



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE  
TRES MUESTRAS DE PROPÓLEOS ECUATORIANOS

CARRASCO MAXI LESLIE MALENI  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

CEPEDA GRANDA NATALY SILVANA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2020



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE  
DE TRES MUESTRAS DE PROPÓLEOS ECUATORIANOS

CARRASCO MAXI LESLIE MALENI  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

CEPEDA GRANDA NATALY SILVANA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2020



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES  
MUESTRAS DE PROPÓLEOS ECUATORIANOS

CARRASCO MAXI LESLIE MALENI  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

CEPEDA GRANDA NATALY SILVANA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

CAMPO FERNANDEZ MERCEDES

MACHALA, 17 DE DICIEMBRE DE 2020

MACHALA  
2020

# TESIS TITULACIÓN 2020

## INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE  
INTERNET

1%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL  
ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

[dspace.esPOCH.edu.ec](https://dspace.esPOCH.edu.ec)

Fuente de Internet

<1%

2

[worldwidescience.org](https://www.worldwidescience.org)

Fuente de Internet

<1%

3

[archive.org](https://www.archive.org)

Fuente de Internet

<1%

4

[digital.csic.es](https://digital.csic.es)

Fuente de Internet

<1%

5

[doi.org](https://doi.org)

Fuente de Internet

<1%

6

Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS

Trabajo del estudiante

<1%

7

Submitted to Universidad Santo Tomas

Trabajo del estudiante

<1%

8

[revistas.inia.es](https://revistas.inia.es)

Fuente de Internet

<1%

9

[secure.dslabs.com](https://secure.dslabs.com)

Fuente de Internet

<1%

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Las que suscriben, CARRASCO MAXI LESLIE MALENI y CEPEDA GRANDA NATALY SILVANA, en calidad de autoras del siguiente trabajo escrito titulado CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES MUESTRAS DE PROPÓLEOS ECUATORIANOS, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Las autoras declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Las autoras como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 17 de diciembre de 2020



CARRASCO MAXI LESLIE MALENI  
0704650845



CEPEDA GRANDA NATALY SILVANA  
1724332067

## DEDICATORIA

A Dios, por el regalo de la vida, por las bendiciones recibidas y por permitirme gozar de este momento tan crucial en mi formación académica.

A mi madre Katherine Maxi, quien representa el pilar fundamental en mi vida y mi más grande ejemplo de esfuerzo, valentía y sacrificio. Su amor y su apoyo incondicional jamás me han faltado.

A mi esposo Danilo Aguilar, mi leal compañero de vida, quien con su amor, su paciencia y su respaldo, me ayuda a alcanzar cada uno de mis objetivos.

Y, por supuesto, a mi hija, quien es mi vida entera y mi principal fuente de motivación para superarme día tras día, con el propósito de proporcionarle bienestar y un mejor porvenir. Ellos son el motor de mi vida.

Leslie Carrasco

A Dios, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mi madre, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ella he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Es un orgullo y privilegio ser su hija, es la mejor madre.

Nataly Cepeda

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, mi agradecimiento está dirigido a Dios por darme la vida, por ser la luz que ilumina el camino correcto forjando mi destino y por cada una de sus bendiciones.

A mi madre, por su confianza, por los valores inculcados, por su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi formación académica y de mi vida, a pesar de la distancia.

A mi esposo Danilo Aguilar, por confiar y creer en mí. Por la paciencia, comprensión y apoyo que me brinda, los cuales me permiten alcanzar mis objetivos de la mejor manera.

Finalmente, expreso mi más sincero agradecimiento a la tutora Lcda. Mercedes Campo, por su tiempo y dedicación al compartir sus conocimientos los cuales se verán reflejados en este trabajo.

Leslie Carrasco

Quiero expresar mi gratitud a Dios, por guiarme a lo largo de mi existencia, por ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Gracias a mi madre, por confiar y creer en mí, por los consejos, valores y principios que me ha inculcado.

A la Lcda. Mercedes Campo, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

Nataly Cepeda

## RESUMEN

El propóleo es un producto natural de apariencia resinosa, el cual es fabricado por las abejas *Apis mellifera* a partir de la recolección selectiva de exudados vegetales, los que se mezclan con secreciones salivales y cera de abejas. Sus características organolépticas, composición química y actividad biológica, dependen directamente de la flora circundante, zona geográfica e incluso de la época de recolección.

Esta investigación tuvo como objetivo analizar la composición química de muestras de propóleo de las provincias de Imbabura, Pichincha y Los Ríos, a través de métodos cromatográficos y espectroscópicos, para establecer la relación existente con su posible actividad antioxidante.

Las muestras de propóleo fueron recolectadas en el apiario Mieles y Colmenas “Tabacundo”, posteriormente, se sometieron a extracción por maceración dinámica, utilizando metanol como disolvente. Los extractos se llevaron a un rotaevaporador y se concentraron a sequedad, obteniendo así los extractos secos de propóleo (ESP). El rendimiento logrado para cada una de las muestras de propóleo, resultó ser bueno, con valores cercanos al 50%. Los ESP fueron almacenados en condiciones adecuadas para su posterior estudio.

El análisis preliminar de la composición química de los ESP se realizó mediante un tamizaje fitoquímico, buscando la identificación de compuestos fenólicos y flavonoides, seguido de una evaluación mediante cromatografía en capa delgada (CCD). Los ensayos cualitativos realizados sugirieron la presencia, en las tres muestras, de compuestos fenólicos en general y de flavonoides, además de mostrar capacidad antioxidante. Adicionalmente, se sugiere un comportamiento cromatográfico similar para las tres muestras y la existencia de metabolitos de estructura terpénica.

Posteriormente, se procedió a cuantificar fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu y flavonoides mediante el método colorimétrico del tricloruro de aluminio. La muestra procedente de Pichincha (PE-20) presentó la mayor cantidad de compuestos fenólicos (EAG) y de flavonoides (EQ), seguida de la muestra de Imbabura (PE-22) y de Los Ríos (PE-21), respectivamente.

Además, se determinó la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity), utilizando los ensayos de DPPH y FRAP. La muestra PE-20 presentó la mayor capacidad antioxidante, determinada por ambos ensayos. Sin

embargo, aunque la muestra PE-21 resultó ser más efectiva que la PE-22 para reducir el ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ); en relación a la capacidad secuestradora del DPPH, no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Colateralmente, se evaluó la cinética de la reacción con el DPPH, en las tres disoluciones de propóleos, conjuntamente con dos patrones de reconocida actividad antioxidante (quercetina y ácido ascórbico). Los resultados mostraron que las disoluciones PE-21 y PE-22, a la concentración ensayada, no lograron superar un porcentaje de inhibición superior al 30% (74,26 y 72,75% DPPH remanente, respectivamente), mientras que el propóleos PE-20 deja un porcentaje remanente del 58,30%. Según el ensayo realizado la quercetina y las muestras objeto de estudio presentan un comportamiento cinético intermedio, ya que el estado estacionario lo alcanzan entre los 5 min y los 30 min de reacción.

Las elevadas concentraciones de compuestos fenólicos totales y de flavonoides en la muestra procedente de Pichincha (PE-20), le atribuyeron la mejor capacidad antioxidante, por ambos modelos evaluados. Al analizar la correlación existente entre la capacidad antioxidante medida por ambos métodos, se evidencia que esta es positiva y muy fuerte. Las correlaciones correspondientes a los parámetros restantes ( $\text{TEAC}_{\text{DPPH}}$ /fenoles totales;  $\text{TEAC}_{\text{DPPH}}$ /flavonoides;  $\text{TEAC}_{\text{FRAP}}$ /fenoles;  $\text{TEAC}_{\text{FRAP}}$ /flavonoides) muestran un comportamiento que podría catalogarse como positivo medio.

Estudios posteriores estarían encaminados a realizar un análisis cualitativo y cuantitativo más detallado de los marcadores químicos de las tres muestras de propóleos, para establecer una mejor correlación con su actividad antioxidante. De igual manera se sugiere identificar el origen botánico de los propóleos estudiados.

**Palabras clave:** propóleos, capacidad antioxidante, FRAP, DPPH, flavonoides.

## ABSTRACT

Propolis is a natural resinous-looking product, which is manufactured by *Apis mellifera* bees from the selective collection of vegetable exuded, which are mixed with salivary secretions and beeswax. Its organoleptic characteristics, chemical composition and biological activity depend directly on the surrounding flora, geographical area and even the harvesting season.

This research aimed to analyze the chemical composition of propolis samples from the provinces of Imbabura, Pichincha and Los Ríos, through chromatographic and spectroscopic methods, to establish the existing relationship with their possible antioxidant activity.

The propolis samples were collected in the honey and hive apiary "Tabacundo", subsequently, they underwent extraction by dynamic maceration, using methanol as solvent. The extracts were taken to a rotoevaporator and concentrated dryly, thus obtaining the dry extracts of propolis (ESP). The yield achieved for each of the propolis samples turned out to be good, with values close to 50%. ESPs were stored under appropriate conditions for further study.

Preliminary analysis of the chemical composition of ESP was performed using phytochemical screening, seeking the identification of phenolic and flavonoid compounds, followed by a thin layer chromatography (CCD) evaluation. Qualitative trials suggested the presence, in all three samples, of phenolic compounds in general and flavonoids, as well as showing antioxidant capacity. In addition, similar chromatographic behavior is suggested for all three samples and the existence of terpenic metabolites.

Subsequently, total phenols were quantified using the Folin-Ciocalteu and flavonoid method using the colorimetric method of aluminium trichloride. The sample from Pichincha (PE-20) had the highest number of phenolic compounds (EAG) and flavonoids (EQ), followed by the sample of Imbabura (PE-22) and Los Ríos (PE-21), respectively.

In addition, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was determined using DPPH and FRAP assays. The PE-20 sample had the highest antioxidant capacity, determined by both trials. However, although the PE-21 sample proved to be more effective than PE-22 in reducing ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ion to ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ); in relation to the DPPH's hijacker capacity, they showed no statistically significant differences.

Collaterally, the kinetics of the reaction with DPPH were evaluated in the three propolis solutions, together with two patterns of recognized antioxidant activity (quercetin and ascorbic acid). The results showed that the PE-21 and PE-22 solutions, at the concentration tested, failed to exceed an inhibition rate of more than 30% (74.26 and 72.75% DPPH remaining, respectively), while the PE-20 propolis leaves a remaining percentage of 58.30%. According to the test performed quercetin and the samples under study have intermediate kinetic behavior, since the steady state reaches between 5 min and 30 min reaction.

The high concentrations of total phenolic compounds and flavonoids in the sample from Pichincha (PE-20), attributed the best antioxidant capacity, by both models evaluated. When analyzing the correlation between the antioxidant capacity measured by both methods, it is evident that it is positive and very strong. Correlations for remaining cases ( $TEAC_{DPPH}/total\ phenols$ ;  $TEAC_{DPPH}/flavonoids$ ;  $TEAC_{FRAP}/phenols$ ;  $TEAC_{FRAP}/flavonoids$ ) show behavior that could be categorized as average positive, among the parameters analyzed.

Subsequent studies would be aimed at performing a more detailed qualitative and quantitative analysis of the chemical markers of the three propolis samples, to establish a better correlation with their antioxidant activity. It is also suggested to identify the botanical origin of the propolis studied.

**Keywords:** propolis, antioxidant capacity, FRAP, DPPH, flavonoids.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	15
I.1. Propóleos	15
I.1.1. Generalidades	15
I.1.2. Historia	15
I.1.3. Métodos de recolección del propóleos	16
I.1.3.1. Raspado de la colmena	16
I.1.3.2. Rejillas o mallas plásticas	16
I.1.4. Métodos de extracción	17
I.1.4.1. Procedimiento de extracción general	17
I.1.4.2. Extracción de compuestos volátiles	17
I.1.5. Métodos de análisis utilizados en el estudio del propóleos	18
I.1.5.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)	18
I.1.5.2. Cromatografía en columna (CC)	19
I.1.5.3. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	19
I.1.5.4. Espectroscopía UV-VIS	19
I.1.5.5. Análisis espectrofotométrico de propóleos	19
I.1.5.6. Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	20
I.1.5.7. Resonancia magnética nuclear (RMN)	20
I.1.6. Composición química	20
I.1.7. Actividad biológica	21
I.1.7.1. Actividad antioxidante	22
I.1.7.2. Actividad antimicrobiana	22

I.1.7.3. Actividad antiinflamatoria	23
I.1.7.4. Actividad antitumoral	23
I.1.7.5. Otras actividades biológicas	24
<b>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
II.1. Muestras de propóleos	25
II.2. Preparación de los extracto de propóleos	25
II.3. Rendimiento del proceso de extracción del propóleos	26
II.4. Evaluación química preliminar de los extractos de propóleos	26
II.4.1. Tamizaje fitoquímico para la identificación de fenoles y flavonoides	26
II.4.2. Análisis mediante cromatografía en capa delgada (CCD)	26
II.5. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides	27
II.5.1. Determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu	27
II.5.2. Determinación cuantitativa de flavonoides totales	28
II.6. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity), utilizando los ensayos de DPPH y FRAP	28
II.6.1. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de FRAP (ferric ion reducing antioxidant power)	28
II.6.2. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	29
II.6.3. Determinación de la cinética de reacción con el DPPH	29
II.7. Análisis estadístico	30
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
III.1. Evaluación química preliminar de los extractos de propóleos	32
III.1.1. Tamizaje fitoquímico	32

