

METABOLITOS SECUNDARIOS, CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y  
FLAVONOIDES TOTALES DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEOS DE  
TRES LOCALIDADES DEL PERÚ

SECONDARY METABOLITES, QUANTIFICATION OF PHENOLS AND TOTAL  
FLAVONOIDS OF ETHANOL EXTRACTS OF PROPOLIS FROM THREE  
PERUVIAN LOCATIONS

*Marilú Roxana Soto-Vásquez\**

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos determinar los metabolitos secundarios y cuantificar los fenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. Los propóleos fueron recolectados de Piura, Ayacucho y Pucallpa. El tamizaje fitoquímico se realizó haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación. Los fenoles y flavonoides totales se cuantificaron con el método de Folin-Ciocalteu y el de formación de complejos con  $\text{AlCl}_3$  al 2 %, respectivamente. Se encontró una alta diversidad de metabolitos secundarios como catequinas, lactonas, triterpenos y esteroides, antocianidinas, flavonoides, fenoles y taninos en los extractos etanólicos de propóleos de Piura, Ayacucho y Pucallpa; además de encontrarse alcaloides (Piura), saponinas (Pucallpa) y quinonas (Piura y Ayacucho). El contenido de fenoles y flavonoides totales osciló entre los valores de  $60.5 \pm 0.10$  hasta  $78.6 \pm 0.20$  mg de GAE/g de EEP y  $28.5 \pm 0.10$  hasta  $42.5 \pm 0.10$  mg QE/g EEP respectivamente. El extracto etanólico del propóleo proveniente de Ayacucho presentó mayor contenido de fenoles y flavonoides totales.

**Palabras clave:** propóleo, fenoles, flavonoides, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

This work was developed to determine the secondary metabolites and quantify total phenols and flavonoids in ethanolic extracts of propolis from three localities in Peru. Propolis were collec-

---

\* Docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. E-mail:msoto@unitru.edu.pe

ted from Piura, Ayacucho and Pucallpa. The phytochemical screening was performed using staining and precipitation reagents. Total phenols and flavonoids were quantified by the Folin-Ciocalteu and complexing with  $AlCl_3$  2 %, respectively. It was found a high diversity of secondary metabolites such as catechins, lactones, triterpenes and steroids, anthocyanins, flavonoids, phenols and tannins in the ethanol extracts of propolis from Piura, Ayacucho and Pucallpa; besides it was found alkaloids (Piura) saponins (Pucallpa) and quinones (Piura and Ayacucho). The content of phenols and total flavonoids ranged from  $60.5 \pm 0.10$  to  $78.6 \pm 0.20$  mg GAE / g of EEP and  $28.5 \pm 0.10$  to  $42.5 \pm 0.10$  mg QE / g EEP respectively. The ethanol extract of propolis from Ayacucho showed the highest contents of total phenols and flavonoids.

**Keywords:** propolis, phenols, flavonoids, secondary metabolites.

## INTRODUCCIÓN

El propóleo, palabra que deriva del griego pro (en defensa de) y polis (la ciudad) es una sustancia compleja, elaborado por las abejas a partir de resinas, aceites esenciales y polen que colectan en sus zonas de vida (1). Una vez colectado el material es enriquecido con secreciones salivares y enzimáticas, para luego ser usado en la construcción y reparación de la colmena, sellar grietas y construir panales; así como agente microbicida y desinfectante, por tanto es el responsable directo de garantizar la asepsia de la colmena, siendo ésta un ambiente prolífero para el desarrollo de virus y bacterias, debido a sus condiciones de temperatura y humedad (2). Su composición química es compleja y depende de la flora presente en el área de recolección; así como de factores ambientales; sin embargo algunos autores plantean la existencia de alrededor de 18 componentes, de entre los que destacan los flavonoides tales como flavonas, flavones y flavononas (3). También se han reportado alcoholes, aldehídos, aminoácidos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, ácidos grasos, ácidos p-cumáricos prenilados, ácidos cafeoilquínicos, lignanos, ácidos diterpénicos, triterpenos, esteroides y azúcares (4).

