleos de origen nacional pueden constituir una oportunidad interesante de aprovechamiento de nuestros recursos naturales para acceder a mercados exigentes en donde países como Argentina y Brasil ya ocupan un lugar de liderazgo (3,4). De los compuestos identificados el 50% son compuestos fenólicos, a los cuales se les atribuye acción farmacológica. Los principales fenoles identificados son: flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas, triglicéridos fenólicos. Los flavonoides, son quizá los componentes de mayor interés en los propóleos (4,5,6).

Del Rio P, (2006) en su estudio "Actividad biocida de un propolis chileno contra *Porphyromonas gingivalis*" y Gutiérrez M, y colaboradores en su estudio de "Acción antibacteriana de la tintura hidroalcohólica de propóleos al 4 % en gérmenes de origen endodónico" demostraron la actividad antibacteriana *in vitro* de los propóleos contra microorganismos patógenos orales como el *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus aureus* y *Lactobacillus* s/p. (3).

Los espectros de flavonoides consisten típicamente de dos máximos de absorción en los rangos de 240 – 285 nm (Banda II) y 300 – 550 nm (Banda I) (7).

El extracto de propóleos es un producto semielaborado que se obtiene procesando los propóleos con un solvente de manera de extraer los componentes biológicamente activos. Posteriormente, se evapora el alcohol trabajando a una temperatura baja y controlada. A partir del extracto se pueden desarrollar una gran variedad de productos. Por todo lo mencionado, dado que la comercialización de propóleos en el Perú es aún reciente es que se decide realizar un estudio que tuvo como objetivo determinar la cantidad de flavonoides contenidos en propóleos procedente de la ciudad de Otuzco.

MATERIAL Y MÉTODO

Material Botánico

Se utilizaron 20g de propóleos que fueron recolectados en la Ciudad de Otuzco Departamento de La Libertad durante el mes de febrero del 2011.

- **Reactivos:** Acetato de potasio 1M, acetato de plomo al 10%, Ácido clorhídrico al 28%, Agua destilada, Cloruro de Aluminio al 10%, Cloruro férrico al 5%, Estándar de Quercetina Batch: MM 2-5027, Etanol de 96% "Dropaksa", Hidróxido de sodio al 20%, Láminas de Magnesio metálico.
- **Equipos:** Balanza analítica Sartorius BP301S N° de serie 13005198, Baño María Memmert, Espectrofotómetro Hewlett Packard 8452 con arreglo de diodos, Espectrofotómetro Jenway 6105 U.V./Vis Model 6105 N° de serie 1228, Estufa Memmert UM – 300, Refrigerador Avanti Model 34 – 3R G.

Métodos

- **Recolección de la muestra:** Para la recolección de la muestra de propóleo se recorrió el mercado de la ciudad de Otuzco, se recogieron muestras de 3g de diferentes puestos; las muestras recogidas se unieron. El peso total de la muestra fue de 20g, este peso se enfrió a una temperatura de -3°C.
- **Preparación del extracto etanólico:** Los 20 g de la muestra se mezcló con arena lavada y se llenó en un cartucho de papel filtro, introduciendo éste en el extractor Soxhlet tapado con un algodón. Se realizó la extracción por 4 horas, utilizando 100 ml. de etanol 96°G.L. en un balón de fondo plano de 250 ml y controlando la temperatura hasta obtener 8 ciclos por hora. Usando el baño maría se realizó la operación de evaporación del extracto etanólico hasta 20 mL, se continuó la evaporación en una estufa a 80°C hasta obtener un extracto blando. Seguidamente se pesó 0,1 g de extracto blando en un vaso de precipitación de 10 cc, disolviéndose con 5 mL de etanol de 96°G.L. y se llevó a baño maría por 3 minutos, enfriándose, filtrándose y aforándose a 10 mL.

• **Análisis físico químicos:**

Espectro de absorción de radiación ultravioleta.

Se midió 1 ml del extracto etanólico en una fiola de 1000 ml, y se aforó con etanol 96°G.L. Se vertió en una cubeta de cuarzo de 10 mm el extracto diluido y se procedió a determinar el espectro de absorción en un Espectrofotómetro HP 8452 a una longitud de onda entre 250 nm a 350 nm (8).