III.1.2. Análisis mediante cromatografía en capa delgada (CCD)	33
III.1.2.1. Fase móvil hexano: acetato de etilo (7:3)	34
III.1.2.2. Fase móvil cloroformo:metanol (9:1)	36
III.2. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides	39
III.2.1. Cuantificación de fenoles totales	39
III.2.2. Cuantificación de flavonoides totales	41
III.3. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity), utilizando los ensayos de DPPH y FRAP	45
III.3.1. TEAC-(FRAP)	45
III.3.2. TEAC-(DPPH)	47
III.3.3. Correlación entre la composición química determinada y la actividad antioxidante	50
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	53
CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES	54
ANEXOS	55
BIBLIOGRAFÍA	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ensayos cualitativos ( $\text{FeCl}_3$ y Shinoda) de los extractos de las tres muestras de propóleos.	33
Figura 2. Análisis cromatográfico en placa delgada utilizando como fase móvil ( $\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ (7:3), y como fase estacionaria placas de sílica gel $\text{G}_{60}\text{F}_{254}$ .	35
Figura 3. Análisis cromatográfico en placa delgada utilizando como fase móvil $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1), y como fase estacionaria placas de sílica gel $\text{G}_{60}\text{F}_{254}$ .	37
Figura 4. Curva de calibración de ácido gálico para cuantificación de fenoles totales.	40
Figura 5. Curva de calibración de quercetina para la determinación de flavonoides totales.	42
Figura 6. Correlación entre fenoles totales y flavonoides totales presentes en las tres muestras de propóleos.	43
Figura 7. Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox por el método de FRAP.	46
Figura 8. Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox por el método del DPPH.	48
Figura 9. Cinética de la reacción con DPPH para las tres muestras de propóleos (PE-20, PE-21, PE-22).	49
Figura 10. Correlación entre la composición química determinada y la capacidad antioxidante de las tres muestras de propóleos.	51

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de las muestras de propóleos recolectadas.	25
Tabla 2. Cuantificación de fenoles totales en las tres muestras de propóleos analizadas.	41
Tabla 3. Cuantificación de flavonoides totales en las tres muestras de propóleos analizadas.	43
Tabla 4. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides en extractos alcohólicos (etanol o metanol) de propóleos de diferentes localizaciones geográficas.	44
Tabla 5. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) en las tres muestras de propóleos analizadas, según el método de FRAP.	47
Tabla 6. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) en las tres muestras de propóleos analizadas, según el método del DPPH.	48
Tabla 7. Correlaciones entre compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante.	52

## INTRODUCCIÓN

El propóleo es una mezcla de sustancias de apariencia resinosa que ha sido muy útil desde la antigüedad, principalmente en medicina tradicional, debido a sus diversas propiedades biológicas <sup>1,2</sup>. Las abejas *Apis mellifera* fabrican propóleos a partir de la recolección selectiva de exudados vegetales, los cuales se mezclan con secreciones salivales y cera de abejas <sup>3-6</sup>.

Las abejas utilizan el propóleo en la construcción de sus colmenas ya que al ser un material resinoso y pegajoso es eficaz para sellar agujeros existentes en las paredes de la colmena, evitando así el ingreso de invasores y, por ende, una posible contaminación; además, actúa como termorregulador de la colmena <sup>3,7-9</sup>.

Las características organolépticas del propóleo (olor, color y sabor) dependen de varios factores como: la composición química, la fuente botánica circundante, zona geográfica, época de recolección, entre otros <sup>10-12</sup>.

Estudios recientes demuestran que se han identificado más de 500 compuestos químicos en diversas muestras de propóleos, entre ellos, flavonoides, ácidos fenólicos, fenoles simples, ésteres alifáticos y aromáticos, cetonas aromáticas, terpenos, ácidos benzoicos, aminoácidos, aldehídos aromáticos, cumarinas, xantonas, ácidos orgánicos, alcoholes, esteroides, lignanos, estilbenos, vitaminas, azúcares, ácidos grasos, minerales, entre otros <sup>5,13-15</sup>.

La caracterización química es fundamental en relación al control de calidad y procesos de estandarización <sup>7</sup>. Los métodos analíticos más utilizados en la caracterización química de muestras de propóleos son los métodos cromatográficos y espectroscópicos <sup>1,6,9,16</sup>.

La actividad biológica del propóleo, al igual que la composición química, en gran medida es variada <sup>12,14</sup>. Estudios demuestran una alta capacidad antibacteriana y antifúngica; además, se le atribuye actividad antiviral, antiinflamatoria, antitumoral y antioxidante <sup>3,4,8,13,14,17,18</sup>.

Este producto natural desempeña, además, la función de fotoprotector, cicatrizante de heridas, antiasmático, inmunomodulador, antidiabético, antiplaquetario, hemostático, hepatoprotector, regenerador de tejidos, anestésico local y antiséptico <sup>2,13,19,20</sup>.

Cabe recalcar que la actividad biológica del propóleo se debe a su composición química, la cual, a su vez, depende directamente de las plantas de donde las abejas recolectan la

resina <sup>17</sup>. Por tal motivo, es de suma importancia conocer la vegetación circundante a la colmena para asociarla con su composición química <sup>4,6,8,19</sup>. Además, si el propóleo en estudio no ha sido analizado puede contener nuevos compuestos químicos de interés no solo investigativo, sino además terapéutico <sup>6</sup>.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La necesidad de analizar la composición química de tres muestras de propóleos ecuatoriano no estudiadas con anterioridad, a través de métodos cromatográficos y espectroscópicos, para establecer la relación existente con su posible actividad antioxidante.

## **HIPÓTESIS**

La composición química influye directamente en la actividad antioxidante del propóleos recolectado en diferentes provincias del Ecuador.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar la composición química del propóleos de las provincias de Imbabura, Pichincha y Los Ríos, a través de métodos cromatográficos y espectroscópicos, estableciendo la relación existente con su posible actividad antioxidante.

### **Objetivos específicos**

- Analizar la composición química de tres muestras de propóleos, en particular de compuestos fenólicos y flavonoides.
- Evaluar la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC, *trolox equivalent antioxidant capacity*), utilizando los ensayos de DPPH y FRAP.
- Correlacionar la composición química determinada en las tres muestras de propóleos, con la actividad antioxidante evaluada.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### I.1. Propóleos

#### I.1.1. Generalidades

El propóleos es un producto natural de tipo resinoso producido por las abejas, luego de recolectar el exudado de las plantas que se localizan en los alrededores de la colmena y mezclarlo con sustancias como secreciones salivales y enzimas propias de su metabolismo<sup>1-4</sup>. Lo utilizan como material de construcción para cubrir grietas o espacios existentes en la colmena, evitando la posible entrada de invasores<sup>17</sup>. Se considera esencial para la supervivencia de las abejas, al ser una potente “arma química” que proporciona un medio inadecuado para el crecimiento de microorganismos patógenos, evitando cualquier contaminación<sup>5-8</sup>.

Las características organolépticas y su composición química, dependen directamente de la flora circundante, zona geográfica e incluso de la época de recolección<sup>9</sup>. Su coloración es heterogénea pudiendo presentar colores verdes, distintas tonalidades de amarillo, tonos castaños o rojizos, en ocasiones pardo o negro<sup>10-12</sup>. Es resinoso, muy aromático y el agradable olor que presentan resulta característico de la vegetación de la cual las abejas han obtenido la resina<sup>6</sup>. En cuanto a su sabor, puede ser insípido, áspero o acre y su consistencia varía de acuerdo a la temperatura, pasando de flexible, blanda, y pegajosa a dura y quebradiza<sup>5,9</sup>.

#### I.1.2. Historia

El propóleos, desde tiempos remotos (aprox. 300 a.C), ha sido ampliamente utilizado por varias civilizaciones en la medicina ancestral, incluyendo la Inca, Egipcia, Persia y Grecorromana<sup>13,14</sup>. En efecto, la palabra “propóleos” tiene origen etimológico griego y está conformada por dos palabras: *pro*, que significa “en defensa de, en frente de”, y *polis*, que significa “ciudad o estado”. En conjunto, se traduce como “en defensa de la ciudad o defensor de la ciudad”; lo que guarda relación con la función protectora de la colmena<sup>15,16</sup>.

Dentro de las historias de civilizaciones como China, Hindú y Tibetana, al igual que en las civilizaciones antes mencionadas, hay registros de la utilidad del propóleos como medicina natural, siendo reconocido por su potente capacidad antiséptica, antimicrobiana y cicatrizante; propiedades que permitían su uso como ungüento para cicatrizar y sanar heridas<sup>13</sup>.

Además, en Egipto el propóleo era un producto ampliamente utilizado por los sacerdotes como medicina natural y como componente principal en el proceso de embalsamamiento o momificación de cadáveres <sup>17-19</sup>. Por otra parte, los Incas utilizaban el propóleo para controlar estados febriles y heridas infectadas, sobre todo ocasionadas por flechas <sup>10,20</sup>.

Durante las Guerra de los Bóeres (1880 – 1902), se utilizó propóleo vasógeno, que era una mezcla de propóleo y vaselina, para evitar el desarrollo de gangrena en heridas de guerra infectadas <sup>21</sup>.

A inicios del siglo XX, el uso del propóleo como medicina natural cesa por los avances tecnológicos. Es a partir de los años 70's que América, Rusia y China retoman el estudio de su composición química y actividad biológica <sup>22</sup>. Casi al finalizar el siglo XX se reconocen propiedades biológicas adicionales como la actividad antioxidante, antiinflamatoria, anestésica, antitumoral, antifúngica, antiviral, etc <sup>23,24</sup>.

Actualmente, países como Brasil, Colombia, Argentina, China, Japón, Polonia, México, Venezuela, Cuba, entre otros, reconocen su potencial terapéutico y lo han introducido en la industria farmacéutica con la finalidad de tratar numerosos padecimientos <sup>13,15,25,26</sup>. Además, el propóleo también ha ganado espacio en el campo de la industria cosmética como preservante y antioxidante natural, aprovechando también sus demás potencialidades biológicas <sup>27</sup>.

### **I.1.3. Métodos de recolección del propóleo**

#### **I.1.3.1. Raspado de la colmena**

Es el método más sencillo, rápido y barato que emplea el apicultor para obtener mayor cantidad de propóleo. Este método consiste en raspar aleatoriamente, con la ayuda de una espátula, las paredes internas de la colmena, con la finalidad de obtener el propóleo en forma de trozos; además de limpiar la colmena al término de la estación <sup>28</sup>.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que al emplear este método es difícil determinar la edad exacta del propóleo ya que en cada estación pueden quedar remanentes adheridos a la caja. Además, el propóleo se obtiene con una mayor cantidad de impurezas, incorporadas al momento de la recolección <sup>17,24</sup>.

#### **I.1.3.2. Rejillas o mallas plásticas**

Son trampas comerciales que permiten obtener menor cantidad de propóleo en comparación con el método de raspado de la colmena, pero con muy pocas impurezas,

por lo que se considera de mejor calidad <sup>24</sup>. Este método consiste en colocar láminas de plástico con ranuras (1,6 mm) en la superficie de la colmena, donde las abejas depositarán el propóleo para, posteriormente, someter la lámina a bajas temperaturas haciendo que el propóleo se vuelva duro y quebradizo, de tal manera que pueda retirarse por raspado <sup>6,15</sup>.

#### **I.1.4. Métodos de extracción**

##### **I.1.4.1. Procedimiento de extracción general**

El procedimiento de extracción general incluye la extracción dinámica por maceración, un tipo de extracción sólido-líquido donde la muestra es sumergida en el disolvente y los componentes afines con él, son solubilizados en el disolvente. Finalmente, se concentra en un rotaevaporador a presión reducida para remover el exceso de disolvente y proceder con su análisis <sup>12,23,29,30</sup>.

Dado que la mayor parte de principios activos del propóleo no son solubles en agua, el extracto del propóleo que permite un aprovechamiento absoluto de sus propiedades terapéuticas, debe ser de naturaleza alcohólica <sup>31</sup>. Estudios recientes han demostrado que otros factores como la temperatura, concentración del disolvente y el tiempo de extracción, también pueden influir notablemente en la extracción de compuestos bioactivos, especialmente los compuestos fenólicos y, por ende, influir en sus propiedades biológicas <sup>32,33</sup>.

Los disolventes más utilizados son etanol absoluto, metanol, mezclas hidroalcohólicas (etanol o metano/agua) y glicerol <sup>12,29,34,35</sup>. Otros investigadores han optado por el uso de cloroformo o hexano como disolvente, obteniendo también resultados favorables. Obviamente, el tipo de disolvente dependerá de los componentes que se pretende extraer de la muestra <sup>21</sup>.

##### **I.1.4.2. Extracción de compuestos volátiles**

Son numerosas las técnicas disponibles para extracción de compuestos volátiles, entre ellas tenemos la hidrodestilación, destilación al vapor, extracción por disolvente simple, destilación- extracción simultánea, extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción asistida por microondas (EAM) e incluso, la microextracción en fase sólida <sup>32,36,37</sup>.

Recientemente, científicos compararon las técnicas de extracción por maceración, EAU y EAM aplicadas a una muestra de propóleo, y determinaron que la EAU tuvo mayor

rendimiento de extracción en relación a los compuestos fenólicos extraídos, en especial el ácido p-cumárico, quien resultó ser el compuesto fenólico más prevalente en la muestra <sup>26,38</sup>.