Este producto ha sido usado desde la antigüedad por los egipcios para embalsamar cadáveres, en Grecia y Roma era utilizado por los médicos como agente antiséptico y cicatrizante, y entre las culturas precolombinas fue utilizado por los Incas como sustancia antipirética (5). Actualmente, diversos estudios sobre los propóleos han comprobado un amplia gama de propiedades biológicas, tales como: antibacteriana, antifúngica, antiprotozoarios, antiviral, e incluso puede presentar efectos sinérgicos con algunas drogas antimicrobianas (6). Las propiedades antipirética, antiinflamatoria del propóleo también han sido comprobadas (7), por lo que el extracto etanólico de propóleo es administrado en tratamientos rápidos para fiebre y dolor de garganta. Además, se han comprobado las propiedades antiulcerosa, hepatoprotectora, antitumoral; así como antioxidante (8-10). Por tales motivos el propóleo es usado en el sector de la industria farmacéutica; sin embargo, sus propiedades le han otorgado también un uso en los sectores agrícola, cosmético y alimentario (11). En este último, se ha empleado en la elaboración alimentos funcionales, y como conservante de frutas y alimentos congelados (12, 13). Varias actividades biológicas del propóleo son conferidas, en su mayoría a compuestos fenólicos como los flavonoides. Los compuestos fenólicos están conformados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo oxhidrilo. En cambio los flavonoides están conformados por una estructura básica que consiste de dos anillos

bencénicos en los extremos de la molécula, unidos por un anillo de tres átomos de carbono a la que se le pueden adicionar grupos tales como oxhidrilos, metilos, azúcares, etc., generándose de esta manera diferentes tipos de flavonoides tales como flavonoles, flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonoides. Estos fitoquímicos pueden presentar diferentes mecanismos que se complementen o sean sinérgicos en la neutralización de los agentes oxidantes, estimulación del sistema inmune, regulación de la expresión de genes implicados en la proliferación y apoptosis celular, regulación del metabolismo de hormonas y efecto antiviral. Por ello, en los últimos años, a partir del estudio MONICA realizado por la OMS en 1989 se despertó un gran interés al comprobarse que países con consumo de alimentos y bebidas con alto contenido de polifenoles y flavonoides tiene menos tasas de mortalidad por enfermedades degenerativas y cardiovasculares (14). Esto ha hecho que la comunidad científica vuelque su interés en productos naturales que contribuyan a reforzar la prevención y reduzcan el riesgo de padecer enfermedades, por tal motivo el interés de cuantificar estos constituyentes lo que proporciona una herramienta útil que permita la elaboración de productos con elevado valor añadido debido a su alta concentración en compuestos biológicamente activos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección del propóleo

Las muestras de propóleo provenientes de abejas *Apis mellifera*, se obtuvieron de los apiarios de las localidades de Piura, Ayacucho y Pucallpa. La recolección se realizó mediante el método de raspado, donde se utilizó una espátula de acero inoxidable para remover el producto adherido en las caras laterales, tapa y entretapa de cada cajón. Todas las muestras se recolectaron entre los meses de setiembre y octubre del 2014. El muestreo se efectuó en forma aleatoria de diferentes colmenas de cada apiario para formar una muestra compuesta representativa de cada localidad. Posteriormente, se introdujeron en frascos de vidrio estériles para evitar la contaminación de las muestras.

### Preparación del extracto de propóleo

Antes de preparar los extractos, se procedió a eliminar las impurezas visibles que se encontraron en el propóleo, tales como virutas de madera, partes de abejas, restos vegetales.