Identificación de compuestos Fenólicos.

a) **Reacción con hidróxido de sodio:** En un tubo de ensayo se colocó 1,0 ml. de extracto, luego se agregó 1,0 ml de hidróxido de sodio al 20%, anotando el color observado (8).

b) **Reacción con Cloruro Férrico:** En un tubo de ensayo se colocó 1,0 ml. de extracto, luego se agregó 0,5 ml. (10 gotas) de cloruro férrico al 5%, finalmente se anotó el color observado (8).

Identificación de Flavonoides.

a) **Reacción con acetato de plomo:** Se pipeteó 2,5 ml de extracto en un tubo de ensayo y se adicionó 7,0 ml. de etanol al 95% y 0,5 ml. de acetato de plomo al 10%. Se agitó bien y se dejó en reposo por 24 horas. Pasado ese tiempo se anotó el color del precipitado (7).

b) **Reacción de Shinoda:** En un tubo de ensayo se colocó 2,0 ml de extracto y se adicionó granallas de magnesio metálico y 0,3 ml. de ácido clorhídrico concentrado. Se dejó reposar por 10 minutos. Se anotó la coloración observada (7).

Cuantificación de Flavonoides totales.

a) **Preparación de las muestras:** Se pesó 0,12 g de extracto blando en un vaso de precipitación de 10 cc, disolviéndose con 10 ml de alcohol al 80%, se filtró y se aforó en una fiola de 10 ml con

alcohol al 80%, el cual constituyó la muestra diluida

Para la determinación de los flavonoides totales se midió 0,1 ml de la muestra diluida mezclándose con 3 ml de alcohol al 95%, luego se adicionó 0,2 ml de cloruro de aluminio al 10 %, 0,2 ml de acetato de potasio 1 M y se aforó con alcohol al 80%, en una fiola de 10 ml. Se dejó reposar por 40 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz para luego leer la absorbancia en un espectrofotómetro Jenway a una longitud de onda de 434 nm.

Para el blanco la cantidad de cloruro de aluminio al 10 % fue reemplazado con agua destilada.⁷

Este procedimiento se repitió para 5 muestras.

b) **Preparación de la curva de calibración:**

Se pesó 3,0 mg de Quercetina patrón y se disolvió en una fiola de 10 ml con etanol al 80%. A partir de esta solución se prepararon diluciones de 12,5; 25; 50 y 100 ug/ml. A cada dilución se adicionaron 3 ml de alcohol al 95 %, 0,2 ml de cloruro de aluminio al 10 %, 0,2 ml de acetato de potasio 1 M y finalmente se aforó a 10 ml con alcohol al 80%. Se dejó reposar durante 40 minutos a temperatura ambiente, para luego leer en el espectrofotómetro a 434 nm.

Para el blanco la cantidad de cloruro de aluminio del 10% se sustituye por agua destilada.

Diseño Estadístico: Para el siguiente estudio se emplearon las siguientes mediciones estadísticas: Pruebas de Tendencia Central (Promedio), Medidas de Dispersión