Cabe recalcar que los compuestos volátiles, además de funcionar como una señal olfativa para las abejas tropicales que están encaminadas en la búsqueda de resina, son de gran importancia, ya que a ellos se les atribuye la aromaticidad y muchas de las propiedades biológicas de este producto natural <sup>39</sup>. He aquí la importancia de saber reconocer el mejor método para su extracción, el cual debe evitar en lo absoluto alterar su composición química <sup>17</sup>.

### **I.1.5. Métodos de análisis utilizados en el estudio del propóleo**

Los métodos analíticos mayormente utilizados en la identificación y caracterización química del propóleo son: espectrofotometría, cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI/EM), electroforesis capilar, cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), espectroscopía UV-visible, resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia infrarroja (IR) <sup>40-45</sup>. Asimismo, existen métodos analíticos cualitativos dentro de los cuales destacan la cromatografía en capa delgada (CCD) y la cromatografía en columna (CC) <sup>2,46</sup>.

#### **I.1.5.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)**

Esta técnica es utilizada como análisis preliminar en el estudio de extractos. Consiste en separar las mezclas de metabolitos presentes en disolución, utilizando dos fases, una es la fase estacionaria (FE) y la otra es la fase móvil (FM) <sup>8</sup>. Los disolventes que conforman la FM pueden ser de naturaleza polar o apolar, su uso depende de la muestra que se vaya a analizar, ya que cada muestra tendrá diferentes tipos de metabolitos <sup>44</sup>.

La FM se puede conformar con disolventes puros o puede ser necesario el uso de mezclas binarias de disolventes. Dentro de los disolventes de mayor uso se encuentran: hexano, acetato de etilo, cloroformo, metanol y etanol <sup>8</sup>. En esta técnica (CCD) usualmente es necesario el uso de reveladores los cuales pueden ser físicos como la luz UV o químicos como la vainillina en medio ácido, ácido sulfúrico en etanol y sulfato sérico en medio ácido, entre otros <sup>44,47</sup>.

### **I.1.5.2. Cromatografía en columna (CC)**

Este método es eficiente en la separación y fraccionamiento de los compuestos químicos que se encuentren en la muestra a estudiar <sup>48</sup>. La FE de la columna puede ser de distintos materiales como: sílica gel, derivados de dextranos (sephadex), florisil o policlar. Por otro lado, los disolventes a usarse en la FM pueden ser puros o mezclas de polaridad diversa <sup>48</sup>. Para resultados con mayor especificidad, este método se combina con métodos como CLAE y CG-EM <sup>42</sup>.

### **I.1.5.3. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)**

La CLAR, empleando un detector ultravioleta, ha sido utilizada para separar y purificar los metabolitos, resultando eficaz para la determinación de antioxidantes existentes en las muestras de propóleos <sup>49,50</sup>. Este método ayuda a conocer de manera general la composición de diversos tipos de propóleos ya que los compuestos con grupos cromóforos conjugados, a cierta longitud de onda, van a indicar bandas de absorción características de dichos compuestos <sup>43</sup>. Al conocer previamente el comportamiento cromatográfico de los metabolitos mayoritarios de las muestras a estudiar, se tiene una noción de su composición <sup>44,46</sup>.

### **I.1.5.4. Espectroscopía UV-VIS**

Este método es utilizado en la detección, cuantificación y diferenciación de componentes activos, especialmente flavonoides <sup>41,51</sup>. Su fundamento se basa en la excelente interacción que poseen las moléculas para absorber radiaciones electromagnéticas provenientes de la región UV-vis, esto hace que resulte más eficaz la identificación de grupos cromóforos conjugados encontrados en la muestra objeto de estudio <sup>2,51</sup>.

### **I.1.5.5. Análisis espectrofotométrico de propóleos**

Los métodos espectrofotométricos para análisis de propóleos se fundamentan en la reacción redox colorimétrica, permitiendo así la cuantificación de compuestos fenólicos, en especial flavonoides con estructuras semejantes <sup>17</sup>. Este tipo de métodos se diferencian del resto por ser rápidos, de uso fácil y bajo costo, sin embargo, pueden presentar limitaciones en la sensibilidad, como en la especificidad <sup>2,17</sup>.

Dentro de los métodos espectrofotométricos destaca la determinación de compuestos fenólicos totales presentes en una muestra utilizando como patrón una disolución de ácido gálico <sup>2,42,52</sup>. Se basa en la capacidad que poseen los compuestos fenólicos para reaccionar

ante agentes oxidantes con pH básico como lo es el reactivo de Folin-Ciocalteu, dando como resultado una coloración azul, la cual puede ser leída en un espectrofotómetro a 765 nm <sup>2,42,52,53</sup>.

#### **I.1.5.6. Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG–EM)**

Es una de las técnicas mayormente utilizadas para el análisis químico de propóleos, pues se acopla las propiedades que brinda la CG para la separación de compuestos químicos, con la EM para la identificación de diversas sustancias <sup>17,43,54</sup>. En el caso del análisis de compuestos no volátiles se recurre a una derivatización previa, la información de las estructuras químicas que ofrece este método es mayor a la obtenida por CLAE, ya que con apoyo de bases de datos se puede establecer de manera cualitativa, el perfil químico de la muestra analizada <sup>17,44,46</sup>.

#### **I.1.5.7. Resonancia magnética nuclear (RMN)**

La resonancia magnética nuclear se basa principalmente en los núcleos atómicos y sus propiedades magnéticas, esta técnica espectroscópica es utilizada tanto en el estudio de las estructuras moleculares, como en el análisis de extractos totales <sup>17,44,45</sup>. Resulta ser de gran utilidad para el estudio de muestras de propóleos ya que ligado con métodos estadísticos variados y un sistema de procesamiento de datos adecuado, facilita la clasificación correcta del propóleos <sup>48</sup>.

#### **I.1.6. Composición química**

Los primeros estudios relacionados con la caracterización química de los componentes del propóleos tuvieron lugar a inicios del siglo XX <sup>19</sup>. Desde aquel tiempo hasta la actualidad, gracias a nuevas técnicas y equipos sofisticados, se han identificado más 500 componentes diferentes tales como: flavonoides, ácidos fenólicos, fenoles simples, ésteres alifáticos y aromáticos, cetonas aromáticas, terpenos, ácidos benzoicos, aminoácidos, aldehídos aromáticos, cumarinas, xantonas, ácidos orgánicos, alcoholes, esteroides, lignanos, estilbenos, vitaminas, azúcares, ácidos grasos, minerales, entre otros <sup>12,14,21,33</sup>.

Sin embargo, cabe recalcar que la presencia y diversidad de los componentes del propóleos, así como su actividad biológica, está determinada por la ubicación geográfica de la colmena y la vegetación aledaña; incluso la estación del año también es un factor que debe considerarse <sup>36</sup>. Los estudios que se citan a continuación demuestran cómo puede variar la composición química del propóleos según la ubicación geográfica.

En Brasil se destacan el ácido gálico, ácido elágico, catequina, morin, kaempferol, naringina y rutina, como los principales compuestos fenólicos del propóleo<sup>55</sup>. Además de otros compuestos como terpenoides, derivados del ácido p-cumárico, benzofenonas preniladas, xantonas y artemisinina<sup>12,21,36</sup>. En Corea destaca el ácido cafeico y el kaempferol<sup>56</sup>. En China se refiere la galangina, el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el fenil éster del ácido cafeico<sup>57,58</sup>; otro autor menciona además la presencia de epicatequina, ácido p-cumárico, ácido cinámico, naringenina, pinocembrina y crisina como compuestos característicos en propóleos de ésta nación<sup>59</sup>. En el propóleo mexicano se han aislado los ácidos ferúlico, cafeico, cumárico, y benzoico<sup>32</sup>. En Colombia la composición química del propóleo se caracteriza por la presencia de sesquiterpenos, triterpenos pentacíclicos y diterpenos (tipo labdano)<sup>24,25</sup>; además de ácidos carboxílicos aromáticos como el ácido p-cumárico, 3,4-dimetoxicinámico y ácido cafeico; y flavonoides como quercetina, pinocembrina, apigenina, kaempferol, galangina, etc.<sup>15</sup>

En el caso de Nigeria, son las xantonas, triterpenos e isoflavonoides los componentes mayoritarios del propóleo<sup>60</sup>. Mientras que en Chile se han aislado lignanos, terpenos y flavonoides (ácido cinámico, crisina, cumarina, galangina, pinocembrina, vanillina, entre otros)<sup>61</sup>. En Cuba, además de los compuestos comunes, se identificaron por primera vez pterocarpanos (isoflavonoide)<sup>30</sup> y cuatro compuestos pertenecientes a las benzofenonas preniladas, los cuales no habían sido aislados o reportados anteriormente desde una muestra de propóleos<sup>62</sup>. En el Anexo 1 se muestra un resumen de compuestos químicos identificados en propóleos provenientes de diferentes localizaciones geográficas.

### **I.1.7. Actividad biológica**

Al igual que la composición química, la actividad biológica del propóleo es altamente heterogénea<sup>12,14,34</sup>. Múltiples estudios realizados en este producto de origen natural han comprobado una elevada capacidad antibacteriana y antifúngica en común y en menor medida, se ha demostrado capacidad antiviral, antiinflamatoria y antitumoral<sup>63</sup>. Adicional a ello, estudios recientes, le han adjudicado al propóleo, una destacada y potente actividad antioxidante<sup>12,16</sup>. De todos los componentes del propóleos, son los flavonoides y los ácidos fenólicos a quienes se les atribuye gran parte de su actividad biológica, en especial la actividad antioxidante<sup>35</sup>.

### **I.1.7.1. Actividad antioxidante**

Es una de las propiedades biológicas más reconocidas e importantes del propóleo; en efecto, son numerosos los estudios que se han enfocado en determinar la capacidad antioxidante del propóleo, dada su importancia en la prevención y tratamiento de enfermedades que se relacionan con el estrés oxidativo <sup>55</sup>.

Son los flavonoides y los ácidos fenólicos a quienes se les atribuye esta propiedad, dada su capacidad para eliminar radicales libres; además de desempeñar un rol importante durante el proceso oxidativo, protegiendo a los lípidos y vitamina C de su destrucción <sup>29</sup>.

El aprovechamiento de la actividad antioxidante del propóleo va más allá de la industria farmacéutica. En la industria alimentaria el deterioro oxidativo de los alimentos sigue siendo su principal obstáculo y se ha optado por el uso de este antioxidante natural para conservar tales productos, minimizando los riesgos derivados de los antioxidantes sintéticos <sup>9</sup>.

Así mismo, en la industria cosmética cada vez es mayor la explotación del propóleo para el tratamiento del acné u otras lesiones cutáneas, donde su propiedad antioxidante, en conjunto con sus propiedades antiinflamatorias y bactericidas, ayudan a aliviar este tipo de afecciones <sup>27</sup>.

### **I.1.7.2. Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana del propóleo es atribuida, mayoritariamente, a los compuestos de tipo flavonoides y ácidos fenólicos; en menor medida, a ácidos orgánicos y terpenos. El mecanismo de acción podría consistir en frenar la síntesis del ARN mensajero inhibiendo la enzima ARN polimerasa o interviniendo en la síntesis de la pared celular del microorganismo <sup>64</sup>.

Diversos estudios han confirmado la actividad bactericida del propóleo, tanto frente a bacterias Gram (+) (*Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces naeslundii*, *Listeria monocytogenes*) <sup>7,26,31,32</sup> como a Gram (-) (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*) <sup>26,32,36</sup>, siendo la eficacia de esta actividad dependiente de la dosis <sup>13</sup>.

Recientemente, fue evaluado el efecto inhibitorio de un extracto etanólico de propóleo, en la bacteria Gram (+) *Lactobacillus acidophilus*, frente al reconocido antimicrobiano gluconato de clorhexidina; como resultado, el extracto etanólico de propóleo demostró

mayor efectividad antimicrobiana *in vitro* <sup>65</sup>. De manera similar se estudió el efecto inhibidor *in vitro* del extracto etanólico de propóleos frente al mismo antimicrobiano; pero en cepas de *S. mutans* y *Lactobacillus casei* y el resultado fue el mismo <sup>66</sup>.

En cuanto a la actividad antifúngica, la industria alimentaria ha demostrado que el propóleos inhibe el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, un hongo común en las frutas y causante de la patología conocida como antracnosis <sup>9</sup>, y también de *Rhizopus stolonifer*, característico de las fresas <sup>35</sup>. Así mismo, se ha confirmado su efectividad frente a *Candida albicans* y *Candida tropicalis* <sup>26,36,67,68</sup>.

En el 2017, un estudio *in vitro* demostró actividad antiprotozoaria al estudiar la composición química y actividad farmacológica del propóleos rojo, logrando este reducir la carga del protozoo *Leishmania amazonensis* por un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las formas promastigotes y reducción de amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* <sup>7,69,70</sup>. Además, se ha evaluado también su efecto frente a *Trichomonas vaginalis*, donde ejercen su efecto sobre los trofozoítos <sup>71</sup>.

Con respecto a la actividad antivírica, los propóleos obtenidos de zonas templadas han demostrado significativa actividad frente al virus *Avian influenza* <sup>72</sup>.

### **I.1.7.3. Actividad antiinflamatoria**

La inflamación es la respuesta homeostática de nuestro cuerpo frente a la agresión focal de agentes hostiles, ya sean endógenos o exógenos <sup>7,73</sup>. Numerosos estudios han asociado los constituyentes químicos del propóleos con la actividad inflamatoria, demostrando la capacidad de los flavonoides en la modulación de células inflamatorias <sup>14,73</sup>.