Las muestras de propóleo en bruto fueron fraccionadas en trozos de 2 cm aproximadamente y fueron colocados en refrigeración a 0 °C por 24 horas para solidificarlas. Luego, se trituraron los trozos en un mortero y se pesaron por separado 30 g de muestra sometiendo a extracción sucesiva con 100 mL de etanol al 96 °GL (3 x 100 mL) en un agitador magnético, durante 48 horas, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente, el material se filtró a través del papel filtro Whatman n.º 40. A los filtrados combinados, se les eliminaron las ceras mediante precipitación y filtración con adición de agua destilada (50 mL) y refrigeración del extracto a -18 °C. Finalmente, se evaporó el solvente de los filtrados en un evaporador rotatorio a presión reducida a una temperatura de 40 °C. Los extractos etanólicos obtenidos (EEP) se almacenaron en viales ámbar y se refrigeraron a -18 °C hasta su posterior evaluación (1).

### Determinación de metabolitos secundarios

Para la identificación de los distintos grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de propóleos se emplearon las técnicas y el procedimiento descrito por Miranda & Cuéllar (15).

#### Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Singleton y Rossi (16) modificado por Palomino *et al.* (2). En un tubo de reacción se adicionaron 50  $\mu$ L de solución etanólica de propóleo, 800  $\mu$ L de agua y 100  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu (grado analítico, Merck). Se agito y luego se dejó en reposo por 8 minutos. Posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %. Después de 1 hora en la oscuridad se leyó la absorbancia a 760 nm. Se usaron soluciones de ácido gálico (Sigma-Aldrich®) entre 50-500  $\mu$ g/mL para construir la curva de calibración (Gráfico 1). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de EEP. Este procedimiento se efectuó con cada uno de los propóleos objeto de estudio por triplicado

#### Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales de los extractos etanólicos fue determinado por el método de Kumazawa, Hamasaka & Nakayama (10). A una alícuota de 0,5 mL de solución etanólica de propóleo, se le adicionaron 0,5 mL de solución etanólica de AlCl<sub>3</sub> al 2 %. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 420 nm. Se usaron soluciones de quercetina (Sigma-Aldrich®) entre 5-25  $\mu$ g/mL, para construir la curva de calibración (Gráfico 3). El contenido de flavonoides totales fue calculado como mg equivalentes de quercetina (QE)/g de EEP. Este procedimiento se efectuó con cada uno de los propóleos objeto de estudio por triplicado.

## RESULTADOS

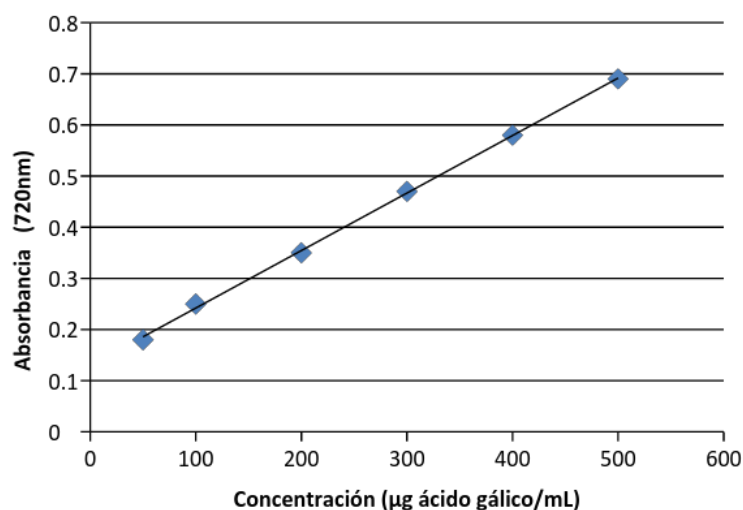
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios de los extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú

Metabolitos	Ensayos	Procedencia del propóleo		
		Piura	Ayacucho	Pucallpa
Catequinas	Catequinas	+	+	+
Lactonas	Baljet	+	+	+
Triterpenos y esteroides	Liebermann - Burchard	+	+	+
Saponinas	Espuma	-	-	+
Fenoles y taninos	Cloruro Férrico	++	+++	+
Quinonas	Bornträger	+	+	-
Flavonoides	Shinoda	++	+++	+
Cardenólicos	Kedde	-	-	-
Antocianidina	Antocianidinas	+	+	+
Alcaloides	Dragendorff	+	-	-
	Mayer	+	-	-
	Wagner	+	-	-

Intensidad: (+): poca; (++): moderada; (+++): alta.