RESULTADOS

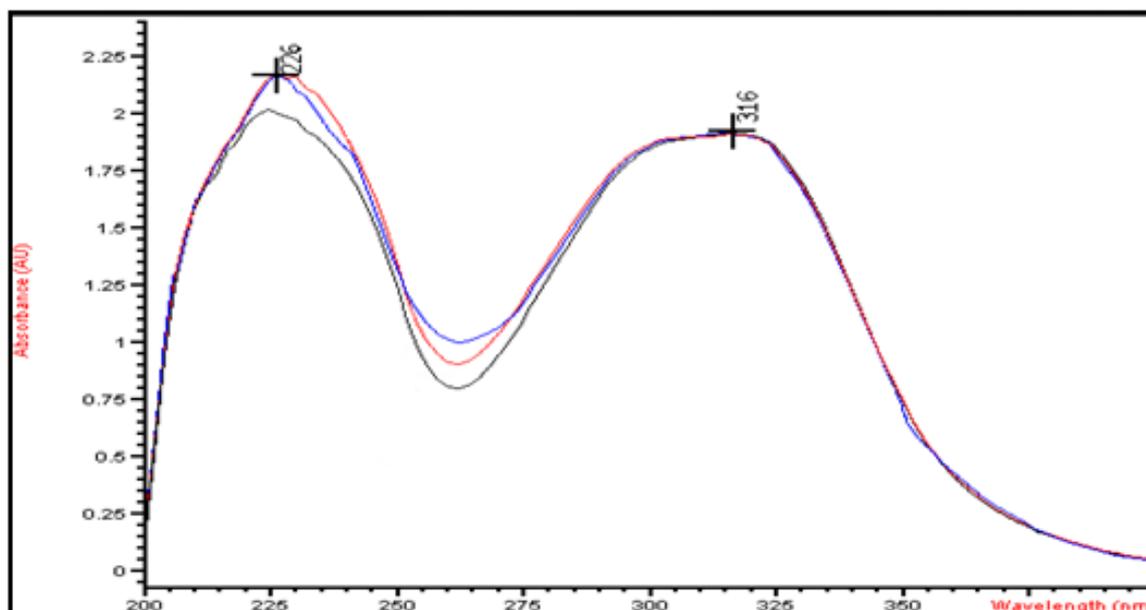


Figura 1: Espectro UV del extracto etanólico de propóleos $\lambda_{\text{máx}} = 226 \text{ nm}$, $\lambda = 316 \text{ nm}$.

Tabla 1: Identificación de compuestos fenólicos en las muestras de extracto etanólico de propóleos.

ANÁLISIS	COLORACIÓN
Reacción NaOH	Amarillo
FeCl ₃	Verde oscuro
Acetato de Plomo	Amarillo
Shinoda	Rojo púrpura

Tabla 2: Relación de la Concentración de quercetina estándar con la absorbancia.

Estándar	Concentración(ug/ml)	Absorbancia
Quercetina	12,5	0,108
	25	0,194
	50	0,389
	100	0,739

Tabla 3: Absorbancia y cantidad de flavonoides expresado como quercetina en el extracto etanólico de propóleo.

MUESTRA	Absorbancia	Flavonoides totales (g/100 g e.s.)
M1	0,7753	8,76
M2	0,7802	8,80
M3	0,7645	8,61
M4	0,7652	8,64
M5	0,7723	8,72
PROMEDIO	$0,7379 \pm 5,99 \times 10^{-3}$	$8,71 \pm 0,799$

DISCUSIÓN

El espectro de absorción ultravioleta permite identificar la presencia de flavonoides en las muestras analizadas, la Norma IRAM 15935-2 establece para este parámetro de calidad, que en los extractos etanólicos de propóleos debe hallarse un pico de absorción entre los 200 y 315 nm; por otro lado la Norma Salvadoreña establece un rango más amplio

entre los 250 y 350 nm donde se debe observar uno o más picos (8,9).

En las figuras 1, el espectro de absorción UV de la muestra del extracto etanólico de propóleo, presenta un pico a los 226 nm y otro a los 316 nm estos resultados concuerdan con lo establecido por las normas antes mencionadas por lo que se trata de un flavonol.

Para la identificación cualitativa de compuestos fenólicos se utilizó la reacción con NaOH y FeCl₃, la Norma Salvadoreña establece que la reacción para identificar compuestos fenólicos debe ser positiva para que el producto sea aceptado. Las coloraciones para una reacción positiva con NaOH, varía del amarillo al anaranjado rojizo y para el FeCl₃ del verde, pardo oscuro al azul respectivamente (7,8).

En la tabla 1 se observan los resultados de la reacción con NaOH y FeCl₃, encontrando reacciones positivas para la muestra de extracto etanólico de propóleos analizada. En la muestra se observó coloración amarilla al reaccionar con NaOH y azul al reaccionar con FeCl₃, las cuales estuvieron dentro de las coloraciones que se indica en la norma.

En la reacción con NaOH se produce la ruptura del anillo C de un flavonoide el cual puede ser de una flavona o de una flavanona, esta ruptura produce la formación de una chalcona lo que se evidencia con una coloración amarilla que puede variar en intensidad.

La reacción del FeCl₃ con grupos fenólicos puede dar lugar a la formación de compuestos coloreados, dado que los grupos hidroxilo actúan como activadores del anillo bencénico al donarle densidad, esto ocasiona que la aromaticidad del anillo se debilite, adquiriendo más las características de un polieno conjugado. El ión hierro (III) es un oxidante moderado capaz de inducir la conversión de un pirogalol a una ortoquinona hidroxilada (que proporciona la coloración azul) y, en concentraciones de pirogalol aún mayores, promover la formación de un polímero de la quinona formada, obteniendo un producto con un sistema pi muy largo y, por tanto, absorción en todo el espectro.

Según las normas Salvadoreñas se establecen dos reacciones de identificación de flavonoides; la reacción con acetato de plomo y la reacción de Shinoda, ambas reacciones deben ser positivas para que el producto sea aceptado. Una precipitado amarillento o una solución turbia, color amarillo opaco es prueba positiva con acetato de plomo, mientras que una coloración anaranjada, roja, verde, azul o violeta es prueba positiva con la reacción de Shinoda (8).