Constituyentes como el ácido cafeico (modulador más potente), quercetina, naringenina, entre otros, actúan a nivel de macrófagos, suprimiendo la producción de leucotrienos y prostaglandinas; como consecuencia se produce una inhibición de la lipoxigenasa, evento crítico durante el proceso inflamatorio <sup>73</sup>.

### **I.1.7.4. Actividad antitumoral**

Aun cuando los estudios sobre esta actividad biológica son recientes, se considera a este producto natural como uno de los postulantes más prometedores frente a la prevención y tratamiento del cáncer, por su rica composición química en compuestos fenólicos y flavonoides <sup>74</sup>.

En el 2015, en un estudio *in vitro* enfocado en evaluar la actividad antitumoral de propóleos egipcios, se compararon los efectos de la administración de un fármaco quimioterapéutico solo, frente a la combinación de propóleos/fármaco quimioterapéutico. Como resultado se demostró la potente capacidad del propóleos para inducir apoptosis de líneas celulares pertenecientes al cáncer de próstata (PC3) y además, su aporte en la potenciación de los efectos antioxidantes y antiproliferativos del fármaco <sup>75</sup>.

La actividad antitumoral del propóleos ha sido estudiada *in vitro* en otros tipos de cáncer como el cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma cervical humano, leucemia y enfermedades óseas osteolíticas, dando resultados prometedores, al actuar sobre aquellas células tumorales que resisten a la quimioterapia <sup>76-79</sup>.

En el cáncer de páncreas y de mama se ha estudiado, mediante métodos *in vitro*, el comportamiento del éster fenílico del ácido cafeico, quien resulta ser el responsable de inducir la apoptosis de células cancerosas <sup>29,77,80</sup>.

#### **I.1.7.5. Otras actividades biológicas**

Además de las actividades biológicas antes mencionadas, el propóleos ejerce también la función de fotoprotector, cicatrizante de heridas, antiasmático, inmunomodulador, antidiabético, antiplaquetario, hemostático, hepatoprotector, regenerador de tejidos, anestésico local y antiséptico <sup>16,34,44,81</sup>. Actualmente, se utiliza en medicina alternativa para tratar afecciones como la gastritis, quemaduras, infecciones de las vías respiratorias, dolor de garganta, periodontitis, mucositis oral, herpes simple y genital <sup>68,82-84</sup>.

Por todo lo mencionado, se reconoce al propóleos como una rica fuente de compuestos bioactivos esenciales para investigación farmacológica aplicable en medicina, cosmética e industria alimentaria <sup>44,85</sup>.

## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Muestras de propóleos

Para realizar este estudio, se obtuvieron tres muestras de propóleos producidos por abejas de la especie *Apis mellifera*, las cuales fueron recolectadas en tres provincias del Ecuador.

La recolección de las muestras se realizó en el apiario Mieles y Colmenas “Tabacundo” en el mes de noviembre del año 2019 mediante el método tradicional, que consiste en el raspado de las paredes internas de la colmena. Posterior a la recolección, las muestras se identificaron como PE20, PE21 y PE22 y se almacenaron en refrigeración para su posterior análisis. Los datos de cada una de las muestras se exponen en la tabla 1.

Tabla 1: Datos de las muestras de propóleos recolectadas.

Identificación	Localización
PE-20	Parroquia: Tupigachi Provincia: Pichincha
PE-21	Parroquias: Aguas Frías, Lechugal y Zapotal. Provincia: Los Ríos
PE-22	Parroquia: San Pablo de Lago Provincia: Imbabura

### II.2. Preparación del extracto de propóleos

Cada una de las muestras de propóleos (PE-20, PE-21 y PE-22), se sometieron a extracción por maceración dinámica, utilizando una zaranda (ORBITAL SHAKER) a una velocidad de 120 rpm. Las muestras, previamente troceadas, se colocaron en un erlenmeyer, al que se le añadió metanol (FISHER SCIENTIFIC) en cantidad suficiente para cubrirlas. Dicho proceso se repitió cuatro veces. Los extractos metanólicos se filtraron utilizando algodón, se reunieron y se colocaron en balones, previamente tarados, para concentrarlos a sequedad en un rotaevaporador (HEIDOLPH LABOROTA 4001) a 40°C, acoplado a un criostato (LAUDA/ALPHA RA-8) y a una bomba de vacío (VACUUBRAND PC 600, Alemania). Los extractos secos (ESP) de las tres muestras de

propóleos se almacenaron en frascos de vidrio a temperatura de refrigeración (4 °C) para su análisis posterior.

### **II.3. Rendimiento del proceso de extracción del propóleos**

El cálculo de rendimiento para las tres muestras de propóleos estudiadas, se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = P \times 100/m \quad \text{Ec. 1}$$

Donde P es la masa del ESP (g) y m es la masa del propóleos crudo (g).

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje (%).

### **II. 4. Evaluación química preliminar de los extractos de propóleos**

Para la evaluación química preliminar de las muestras de propóleos, se prepararon disoluciones metanólicas en concentraciones de 2 mg/mL, a partir de los correspondientes ESP.

#### **II.4.1. Tamizaje fitoquímico para la identificación de fenoles y flavonoides**

Para determinar la presencia de fenoles en las muestras se realizó el ensayo del cloruro férrico. Se tomó una alícuota de la disolución correspondiente a cada muestra de propóleos y se le adicionaron tres gotas de una disolución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,9 % en agua). Se mezcló utilizando el agitador vórtex (THERMO SCIENTIFIC, USA) y, finalmente, se observó el color.

Para la identificación de flavonoides en las muestras se procedió a realizar el ensayo de Shinoda, que consistió en diluir una alícuota de cada extracto de propóleos en 1 mL de ácido clorhídrico concentrado (FISHER CHEMICAL), a esta disolución se le añadió un pedacito de cinta de magnesio metálico. Se dejó en reposo por 5 min, aproximadamente, y se observó la coloración adquirida.

#### **II.4.2. Análisis mediante cromatografía en capa delgada (CCD)**

Las muestras a la concentración antes referida (2 mg/mL), fueron analizadas cualitativamente por cromatografía en capa delgada, utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel G60F<sub>254</sub>. Las muestras se aplicaron con ayuda de capilares por el método de punteo. La aplicación se realizó a 1 cm del borde inferior y la corrida fue, aproximadamente, de 8 cm. La distancia entre cada punteo fue de 1 cm.

Como fase móvil se usaron dos mezclas de diferente polaridad, hexano: acetato de etilo en proporción 7:3 ( $C_6H_{14}/C_4H_8O_2$ ) y cloroformo: metanol en proporción 9:1 ( $CHCl_3/CH_3OH$ ).

La corrida cromatográfica se desarrolló bajo la cámara extractora de gases del laboratorio, donde también se efectuó la evaporación de la fase móvil a temperatura ambiente.

Para el revelado de las placas se utilizaron los siguientes métodos:

- Luz UV a longitudes de onda de 254 nm y 365 nm.
- Disolución de tricloruro de hierro al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,9% en agua).
- Disolución metanólica al 0,2% de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).
- Vainillina/  $H_2SO_4$  y calor. Se roció previamente la disolución metanólica de  $H_2SO_4$  (50%) y posteriormente la disolución metanólica de vainillina (1%). A continuación, se calentó la placa a una temperatura entre 105 y 110 °C de 3 a 5 min, hasta aparición de color.

Este último revelado solo fue utilizado en la corrida cromatográfica con la fase móvil cloroformo: metanol en proporción 9:1.

## **II.5. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides**

### **II.5.1. Determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu**

**Preparación de la muestra:** Se pesaron las siguientes cantidades de cada ESP: 0,0208 g (PE-20), 0,0209 g (PE-21), 0,0203 g (PE-22), las que se llevaron a balones volumétricos de 10 mL enrasando con metanol (FISHER SCIENTIFIC).

**Ensayo:** Se usó el reactivo de Folin-Ciocalteu (SIGMA ALDRICH) y la metodología descrita por Campo y colaboradores, con algunas modificaciones<sup>86</sup>. Se colocaron 50  $\mu$ L de muestra, de metanol (blanco) o de ácido gálico (patrón) en tubos de ensayo de 10 mL, aproximadamente. Se adicionaron 2,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (SIGMA ALDRICH) al 10% y 450  $\mu$ L de agua destilada, se homogeneizó con un vórtex (THERMO SCIENTIFIC, USA) y se dejó reposar durante 5 min. Posterior al tiempo de reposo se adicionaron 2 mL de  $Na_2CO_3$  al 7,5%, se agitó nuevamente y se esperó durante 2 horas. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) a 765 nm, utilizando microceldas de 2 mL.

La cuantificación de fenoles totales se efectuó mediante una curva de calibración con ácido gálico 10 mg/mL (SIGMA ALDRICH) en concentraciones de 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/mL. El contenido de fenoles totales fue expresado como miligramos equivalentes a ácido gálico, por gramo de extracto seco de propóleos (EAG (mg)/g de ESP).

### **II.5.2. Determinación cuantitativa de flavonoides totales**

**Preparación de la muestra:** Se pesaron las siguientes cantidades de cada ESP: 0,0038 g (PE-20), 0,0035 g (PE-21), 0,0033 g (PE-22), se llevaron a balones volumétricos de 10 mL y se enrasaron con metanol (FISHER SCIENTIFIC).

**Ensayo:** Se realizó por el método colorimétrico del tricloruro de aluminio según Campo y colaboradores <sup>87</sup>. Para la curva de calibración se utilizó como estándar quercetina (SIGMA-ALDRICH) en concentraciones de 3,1 y 50 µg/mL. De las diferentes disoluciones del estándar y de los ESP, se tomaron 2 mL y se mezclaron con 100 µL de cloruro de aluminio (10%), 100 µL de acetato de potasio (1 M) y 2,8 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Las muestras se mantuvieron en reposo por 40 min a temperatura ambiente, para, posteriormente, efectuar la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm, utilizando microceldas de 2 mL. Cada una de las diluciones del estándar y las muestras se analizaron por triplicado. El contenido de flavonoides fue expresado como miligramos equivalentes a quercetina por gramo de ESP (EQ (mg)/g ESP).

### **II.6. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity), utilizando los ensayos de DPPH y FRAP**

#### **II.6.1. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de FRAP (*ferric ion reducing antioxidant power*)**

**Preparación de la muestra:** Las cantidades pesadas de cada ESP fueron las siguientes: 0,0210 g (PE-20), 0,0229 g (PE-21), 0,0219 g (PE-22), se llevaron a balones volumétricos de 10 mL y se enrasó con metanol (FISHER SCIENTIFIC).

**Ensayo:** Se desarrolló según el método de Benzie y Strain <sup>88</sup>. El reactivo para la determinación de la capacidad antioxidante para reducir el ion férrico (FRAP) se preparó mezclando 25 mL de solución buffer acetato (pH: 3,6); 2,5 mL de solución 10 mM de TPTZ (2, 4, 6-tris (2-piridil)-S-triazina) y finalmente con 2,5 mL de solución FeCl<sub>3</sub> (20 mM). La mezcla se incubó por 30 min a 37°C y recién preparada fue utilizada en el ensayo.

Se realizó una curva de calibración con disoluciones metanólicas del ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), en concentraciones de 0,025; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175 mg/mL. Las diferentes diluciones del estándar y las muestras, fueron analizadas por triplicado. En tubos de ensayos de 10 mL se mezclaron 50 µL de las diferentes diluciones de muestras, con 1,5 mL del reactivo FRAP y se esperó un tiempo de 5 min. La lectura se realizó a 593 nm en microceldas de 2 mL, utilizando como blanco la disolución FRAP. El resultado fue expresado como la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) por gramo de ESP (TEAC/g ESP).

### **II.6.2. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)**

**Preparación de la muestra:** Se pesó de cada ESP: 0,0256 g (PE-20), 0,0236 g (PE-21), 0,0210 g (PE-22) y se llevaron a balones volumétricos de 10 mL, utilizando como disolvente metanol (FISHER SCIENTIFIC).

**Ensayo:** Para la elaboración de la curva de calibración a partir del trolox, se prepararon disoluciones metanólicas en concentraciones de 0,025; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175 mg/mL. De cada una de las disoluciones del estándar se tomaron 0,05 mL y se mezclaron con 1,5 mL de la disolución metanólica de DPPH (0,1 mM), manteniéndose a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 min. De igual manera se preparó la muestra control mezclando 1,5 mL de DPPH (0,1 mM) con 0,05 mL de metanol. La lectura se efectuó a 517 nm en el espectrofotómetro usando microceldas de 2 mL y empleando como blanco el metanol. Con los valores de absorbancia obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición, según la siguiente ecuación:

$$\% DPPH = (A_{control} - A_{muestra}) / A_{control} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

$A_{control}$ : Absorbancia del control.

$A_{muestra}$ : Absorbancia de la muestra luego de reaccionar con la solución de DPPH por 30 min.

El ensayo con cada una de las disoluciones de propóleos a evaluar se desarrolló por triplicado, de la misma manera antes descrita. El resultado fue expresado como la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) por gramo de ESP (TEAC/g ESP).

### II.6.3. Determinación de la cinética de reacción con el DPPH

Para analizar la cinética de reacción se elaboró una curva de calibración con una disolución metanólica de DPPH a concentraciones entre 0,01 y 0,1 mM. A cada una de las muestras les fue medida su absorbancia en el espectrofotómetro a 516 nm, empleando microceldas de 2 mL. Las lecturas se realizaron por triplicado, utilizando como blanco metanol.