Identificación: (+): presencia (-): ausencia

**Gráfico 1.** Curva de calibración del ácido gálico (para cuantificación de fenoles totales)



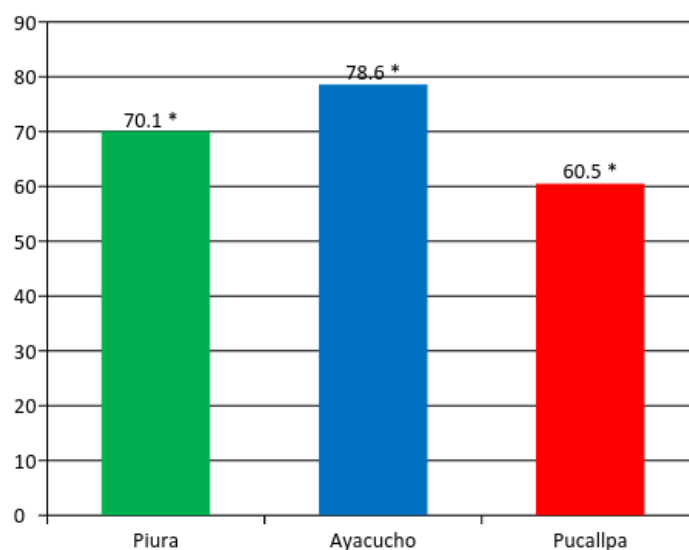
**Tabla 2.** Fenoles totales en los extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú

Localidad	N	Fenoles totales (mg GAE/g EEP)* valor medio ±desviación estándar	F	Sig.
		Piura		
Ayacucho	3	78.6±0.20	12300.500	0.000**
Pucallpa	3	60.5±0.10		

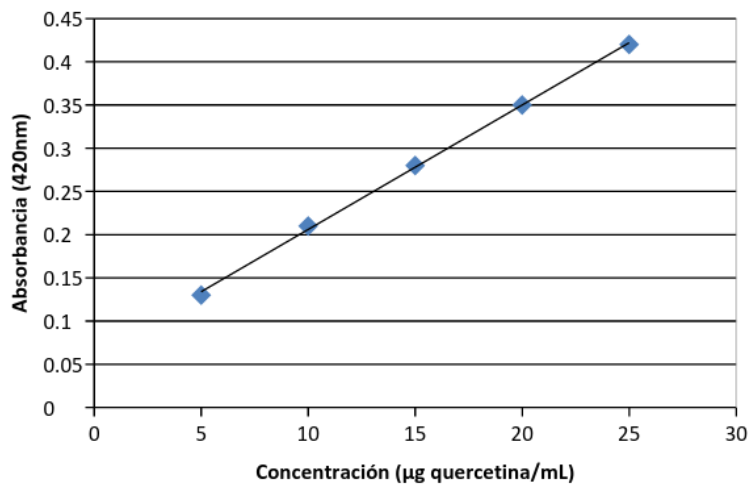
\* miligramos de ácido gálico (GAE)/gramo de extracto etanólico de propóleo (EEP).

\*\*ANOVA de un factor/HSD de tukey (p<0.05)