En la tabla 1 se observa los resultados obtenidos después de aplicar las pruebas de identificación de flavonoides; en la reacción con acetato de plomo se obtuvo un precipitado amarillo. La reacción con el acetato de plomo se fundamenta en formación de un complejo coloreado entre el plomo y los di y polihidroxifenoles como las flavonas, flavonoles, flavanonas dihidroxiladas, flavanoles y antocianidinas di y trihidroxiladas. En la reacción de Shinoda se observó una coloración rojo púrpura. Las coloraciones observadas en esta reacción se ajustan a lo indicado en la norma Salvadoreña.

Los flavonoides con el núcleo benzopirona (p. ej. flavonas, flavonoles, flavanonas, etc.) producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado. Aunque no se conoce el mecanismo de esta prueba, es muy utilizada para reconocer esta clase de compuestos.

La cuantificación de flavonoides en los extractos etanólicos de propóleos es considerado también como un parámetro de calidad por la Norma IRAM 15935-2 así como también la Norma Salvadoreña (esta última lo considera para los propóleos en bruto) que a diferencia de la Norma Rusa vigente RST-RSFR-317-77 que establece la determinación porcentual de compuestos flavonoides, las dos primeras normas establecen no sólo la identificación cualitativa de compuestos flavonoides, sino también la cuantificación de estos compuestos (8,9,10).

La Norma IRAM 15935 – 2 para extracto etanólico de propóleos, la cual considera como mínimo concentraciones de 0,25 g de flavonoides totales expresados en quercetina por 100 g de extracto seco (9). En la tabla 3 se observa que el porcentajes (g/100g e.s.) de

flavonoides totales expresados en quercetina es de $8,71 \pm 0,799$, estos valores se encuentran dentro de lo establecido por la norma.

CONCLUSIONES

- La concentración de flavonoides totales en el extracto etanólico de propóleos es de 8,71g/100g de extracto seco.
- El espectro UV de los flavonoides revela que se trata de un flavonol.

Conflicto de Intereses

No se presentan.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bedacarrasbure E, Maldonado L, Alvarez A y Maidana J. El propóleos. Un valioso producto de la colmena. [Artículo en línea]. ApiNetLA: Red Apícola Latinoamericana 2001; 5. <<http://www.apinetla.com.ar/ar/divulgacion/.../pplsnoa.htm>>. [consulta: 19 de agosto 2009].
2. Chaillou L, Herrera H, y Maidana J. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. [artículo en línea]. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2004; 24(1). <<http://www.scielo.br/pdf/0D/cta/v24n1/20033.pdf>>. [consulta: 19 de agosto 2009].
3. Del Río PI. Actividad Biocida de un Propolis Chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: Estudio in vitro. [artículo en línea]. Chile: Universidad de Chile Facultad de Odontología Departamento de Patología Área de Microbiología – 2006. <http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/delrio_p/sources/delrio_p.pdf>. [consulta: 19 de agosto 2009].
4. López J, Ubillus M. Estandarización del propóleos de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco como materia prima para su utilización a nivel industrial. [artículo en línea]. Lima – Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica – 2004. <http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2004/lopez_vj/html/indexframes.html>. [consulta: 19 de agosto 2009].
5. Salamanca G, Correa L, Principal J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. [artículo en línea]. Zootecnia Tropical – 2007; 25 (2). <<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2375227>>. [consulta: 21 de agosto 2009].
6. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. Propolis and human health. [artículo en línea]. Ars. Pharmaceutica – 2004; 45 (1). <http://www.craoecanela.com/propolis_1.pdf>. [consulta: 21 de agosto 2009].
7. Lock O, Cabello I, Doroteo V. Análisis de flavonoides en plantas. [artículo en línea]. Pontificia Universidad Católica del Perú – 2006. <http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-6.pdf>. [consulta: 21 de agosto 2009].
8. Norma Salvadoreña. NSO 65.19.02:03 Calidad de propóleo crudo. [artículo de periódico en línea]. CONACYT – 2003. <<http://faolex.fao.org/docs/pdf/els49789.pdf>>. [consulta: 21 de agosto 2009].
9. Russian Regional Standards RSFSR Norma Rusa RS-RSFR-317-77. (1977). <<http://www.api-guia.com.ar/propoleos/metodos-analiticos.htm>>. [consulta: 21 de agosto 2009].