Se realizó el análisis de regresión lineal de la curva de calibración dando como resultado la siguiente ecuación:  $\text{absorbancia} = 0,00503014 + 1,165 \times \text{Concentración}$ , con un coeficiente de correlación de 0,997102.

Para evaluar la cinética de ambos extractos se siguió el método propuesto por Barron Yáñez y colaboradores, con algunas modificaciones<sup>89</sup>. De cada muestra se prepararon diluciones metanólicas a una concentración de 2 mg/mL; se tomaron 0,05 mL de cada una y se hicieron reaccionar con 1,9 mL de DPPH (0,1 mM). Adicionalmente, se prepararon dos disoluciones estándar a la concentración de 0,3 mg/mL, una de quercetina (SIGMA-ALDRICH) y otra de ácido ascórbico (SIGMA-ALDRICH). A continuación, se midieron las absorbancias de cada muestra con intervalos de 60 segundos, desde tiempo cero (DPPH<sub>t=0</sub>) hasta concluir 30 min (DPPH<sub>rem</sub>), en el espectrofotómetro a 517 nm, usando microceldas de 2 mL.

Las absorbancias obtenidas permitieron calcular el DPPH remanente (DPPH<sub>rem</sub>) en el medio de reacción, con ayuda de la curva de calibración antes elaborada. Cada lectura se hizo por triplicado y como blanco se usó metanol. La concentración de DPPH<sub>rem</sub> a los diferentes tiempos se calculó a través de la ecuación:

$$\% \text{ DPPH}_{rem} = 100 \times \text{DPPH}_{rem} / \text{DPPH } t = 0 \quad \text{Ec. 3}$$

### II.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos realizados en los estudios de cuantificación (media y desviación estándar) se hicieron con el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 22 y Excel 2016, correspondiente al Office\_Professional\_Plus\_2016. El procesamiento estadístico de los datos del análisis de regresión lineal se llevó a cabo con el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.0. La comparación de los datos obtenidos a partir de las tres muestras de propóleos, se realizó con el modelo estadístico Analysis of Variance (ANOVA).

### CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tradicionalmente la extracción del propóleo crudo se realiza mediante maceración, agitación, reflujo o extracción Soxhlet, utilizando diferentes disolventes para obtener extractos de propóleos sin ceras y ricos en componentes polifenólicos <sup>90</sup>. El etanol absoluto es el disolvente más comúnmente empleado para preparar extractos de propóleos, aunque la extracción con disoluciones hidroalcohólicas (70-95%) puede resultar en tinturas sin cera que contienen cantidades más altas de sustancias fenólicas <sup>91</sup>.

El procesamiento de las tres muestras de propóleos, para la obtención de los llamados “extractos”, se desarrolló de manera tradicional, manteniéndolas en contacto con un disolvente de similar polaridad al etanol (metanol) y mediante maceración dinámica. Aunque se definen como extractos, siendo consecuente con el fenómeno que tiene lugar lo que en realidad ocurre es la disolución de metabolitos afines al menstruo y no la difusión de estos a través de una membrana o tabique poroso, como suele suceder en células vegetales secas. Con este proceso se busca eliminar de esta mezcla mecánica denominada propóleos, impurezas como la cera de abeja, posteriormente, eliminar el disolvente con ayuda del rotaevaporador y conservar el residuo seco o también denominado ESP para los correspondientes análisis químicos y biológicos.

Como resultado final para cada una de las muestras se obtuvo el siguiente rendimiento:

Muestra PE-20: 54,39%

Muestra PE-21: 48,89%

Muestra PE-22: 49,29%

Se puede apreciar que en los tres casos se obtuvo un rendimiento que está cerca del 50%, lo cual significa que, luego de realizar el cambio de menstruo por más de cuatro ocasiones, se logró disolver una buena cantidad de metabolitos. Los resultados obtenidos son comparables con los referidos por otros autores. Campo (2007) <sup>92</sup> logró, por un método similar, la obtención de un 50% de sustancias extraíbles, a partir de una muestra de propóleos rojo cubano; sin embargo, un año después Márquez (2008) <sup>93</sup>, obtuvo un porcentaje superior (60,2%), a partir de una muestra de propóleos pardo cubano. Por su parte, Cuesta-Rubio (2001) <sup>94</sup>, obtuvo un 47,6% de extractivos utilizando como disolvente etanol.

Factores como el método de extracción o el menstruo pueden favorecer el rendimiento del proceso. Si bien es cierto que elevadas temperaturas de extracción favorecen tal rendimiento, debe tenerse en cuenta que también pudiera favorecer la degradación de los metabolitos bioactivos <sup>95</sup>.

### **III.1. Evaluación química preliminar de los extractos de propóleos**

#### **III.1.1. Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico es un método cualitativo que realmente no suele ser utilizado en extractos diluidos de propóleos. Dichas determinaciones son comúnmente empleadas en extractos de plantas, como parte de una investigación química preliminar de la misma, en donde se busca la identificación de los principales grupos químicos, facilitando la orientación de la investigación. No obstante, aunque es un producto apícola, su composición química guarda estrecha relación con las plantas que rodean la colmena, por lo que los estudios de estandarización química no difieren en gran medida, con los aplicados en el campo de la fitoquímica. Las técnicas asociadas a dichos ensayos se caracterizan por ser simples, rápidas y con muy bajos requerimientos tecnológicos.

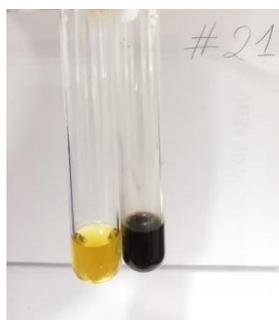
En el presente estudio se realizaron solo dos determinaciones químicas, cuyos resultados se pueden apreciar en la figura 1.

Figura 1: Ensayos cualitativos ( $\text{FeCl}_3$  y Shinoda) de los extractos de las tres muestras de propóleos.

**Ensayo con  $\text{FeCl}_3$  (solución salina 5%)**



**Muestra PE-20**



**Muestra PE-21**



**Muestra PE-22**

**Ensayo de Shinoda**



**Muestra PE-20**



**Muestra PE-21**



**Muestra PE-22**

En los resultados obtenidos con el ensayo de  $\text{FeCl}_3$ , se puede observar que las tres disoluciones de propóleos experimentaron un brusco cambio de color amarillo a negro-marrón, lo cual concuerda, según la literatura, con la presencia de compuestos fenólicos en general. Tales metabolitos, al ponerse en contacto con dicho reactivo, pueden desarrollar una intensa coloración roja, marrón, verde, azul o negra <sup>96</sup>.

El ensayo de Shinoda se realizó buscando la posible presencia de flavonoides, metabolitos antes identificados en muestras de propóleos ecuatorianos <sup>70</sup>. Las imágenes de las tres muestras sugirieron la existencia en la disolución metanólica de tales compuestos polifenólicos, dado el brusco cambio hacia una coloración rojo ladrillo. Comparando las intensidades de color de las tres muestras, pudiera, preliminarmente, sugerirse que la PE-20 presenta mayor concentración de tales compuestos químicos. Este ensayo, también conocido como reacción de cianidina de Willstatter, detecta la presencia de anillos  $\gamma$ -benzopirona, porción estructural característica de los flavonoides de mayor abundancia

en la naturaleza <sup>97</sup>. En tales productos naturales, ocurre la reducción del anillo C, formándose una sal de flavilio, muy conjugada y de color, generalmente, rojo-carmesí-magenta a naranja <sup>96</sup>.

### **III.1.2. Análisis mediante cromatografía en capa delgada (CCD)**

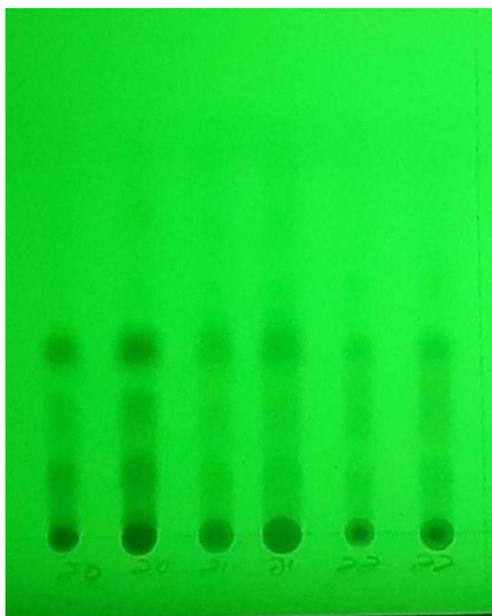
Aunque se han informado muchos métodos para la separación y caracterización de productos naturales, la CCD continúa empleándose con frecuencia debido a sus numerosas ventajas. Resulta un método rápido, económico y se puede utilizar como análisis previo a otros métodos como la CLAR, CG, etc. <sup>98</sup>

En esta ocasión la CCD tuvo como objetivo la caracterización química cualitativa de las tres muestras de propóleos. El perfil cromatográfico fue analizado utilizando dos fases móviles de diferente polaridad ( $C_6H_{14}/C_4H_8O_2$  y  $CHCl_3/CH_3OH$ ), lógicamente, buscando la separación de los metabolitos de manera diferenciada.

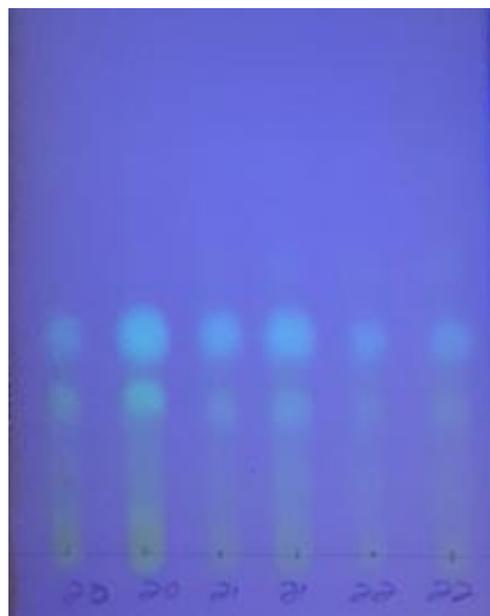
#### **III.1.2.1. Fase móvil hexano: acetato de etilo (7:3)**

La primera de las fases móviles evaluada fue la de menor polaridad. Como se aprecia en la figura 2, el revelado se efectuó mediante métodos físicos (luz UV a 254 y 365 nm) y dos de tipo químico ( $FeCl_3$  y DPPH). Cada una de las muestras de propóleos se aplicó por duplicado, buscando en la segunda corrida una mayor concentración de metabolitos en el punto de aplicación.

Figura 2: Análisis cromatográfico en placa delgada utilizando como fase móvil ( $C_6H_{14}/C_4H_8O_2$  (7:3), y como fase estacionaria placas de sílica gel G60F<sub>254</sub>.



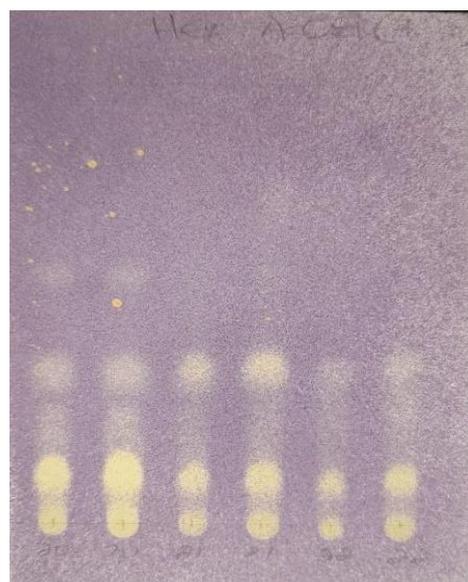
**A. Revelado físico: Luz UV 254 nm**



**B. Revelado físico: Luz UV 365 nm**



**C. Revelado químico: FeCl<sub>3</sub>**



**D. Revelado químico: DPPH (0,2%)**

Después de la irradiación ultravioleta a 254 nm (imagen A), la emisión del adsorbente se reduce en las regiones donde los compuestos activos absorben la luz UV, estos se muestran como zonas oscuras sobre un fondo fluorescente. Al analizar dicha imagen, destaca en las tres muestras la existencia de un gran número de manchas que revelan bajo la luz ultravioleta a 254 nm, sugiriendo a simple vista que la muestra PE-20 presenta los metabolitos responsables de dicho revelado, en mayor concentración. Este tipo de

revelado busca identificar en dichos extractos la existencia de compuestos químicos que en su estructura presentan grupos cromóforos conjugados. En todos los casos se observa una diversidad de metabolitos que en su inmensa mayoría revelan a Rf inferiores a 0,5 cm, pues no avanzan más allá de la mitad de la placa cromatográfica. Se puede apreciar, incluso, que los de mayor intensidad quedan retenidos en el punto de aplicación, lo que deja ver que existen compuestos con grupos cromóforos conjugados que son de elevada polaridad, dada la afinidad que presentan con la fase estacionaria.

Si se comparan los resultados obtenidos con la imagen B, se puede apreciar que la apariencia cromatográfica en cuanto a número de manchas y Rf, es muy similar, la diferencia solo radica en la coloración que muestran tales manchas.