**Gráfico 2.** Fenoles totales en los extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú



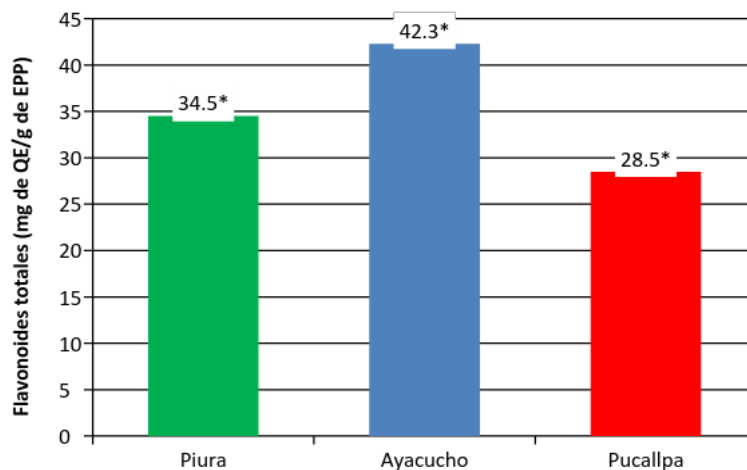
\*: Diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de un factor/HSD de tukey (P • 0.05.)

**Gráfico 3.** Curva de calibración de la quercetina (para cuantificación de flavonoides totales)**Tabla 3.** Flavonoides totales en los extractos etanólicos de propóleos de procedentes de tres localidades del Perú

Flavonoides totales				
Localidad	N	(mg QE/g EEP)*	F	Sig.
		valor medio ±desviación estándar		
Piura	3	34.5±0.17	8618.400	0.000**
Ayacucho	3	42.5±0.10		
Pucallpa	3	28.5±0.10		

\* miligramos de quercetina (QE)/gramo de extracto etanólico de propóleo (EEP).

\*\*ANOVA de un factor/HSD de tukey ( $p < 0.05$ )

**Gráfico 4.** Fenoles totales en los extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú

\*: Diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de un factor/HSD de tukey ( $P < 0.05$ .)

## DISCUSIÓN

El propóleo es una sustancia compleja, constituida por una gran variedad de compuestos químicos y cuya composición varía según la fuente de procedencia. Es así que en el presente trabajo de investigación se evidencia una gran variabilidad de metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de propóleo de tres localidades del Perú (Piura, Ayacucho y Pucallpa) encontrándose catequinas, lactonas, triterpenos y esteroides, antocianidinas, flavonoides, fenoles y taninos; evidenciándose la presencia de alcaloides solo en el propóleo de Piura, saponinas en el propóleo de Pucallpa y quinonas en los propóleos de Piura y Ayacucho (Tabla 1). Estos metabolitos coinciden con lo reportado en otros trabajos de investigación del propóleo (17-19). La presencia o ausencia de algunos metabolitos secundarios en el propóleo depende mucho de la flora del área donde es recolectado, los fenómenos locales influenciados por la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa, brillo solar y la evapotranspiración (20).

La gran variabilidad de metabolitos secundarios presentes en el propóleo justifica las diversas actividades biológicas como antibacteriana (3), antifúngica (21), antiviral, antiprotozoaria (22), inmunoestimulante (23), antiinflamatoria, analgésica (24), antioxidante (25), antitóxica y cicatrizante (4). La presencia de fenoles y flavonoides en el propóleo son en gran parte responsables de estas actividades (14). Estos metabolitos desempeñan un papel considerable en la terapéutica porque poseen importantes funciones antioxidantes que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo de esta manera a reducir el riesgo de afecciones cardiovasculares por su acción directa en los capilares sanguíneos y el envejecimiento (25).

Los fenoles y flavonoides son considerados como indicadores de calidad por los entes reguladores de la producción de propóleos en países, como Brasil (26) y Argentina (27). Los resultados consignados en la tabla 2 y gráfico 2 indican que el contenido de compuestos fenólicos totales oscila entre valores que de 60.5 mg hasta 78.6 mg de GAE/g de EEP. La muestra de Ayacucho presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos (78.6 mg de GAE/g de EEP) seguido de los propóleos de Piura (70.1 mg de GAE/g de EEP) y Pucallpa (60.6 mg de GAE/g de EEP) con diferencias estadísticamente significativas (test ANOVA,  $p < 0.05$ ). Estos datos se encuentran dentro del rango reportado por Palomino *et al.* (1), y por encima de lo reportado por Bedascarrasbure *et al.* (14). En sí, todas las muestras analizadas superan el requisito mínimo (50 mg de GAE/g de EEP), establecido por la legislación brasilera y argentina para la presencia de compuestos fenólicos, como determinante de la calidad.