Según la literatura los flavonoides pueden ser detectados bajo la luz ultravioleta a 254 nm (todos flavonoides muestran fluorescencia) o a 366 nm. En este último sistema de revelado, dependiendo de la estructura los flavonoides, se pueden observar con fluorescencia de color amarillo oscuro, verde o azul. De igual manera algunos ácidos fenólicos han sido identificados utilizando la luz ultravioleta a 254 nm, exhibiendo coloraciones azules, azul intenso y violeta <sup>98</sup>.

Para la cromatoplaque C se utilizó un reactivo cromogénico de común empleo para la identificación de fenoles totales. Considerando el resultado mostrado en la figura 1, es lógico esperar que existan manchas que revelen bajo tales condiciones. Si se observa detenidamente los colores que exhiben a los diferentes Rf (marrón, violáceo y pardo), dicho resultado sugiere que son metabolitos de naturaleza fenólica estructuralmente diferentes. Adicionalmente, se observa que la muestra PE-20 luce manchas con mayor intensidad que las dos restantes, lo cual continúa apuntando que en esta disolución existe una mayor cantidad de compuestos fenólicos, considerando, sobre todo, que se parte de muestras de similar concentración.

Si se comparan los perfiles cromatográficos de la imagen A con la C se puede proponer que aquellos compuestos que antes revelaron por presentar grupos cromóforos conjugados, en su gran mayoría presentan núcleos fenólicos en su estructura.

El último análisis se realizó utilizando como revelador una disolución de DPPH, en esta ocasión no se buscó la identificación de algún tipo de compuesto químico en particular, sino la posible actividad antioxidante de los metabolitos presentes en los extractos. Un resultado positivo es aquel donde, luego de aplicar el radical libre en disolución (DPPH)

sobre la corrida cromatográfica, ocurre una decoloración de aquellas zonas donde existen compuestos químicos capaces de secuestrar los radicales libres y por consecuencia se consideran antioxidantes. Dicha decoloración puede darse de manera inmediata o pudiera ir incrementándose tal efecto en el tiempo, lo cual depende de la cinética propia que presente la mezcla de compuestos químicos existente en disolución.

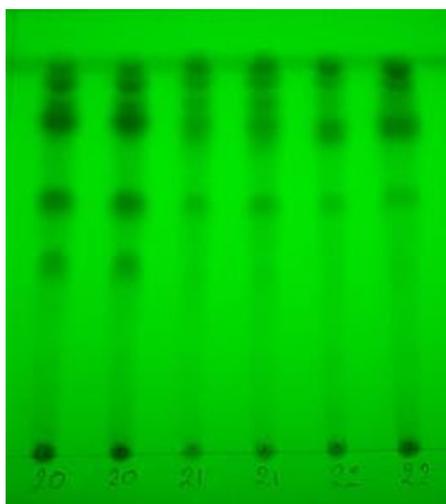
Como se puede apreciar el perfil cromatográfico es muy similar a las placas anteriores, es decir las zonas que mostraron decoloración en cada una de las muestras, son las mismas que antes revelaron bajo la luz ultravioleta y de hecho también por la reacción con  $\text{FeCl}_3$ . Lo cual está evidenciando que los metabolitos fenólicos serían los responsables fundamentales de los beneficios terapéuticos que presentan estos productos apícolas, en calidad de antioxidantes.

### III.1.2.2. Fase móvil cloroformo:metanol (9:1)

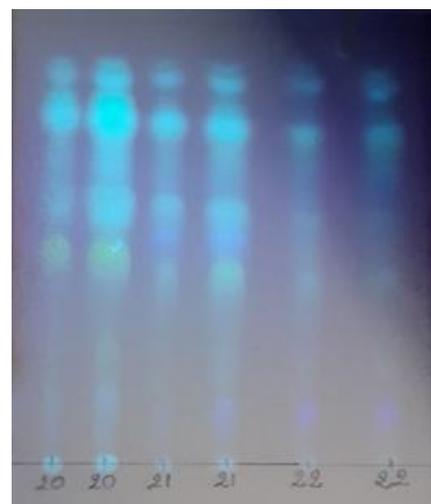
Como segundo ensayo se utilizó una fase móvil de mayor polaridad, buscando desorber los metabolitos que en el análisis anterior quedaron retenidos a bajos  $R_f$  y en el punto de aplicación.

Las muestras se aplicaron de manera similar al estudio cromatográfico anterior y en igual cantidad. En este caso se utilizaron los mismos reveladores antes comentados y se adicionó el revelado mixto vainillina/  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /calor. Los resultados se muestran en la figura 3.

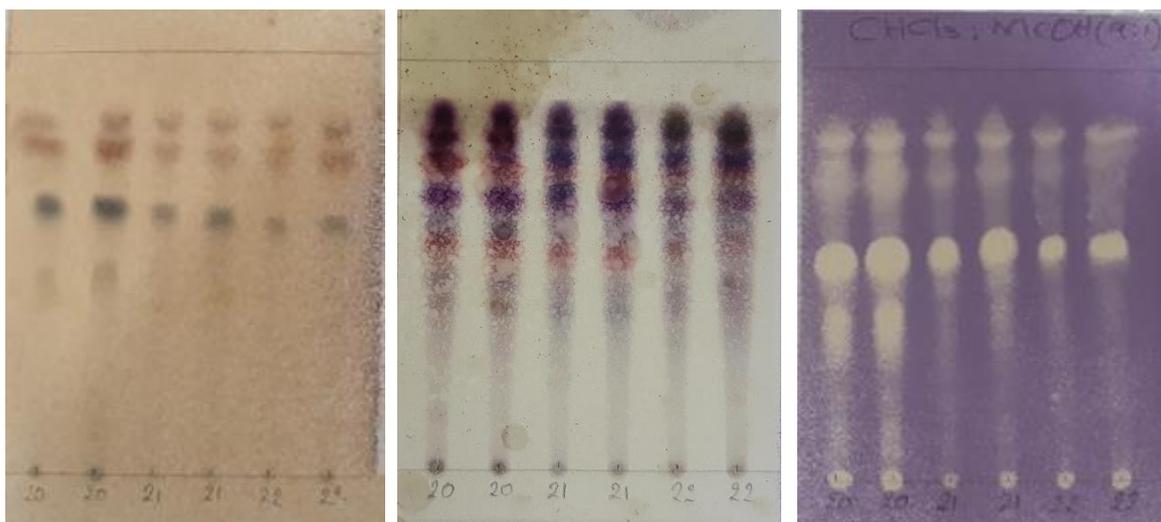
Figura 3: Análisis cromatográfico en placa delgada utilizando como fase móvil  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (9:1), y como fase estacionaria placas de sílica gel G60 F<sub>254</sub>.



**E. Revelado físico: Luz UV 254 nm**



**F. Revelado físico: Luz UV 365 nm**



**G. Revelado químico:**

**FeCl<sub>3</sub>**

**H. Revelado mixto:**

**vainillina/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/calor**

**I. Revelado químico:**

**DPPH (0,2%)**

En todas las placas se puede apreciar que, aunque aún quedaron retenidos algunos compuestos en el punto de aplicación, la intensidad del revelado en dicho sitio no es tan marcada como se muestra en la figura 2. Se puede evidenciar que, con el empleo de esta fase móvil de polaridad media, la mayoría de los compuestos químicos revelaron por encima de la mitad del recorrido cromatográfico, lo cual habla a favor de la polaridad que muestran estos, siendo más afines con dicha fase móvil y por ende de polaridad media.

El revelado físico utilizando la luz UV a 254 nm (E) y a 365 nm (F), continúa sugiriendo lo antes expresado en el análisis cromatográfico empleando hexano:acetato de etilo. Es decir, hay una gran cantidad de metabolitos capaces de absorber la luz en esta longitud de onda, por lo que en su estructura presentan grupos cromóforos conjugados como, por ejemplo, anillos aromáticos.

Resalta a la vista que al comparar las imágenes A y B de la figura 2, con las E y F de la figura 3, a mayor R<sub>f</sub> solo se apreciaba con gran nitidez una imagen en cada corrida (placas A y B), sin embargo, en E y F esta imagen se desdobra o resuelve en varias que avanzan hasta el frente de la corrida. Tal resultado sustenta el hecho que, en CCD, se debe ser muy cuidadoso al definir que una sola mancha es indicio de que exista un solo metabolito. Los cambios de fases móviles son muy importantes para evaluar la complejidad química que pudiera existir en un extracto <sup>98</sup>.

El análisis de la placa G confirma la existencia de compuestos fenólicos en el extracto, pero se debe hacer notar que, si bien el revelado físico sugirió la presencia de compuestos

con grupos cromóforos conjugados muy cercanos al frente del disolvente, los de mayor  $R_f$  no reaccionaron con el  $FeCl_3$ , por lo que pudieran no ser compuestos de naturaleza fenólica o no presentar el hidroxilo fenólico.

El revelador vainillina en medio ácido con ayuda de calor, resulta ser un revelador general mixto que facilita la visualización de manchas con colores más llamativos y diversos, en dependencia de las estructuras químicas presentes. En la imagen H se pueden apreciar algunas manchas, las cuales tienen la peculiaridad de revelar con una coloración violácea. Si se analiza, detenidamente, esta zona en las cromatoplasmas E y G, se puede apreciar que no existen tales señales, por lo que el análisis lleva a pensar que bajo estas subyace la presencia de estructuras triterpénicas, compuestos también identificados en diversas muestras de propóleos de localización nacional o de otros países <sup>70,92</sup>.

En la placa I, los resultados evidenciaron algo similar a los antes comentado para la imagen D (figura 2), adicionalmente, se puede reafirmar lo antes comentado en relación a las estructuras triterpénicas. Cuando no existen compuestos con capacidad de secuestrar radicales libres en la placa, el color violeta inicial, propio de la disolución de DPPH, no experimenta ningún cambio. Por tanto, la zona donde revelaron las posibles estructuras triterpénicas (placa H), no exhibió decoloración alguna, lo cual es lógico pues este tipo de producto natural no suele ser referido como antioxidante. Resultados similares han sido obtenidos en estudios cromatográficos con propóleos de diversos orígenes geográficos <sup>99,100</sup>.

Se hace notar, además, que aun cuando las intensidades de las manchas que se observan para cada una de las muestras bajo un mismo sistema cromatográfico (fase móvil y revelado), presentan algunas variaciones, a simple vista pudiera sugerirse que químicamente las tres muestras de propóleos son muy similares. Es decir, aunque fueron colectadas en zonas geográficamente diferentes, el origen botánico de los propóleos parece ser muy similar.

### **III.2. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides**

Los compuestos fenólicos y flavonoides han sido referidos como los metabolitos responsables de las múltiples propiedades funcionales del propóleos <sup>50</sup>. Tales metabolitos fueron cuantificados en cada una de las muestras y son referidos como los equivalentes de los estándares correspondientes en cada caso.

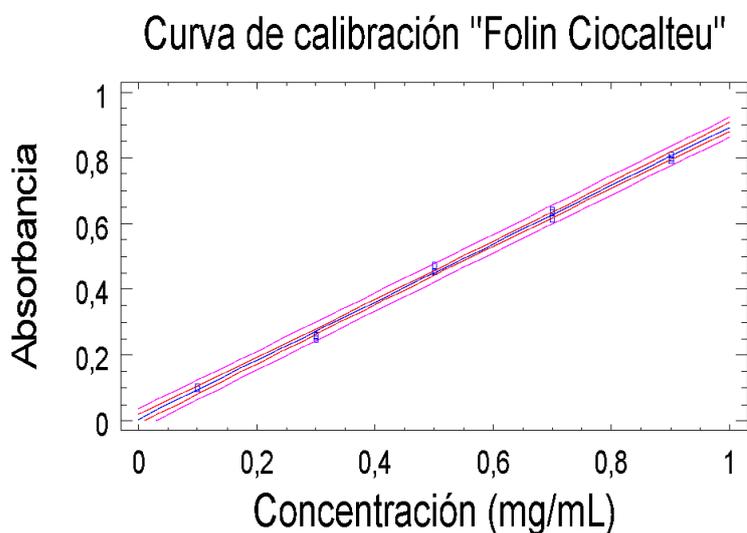
### III.2.1. Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales en cada uno de los extractos etanólicos de propóleos se calculó a partir de la curva de calibración (Ec. 4), obtenida por regresión lineal y utilizando como estándar de referencia al ácido gálico.

$$Abs = 0,00446667 + 0,888667 * Conc \left( \frac{mg}{mL} \right) \quad \text{Ec. 4}$$

Como se puede apreciar en la figura 4, la curva de calibración obtenida es confiable, con un coeficiente de correlación de 0,998913, lo cual constata una relación relativamente fuerte entre las variables absorbancia y concentración de la solución de ácido gálico.

Figura 4: Curva de calibración de ácido gálico para cuantificación de fenoles totales.



A partir de la Ec.4 y teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido para cada muestra, se determinó la concentración de fenoles totales (tabla 2), informándose los resultados en términos de miligramos equivalentes a ácido gálico, por cada gramo de extracto seco de propóleos (EAG (mg)/g de ESP).

Tabla 2: Cuantificación de fenoles totales en las tres muestras de propóleos analizadas.

Muestra	Cuantificación de fenoles totales [EAG (mg)/g de ESP] $\bar{X} \pm S$
PE-20	183,69 <sup>a</sup> ± 0,77
PE-21	102,59 <sup>b</sup> ± 2,28
PE-22	151,90 <sup>c</sup> ± 1,18

**Leyenda:** Letras diferentes para un mismo parámetro denotan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Como se observa en la tabla 2, la muestra PE-20, es la que presenta mayor cantidad de compuestos fenólicos totales, seguida de las muestras PE-22 y PE-21, mostrando entre ellas diferencia estadísticamente significativa, con una confiabilidad del 95%. Este resultado cuantitativo, constata lo que cualitativamente fue propuesto por CCD, donde se sugirió que, por la intensidad de las manchas la muestra PE-20 poseía mayor cantidad de compuestos fenólicos.