Respecto a la cuantificación de flavonoides totales, según la tabla 3 y gráfico 4, los valores oscilan entre (28,5 hasta 42.5 mg QE/g EEP), siendo el propóleo de Ayacucho el que presentó mayor contenido (42.5mg QE/gEEP), seguido del propóleo de Piura (34.5 mg QE/g EEP) y Pucallpa (28.5 mg QE/g EEP) con diferencias estadísticamente significativas (test ANOVA,  $p < 0.05$ ) (tabla 3 y figura 3). Estos valores al compararlos con otras investigaciones se encuentran dentro del rango establecido por Bedascarrasbure, *et al.* (14); Yoong (28); Salamanca (29), Rodríguez *et al.* (30); y por debajo de lo reportado por Rengifo (31). Asimismo, la Norma IRAM 15935-2 considera que el extracto etanólico de propóleo debe presentar como mínimo concentraciones

de 0,25 g de flavonoides totales expresados en quercetina por 100 g de extracto seco (27). Por otro lado, siguiendo esta misma normativa argentina y tomando en cuenta también la normativa brasileña (26), mencionan que los extractos de propóleo para ser utilizados como materia prima en el desarrollo de productos deben tener como mínimo 5 mg QE/g de EEP, lo que indica que los propóleos evaluados satisfacen los requisitos de calidad.

Las diferencias de las cantidades de fenoles y flavonoides en el propóleo están determinadas principalmente por la flora del área ecológica, los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas que condicionan cambios en las concentraciones de las mismas, microorganismos presentes en el entorno geográfico, factores climatológicos (2).

Los resultados obtenidos permiten afirmar que los propóleos presentan un elevado contenido de compuestos biológicamente activos como fenoles y flavonoides, existiendo diferencias significativas entre regiones, lo que sustenta la necesidad de estandarizar los diferentes tipos de propóleos.

## CONCLUSIONES

- Se evidencia una gran variabilidad de metabolitos secundarios en los extractos etanólicos de propóleos procedentes de Piura, Pucallpa y Ayacucho (catequinas, lactonas, triterpenos y esteroides, antocianidinas, flavonoides, fenoles y taninos). Sólo alcaloides y saponinas se encontraron en los extractos etanólicos de Piura, Pucallpa respectivamente y quinonas en los extractos etanólicos de propóleo de Piura y Ayacucho.
- El contenido de fenoles y flavonoides totales osciló entre valores que van desde  $60.5 \pm 0.10$  hasta  $78.6 \pm 0.20$  mg de GAE/g de EEP y  $28.5 \pm 0.10$  hasta  $42.5 \pm 0.10$  mg QE/g EEP respectivamente. Siendo el extracto etanólico de propóleo de Ayacucho el que presentó mayor contenido de fenoles y flavonoides totales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palomino, L., García C., Gil, J., Rojano, B., Durango, R. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3):388-395.
2. Palomino, L., Martínez, J., García, C., Gil, J., Durango, D. (2010). Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 63(1): 5373-5383.
3. Tolosa, L., Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars. Pharmaceutica*, 43(1-2) 37-55.