Según refieren las múltiples investigaciones en propóleos, en este producto apícola se han identificado una gran diversidad de compuestos fenólicos tales como: ácidos fenólicos, flavonoides, benzofenonas preniladas, entre otros <sup>17</sup>. Tales metabolitos secundarios poseen una amplia distribución geográfica y, aunque son químicamente muy diversos, se caracterizan por presentar, al menos, un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos. Su biosíntesis en las plantas guarda estrecha relación con sus diferentes etapas de desarrollo <sup>101</sup>.

### III.2.2. Cuantificación de flavonoides totales

Los flavonoides y los derivados del ácido cinámico se han considerado como los principales componentes activos del propóleos. Los flavonoides son una clase de metabolitos secundarios de las plantas, de amplia distribución en la naturaleza, siendo identificados como los pigmentos vegetales responsables de la coloración de diversas flores de pigmentación amarilla, roja o azul, en sus pétalos <sup>102</sup>.

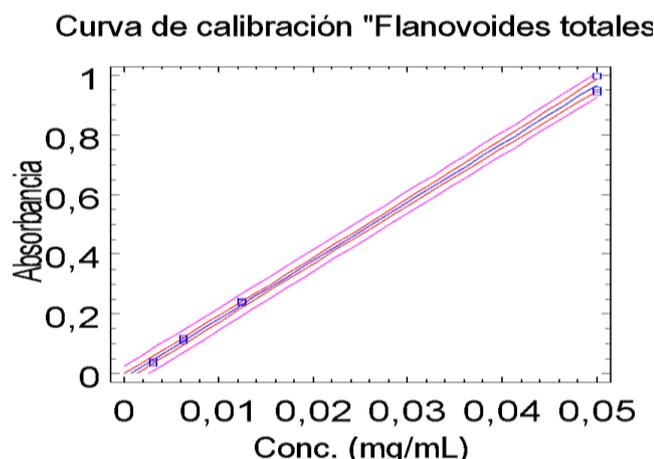
La cuantificación de flavonoides en productos naturales en general y en particular en propóleos, suele realizarse mediante métodos cromatográficos como CCD, cromatografía

de gases (CG), GC acoplada a espectrometría de masas (EM) o CLAE. Resulta indudable que dichos métodos son más eficientes y precisos, sin embargo, presentan limitaciones debido a los costos, fundamentalmente, del equipamiento. Como alternativa se presentan los métodos espectrofotométricos como el del tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), con el que se pueden cuantificar flavonoides con núcleos estructurales del tipo flavonas y flavonoles, los que forman complejos estables con el  $\text{AlCl}_3$ . Tales estructuras suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos, condición que facilita su reactividad frente al  $\text{AlCl}_3$  <sup>103</sup>.

Previo al análisis de las muestras se elaboró una curva de calibración (figura 5) con quercetina, la que evidencia, luego del análisis de regresión lineal, que la correlación entre las variables es fuerte ( $R^2= 0,999231$ ). La ecuación (Ec. 5) obtenida de tal análisis estadístico se muestra a continuación:

$$Abs. = -0,0130879 + 19,5781 * Conc. \left(\frac{mg}{mL}\right) \quad \text{Ec. 5}$$

Figura 5: Curva de calibración de quercetina para la determinación de flavonoides totales.



Al analizar la tabla 3 se aprecia que, de manera similar a lo sucedido en la cuantificación de fenoles totales, entre las muestras existen diferencias estadísticamente significativas, resultando de igual manera la muestra PE-20 la de mayor contenido de tal familia de metabolitos, seguida de la PE-22 y PE-21, sucesivamente.

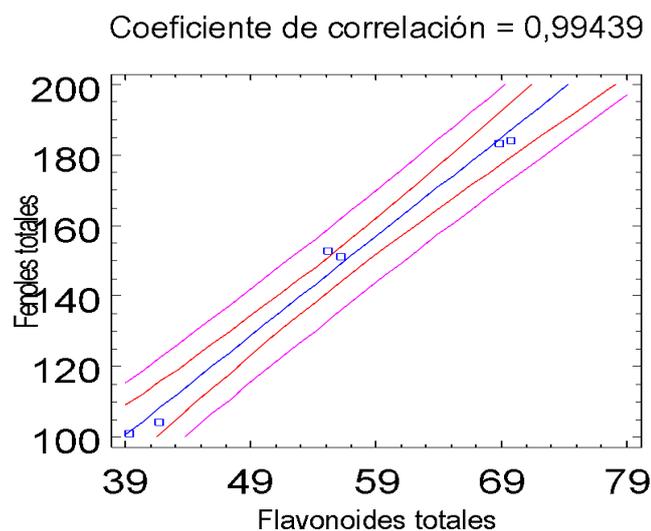
Tabla 3: Cuantificación de flavonoides totales en las tres muestras de propóleos analizadas.

Muestra	Cuantificación de flavonoides totales [EQ (mg)/g de ESP] $\bar{X} \pm S$
PE-20	70,71 <sup>a</sup> ± 2,49
PE-21	40,44 <sup>b</sup> ± 1,65
PE-22	55,73 <sup>c</sup> ± 0,56

**Leyenda:** Letras diferentes para un mismo parámetro denotan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Al realizar el análisis de regresión lineal para el comportamiento entre ambos metabolitos en las tres muestras de propóleos (Figura 6), se puede apreciar un coeficiente de correlación  $R^2=0,99439$ , lo que indica una correlación positiva fuerte entre las variables (fenoles totales y flavonoides totales).

Figura 6: Correlación entre fenoles totales y flavonoides totales presentes en las tres muestras de propóleos.



En las tres muestras de propóleos se observó que en la medida que aumenta la concentración de fenoles totales, se incrementó proporcionalmente la concentración de flavonoides, lo que pudiera indicar, conjuntamente con los métodos de caracterización antes utilizados, que presentan compuestos químicos estructuralmente similares.

Son muchos los artículos que hacen alusión a la cuantificación de fenoles y flavonoides en extractos de propóleos de diversa localización geográfica, algunos de los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Cuantificación de fenoles totales y flavonoides en extractos alcohólicos (etanol o metanol) de propóleos de diferentes localizaciones geográficas.

<b>Muestra</b>	<b>Cuantificación</b>	<b>Cuantificación de</b>
	<b>de fenoles totales</b>	<b>flavonoides totales</b>
	mg EAG/g	mg EQ/g
Propóleos brasileño pardo de Alagoas <sup>50</sup>	55,74	30,89
Propóleos brasileño verde de Alagoas <sup>50</sup>	90,55	59,45
Propóleos brasileño rojo de Alagoas <sup>50</sup>	91,32	31,48
Propóleos iraní <sup>104</sup>	48,59	31,23
Propóleos chilenos <sup>105</sup>	25,00–105,00	21,00–77,00
Propóleos serbios <sup>106</sup>	155,70	68,70
Propóleos colombianos <sup>15</sup>	22,11 – 75,22	4,75 – 34,50
Propóleos peruanos <sup>20</sup>	60,50 – 78,60	28,50 – 42,50
Propóleos mexicanos de Guanajuato <sup>29</sup>	68,00 – 500,00	13,00 – 379,00
Propóleos argentinos de Tucumán <sup>1</sup>	16,30	8,00
Propóleos indios <sup>104</sup>	23,88 – 48,59	13,86 – 31,23
Propóleos chinos <sup>107</sup>	18,80 – 33,10	3,90 – 26,60
Propóleos griego de Macedonia <sup>108</sup>	58,53 – 179,99	5,05 – 88,26
Propóleos griego de la Isla de Rhodes <sup>108</sup>	2,33 – 127,79	0,25 – 18,39

Compuestos fenólicos y flavonoides totales suelen ser parámetros importantes en la evaluación de la calidad de numerosos recursos naturales, ya que están estrechamente relacionados con los beneficios que reportan para la salud <sup>109</sup>. Las variaciones en cuanto al contenido total de tales productos naturales o metabolitos secundarios se atribuyen,

principalmente, a las diferentes regiones geográficas donde se ubican las colmenas y la afinidad de las abejas por los exudados vegetales que recolectan <sup>110</sup>. Observar variabilidad en relación a la composición química del propóleo, es una característica intrínseca de dicho producto apícola, pues la compleja mezcla que presenta es el resultado de la vegetación que circunda una colmena. El propóleo cambia de color, olor, composición y características medicinales, según la fuente y la estación del año en que se colecte <sup>103</sup>. Además del origen y la fuente del propóleo, existen otros factores que pueden afectar el contenido de fenoles totales y flavonoides, tales como el método de extracción y el disolvente. Estudios realizados han demostrado que, utilizar altas temperaturas en la extracción favorece el rendimiento del proceso, sin embargo, va en detrimento del porcentaje de compuestos fenólicos y de flavonoides en particular <sup>111</sup>.

Diversos autores han propuesto el contenido de flavonoides como índice de calidad para el propóleo crudo. En el 2007, Gardana sugirió que propóleos con un contenido inferior del 11% deberían considerarse de baja calidad, mientras que con porcentajes entre un 11-14%, 14-17% y más del 17%, podrían clasificarse como de calidad aceptable, buena y alta, respectivamente <sup>112</sup>. La legislación brasileña establece contenidos mínimos para flavonoides del 0,5% y compuestos fenólicos en general del 5% <sup>113</sup>. Asumiendo tales estándares, las muestras 20, 21 y 22 de propóleos ecuatorianos, podrían considerarse de alta calidad, pues los valores obtenidos para fenoles totales y flavonoides, superaron los mínimos establecidos, siendo incluso superiores a muchos de los informados en la tabla 4.

### **III.3. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC, *trolox equivalent antioxidant capacity*), utilizando los ensayos de DPPH y FRAP**

Existen múltiples métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*, sin embargo, los métodos *in vitro* permiten tener una idea aproximada de lo que ocurre, bajo situaciones más complejas, en un organismo vivo <sup>114</sup>.

La actividad antioxidante de las muestras objeto de investigación se desarrolló mediante dos técnicas (DPPH y FRAP), debido a que los antioxidantes pueden actuar por diferentes mecanismos, dependiendo del radical libre u oxidante que se utilice en el ensayo. En ambas los resultados se reportaron como equivalentes a trolox. De esta manera se comparó la capacidad antioxidante de los extractos con respecto al antioxidante sintético trolox, análogo soluble en agua de la vitamina E <sup>115</sup>.

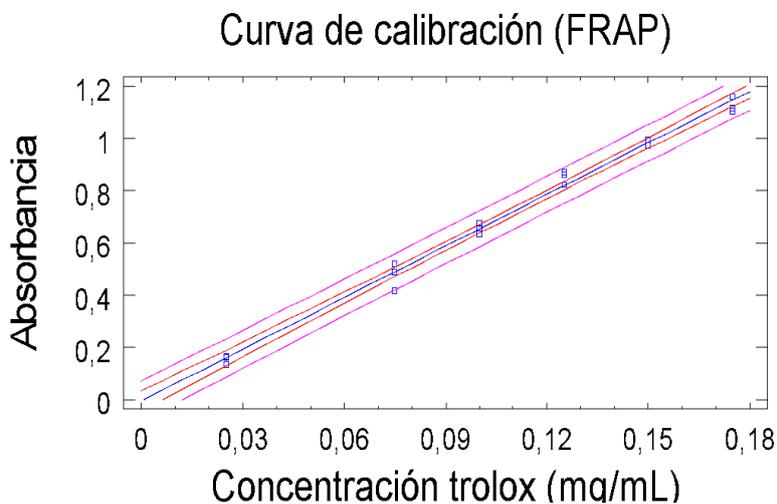
### III.3.1. TEAC-(FRAP)

El método resulta ser simple y económico. Este método espectrofotométrico es comúnmente conocido por sus siglas en inglés como FRAP (*Ferric ion Reducing Antioxidant Power*) y mide la capacidad de reducción de un complejo incoloro formado por el TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina) y el hierro férrico ( $Fe^{3+}$ ), a un complejo ferroso ( $Fe^{2+}$ ), el que muestra un color azul verdoso intenso ante la presencia de un medio ácido y de metabolitos antioxidantes <sup>88</sup>.

Para este ensayo, como antes se informó, se tomó como patrón de actividad antioxidante al trolox, por lo que los resultados se reportaron como equivalentes a trolox por cada gramo de ESP. La curva de calibración para tal análisis se muestra en la figura 7.

El análisis de regresión entre las variables demostró que existe una buena correlación entre la concentración de trolox y la absorbancia obtenida para cada disolución, con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,995865.

Figura 7: Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox por el método de FRAP.



El análisis de regresión lineal dio como resultado la Ec. 6, la que permitió determinar los miligramos equivalentes a trolox por cada gramo de muestra analizada (mg trolox/g).

$$Abs = -0,00547619 + 6,58286 * Conc\left(\frac{mg}{mL}\right) \quad \text{Ec. 6}$$

Luego de someter las muestras de propóleos a similares condiciones de análisis que el trolox, y con ayuda de la Ec. 6, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) en las tres muestras de propóleos analizadas, según el método de FRAP.