4. Marcucci M. C., Ferreres F., García-Viguera C., Bankova V. S., De Castro S. L., Dantas A. P. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol*, 74(2):105-112.
5. Muñoz L., Linares S., Narváez, W. Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Biosalud*. 2011; 10(2): 101-111.
6. Kujumgiev, A., I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov And S. Popov. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol*. 1999; 64(3): 235-240.
7. Dobrowolski, J., Vohora, S., Sharma, K., Shah, S., Naqvi, S., Dandiya, P. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol*. 1991; 35(1):77-82.
8. Barros, M., Lemos, M., Maistro, El., Leite, Mf., Sousa, Jp., Bastos, Jk., *et al.* Evaluation of anti-ulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *J. Ethnopharmacol*. 2008; 120 (3): 372-377.
9. El-Khawaga, O., Salem, T., Elshal M. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clin. Chim. Acta*. 2003; 338 (1-2): 11-16.
10. Kumazawa, S., Hamasaka and Nakayama T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food. Chem.*, 84(3): 329-339.
11. Matsuka, M. (2000). Criteria of propolis in Japan. *Japan Propolis Conference*. Tokio: Japan Health Food and Nutrition Food Association, p. 4.
12. Medić-Šarić, M., Rastija, V., Bojić M., Maleš, Z. (2009). From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutr. J.* 8(33): 1-18.
13. Mizuno, M. (1989). Food packaging materials containing propolis as a preservative. *Japanese Patent* 01 243 974 [89 243 974].
14. Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. *Acta Farm. Bonaerense*, 23 (3): 369-72.
15. Miranda, M., Cuéllar, A. (2002). *Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales*. La Habana: Universidad de La Habana.
16. Singleton, V., Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16(1): 144-158.
17. Sartorio, Yn., Bracho, Jc., Valdés, G., Piloto, A., Gastón, G., García, G., *et al.* (2000). Estudio preliminar de la estabilidad del extracto hidroalcohólico de propóleos al 5 % por el método cinético isotérmico acelerado y su efecto acelerador de la epitelización. *Apiciencia*, 2(2): 1-12.

18. Cuesta O., Cuéllar Ca., Vazquez, A., Ferraz, Ib., Rodríguez Gj., Agüero Aj., *et al.* Estudio químico y microbiológico de dos muestras de propóleos pardo de origen cubano. En: Sesión Plenaria, IV Simposio de Propóleos y III de Apiterapia. LaHabana. 1996.
19. Casanova, V. *Estudio químico, microbiológico y toxicológico de una del propóleos venezolano*. [Tesis para optar el grado de Máster]. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. 1995.
20. López del Villar, J., Ubillús, M. (2004). *Estándarización del propóleo de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial*. [Tesis para optar el grado de Químico Farmacéutico]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
21. Hegazi, A., El Hady, A., Allah, A. (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z. Naturforsch*, 55(1-2):70-75.
22. Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A. (2004). El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 1: 21-43.
23. Bratter, C., Tregel, M., Liebenthal, C., Volk, H. D. (1999). Prophylactic effectiveness of propolis for immunostimulation: A clinical pilot investigation. *Forsch Komplementarmed*, 6(5):256-260.
24. Mirzoeva, O., Calder, P. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 55(6):441-449.
25. Sun, F, Hayami, S., Haruna., S, Ogiri, Y., Tanaka, K., Yamada, Y. (2000). In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxidases in rats. *J. Agric. Food. Chem.*, 48(5):1462- 1465.
26. Ministerio de Agricultura de Brasil-Apacame, Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas Européias. (1999). Regulamentos técnicos para fixação de identidade e qualidade de própolis. *Rev. Mensagem Doce.*, 52(3):13-14.
27. Instituto Argentino de Normalización. (2004). *Norma IRAM-INTA 15935-2 Scheme 1*. Subcomité de productos agroalimentarios del NOA. Buenos Aires.
28. Yoong, A. (2004). *Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya* [tesis Tesis para optar el grado de Ingeniero Agroindustrial]. Universidad Zamorano.
29. Salamanca, G. (2005). Propiedades nutricionales y apiterapéuticas de los productos de la colmena. En: *Memorias I Congreso Internacional de Apicultura de los Andes*. III Convención de Apicultores. Tachira; Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal. pp. 5-14.
30. Rodríguez, Y., Sánchez-Catalán, Y., Rojano, B., Durango, D., Gil, J., Marín-Loaiza, J. (2012). Caracterización físicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. *Rev. Udcaactual. Divulg. Cient*, 5(2): 303-311.

31. Rengifo, R. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. *Pharmacien-  
cia*, 1(2): 51-56.