<b>Antioxidante (FRAP)</b>	
<b>Muestra</b>	<b>(TEAC)/g ESP</b>
	$\underline{X} \pm S$
<b>PE-20</b>	122,94 <sup>a</sup> ± 3,61
<b>PE-21</b>	69,96 <sup>b</sup> ± 2,50
<b>PE-22</b>	61,07 <sup>c</sup> ± 3,55

**Leyenda:** Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Al analizar los resultados obtenidos se puede plantear que la muestra PE-20 es la que muestra la mejor capacidad para reducir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , seguida de la PE-21 y PE-22. No obstante, aunque el análisis estadístico mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres valores, las dos últimas presentaron valores más cercanos entre sí.

### III.3.2. TEAC-(DPPH)

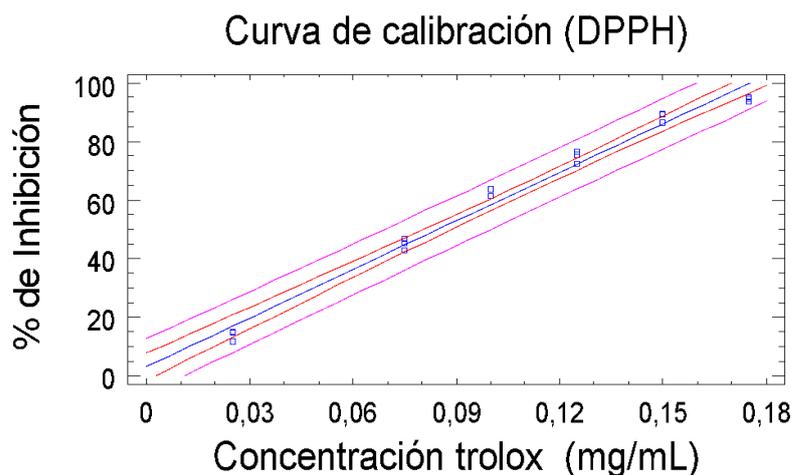
Los estudios realizados anteriormente mediante CCD, sugirieron la presencia de compuestos con actividad antioxidante, sin embargo, el método espectrofotométrico ofrece resultados de valor cuantitativo. Este método se basa en medir la capacidad que tiene una muestra de captar al radical libre DPPH, siempre que en ella existan metabolitos con propiedades antioxidantes. Dicho radical en disolución presenta un color violeta intenso el cual, al ser mezclado con una sustancia antioxidante, experimenta una decoloración de tal tonalidad, pudiendo llegar a un color amarillo claro. Esta decoloración es directamente proporcional a una disminución de la absorbancia de la solución inicial del radical DPPH <sup>116</sup>.

Para informar la capacidad secuestradora de las disoluciones se utilizó como estándar antioxidante al reactivo trolox, con el que se elaboró una curva de calibración con disoluciones metanólicas, en el rango de concentraciones entre 0,025-0,175 mg/mL. El análisis de regresión lineal dio como resultado la Ec. 7, la que permitió determinar el equivalente a trolox por cada gramo de muestra analizada (mg trolox/g).

$$\%Inh = 3,02463 + 552,693 * Conc \left( \frac{mg}{mL} \right) \quad \text{Ec. 7}$$

La curva obtenida para la cuantificación (Figura 8), demostró que existe una correlación positiva fuerte entre la concentración de trolox y el porcentaje de inhibición obtenido, con un coeficiente de correlación de 0,99175.

Figura 8: Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox por el método del DPPH.



Los resultados obtenidos para dicho análisis se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) en las tres muestras de propóleos analizadas, según el método del DPPH.

Antioxidante (DPPH)	
Muestra	(TEAC)/g ESP
	$\bar{X} \pm S$
PE-20	60,49 <sup>a</sup> ± 0,31
PE-21	24,34 <sup>b</sup> ± 1,39
PE-22	24,78 <sup>b</sup> ± 1,71

**Leyenda:** Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,05$ ).

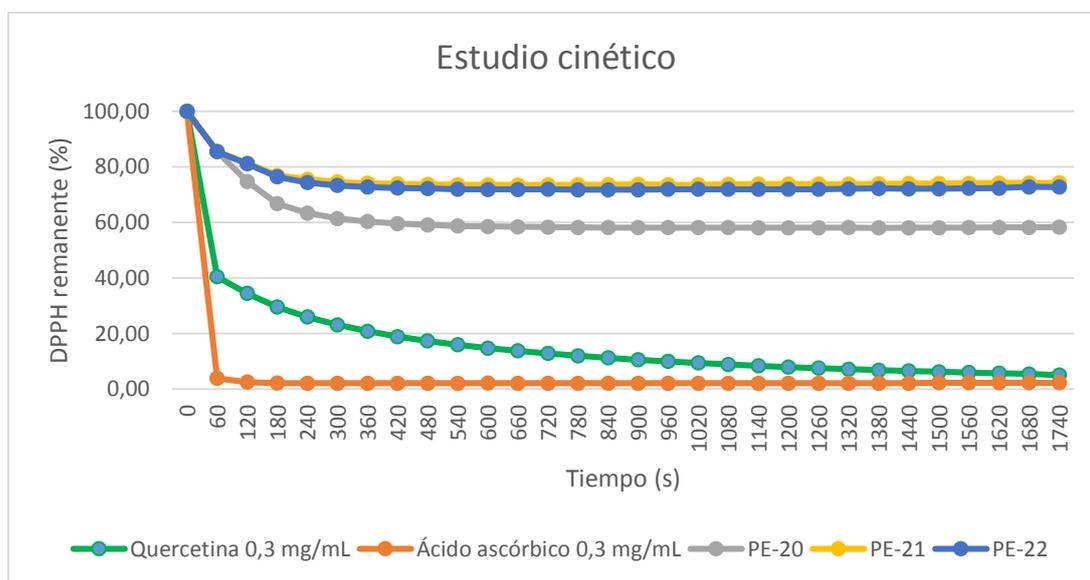
Para este ensayo se puede apreciar que la muestra PE-20 sigue siendo la de mayor actividad antioxidante, en este caso por la presencia de metabolitos secundarios capaces de secuestrar al radical libre DPPH. Sin embargo, las muestras restantes (PE-21 y PE-22) aunque difieren significativamente de la anterior, entre ellas no existen diferencias

estadísticamente significativas. De lo anterior pudiera deducirse que, aunque de fenoles totales y flavonoides estas dos muestras presentaron cantidades significativamente diferentes, dicha diferencia no es suficiente como para lograr captar radicales libres en diferente magnitud.

Como se puede apreciar los valores equivalentes a trolox por la técnica de FRAP son consistentemente superiores a los obtenidos para TEAC (DPPH). Resultados similares han sido referidos por otros autores y la razón, probablemente, esté atribuida a la presencia de metabolitos secundarios no reactivos frente al DPPH. Los compuestos antioxidantes, como los polifenoles, pueden ser agentes reductores más eficientes para el hierro férrico, pero es posible que algunos no eliminen los radicales libres de DPPH de manera similar, debido impedimentos estéricos <sup>117</sup>.

A continuación, se procedió a evaluar la cinética de la reacción con el DPPH, en las tres disoluciones de propóleos preparadas a la misma concentración (2 mg/mL), conjuntamente con dos patrones de reconocida actividad antioxidante (quercetina y ácido ascórbico). Los resultados se muestran en la figura 9.

Figura 9: Cinética de la reacción con DPPH para las tres muestras de propóleos (PE-20, PE-21, PE-22).



En cada una de las muestras de propóleos se evidenció una curva que desciende con rapidez para, posteriormente, alcanzar un comportamiento estacionario. Se debe señalar que las disoluciones fueron evaluadas a una sola concentración, sin embargo, en concordancia con los resultados mostrados en la tabla 6, las disoluciones PE-21 y PE-22,

a la concentración ensayada, no logran superar un porcentaje de inhibición superior al 30% (74,26 y 72,75% DPPH remanente, respectivamente), mientras que el propóleo PE-20 deja un porcentaje remanente del 58,30%, lo que reafirma que la compleja mezcla de metabolitos presentes en esta, le da la posibilidad de secuestrar mayor cantidad de radicales libres para un mismo tiempo.

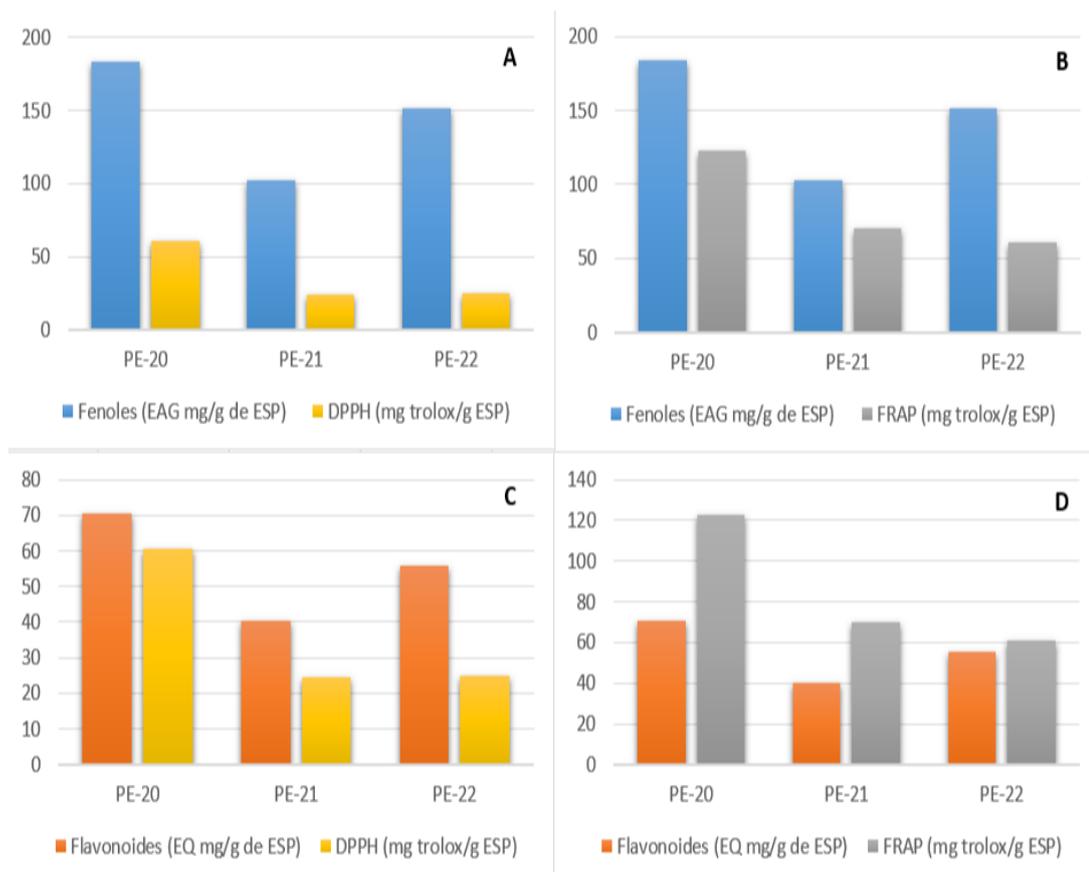
Por otra parte, al comparar el comportamiento del propóleo con los estándares analizados, se puede apreciar que el ácido ascórbico logró alcanzar el estado estacionario más rápidamente, en apenas 60 segundos. Según Brand-Williams y otros autores, no todos los metabolitos revelan una misma cinética de reacción<sup>118</sup>. Compuestos tales como el ácido ascórbico, reaccionan rápidamente con el DPPH, alcanzando su máximo de actividad por debajo de los 60 s, lo que también sucede con el ácido isoascórbico y el isoeugenol. Otros metabolitos como el  $\alpha$ -tocoferol o el ácido rosmarínico, presentan un comportamiento cinético intermedio, ya que tal estado estacionario lo alcanzan entre los 300 s y los 1800s. Según el ensayo realizado la quercetina y las muestras objeto de estudio presentaron un comportamiento cinético acorde a tales metabolitos. Lógicamente, se recomienda evaluar el comportamiento cinético de las disoluciones de propóleos más concentradas, para de esa manera poder realizar una comparación más certera con dichos estándares de actividad antioxidante reconocida.

### **III.3.3. Correlación entre la composición química determinada y la actividad antioxidante**

Para la gran mayoría de propóleos, aun cuando su contenido en compuestos fenólicos varía según el origen botánico, se han informado efectos antioxidantes. En estudios con propóleos de diferente origen geográfico y botánico se evidencia que la actividad antioxidante se correlaciona muy bien con la concentración total de polifenoles<sup>12,15,23,29,34,119</sup>.

Realizando un análisis comparativo entre la composición química determinada y los resultados de la capacidad antioxidante para la muestra PE-20, se apreció que, cuando existen altas concentraciones de compuestos fenólicos en general y de flavonoides en particular, la actividad antioxidante resultante por ambos modelos evaluados, se ve favorecida. En los cuatro gráficos dicha muestra presenta los mejores resultados en ambos parámetros.

Figura 10: Correlación entre la composición química determinada y la capacidad antioxidante de las tres muestras de propóleos.



Sin embargo, para la muestra PE-22, aun cuando presenta la segunda mayor cantidad de ambos metabolitos, su capacidad secuestradora del DPPH es estadísticamente similar a la PE-21 (Figura 10, A y C). Sin embargo, para la capacidad de transformar el  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ , la muestra PE-21, con menor cantidad de fenoles totales y de flavonoides resultó ser significativamente mejor (Figura 10 B y D).

En la tabla 7 se observan las correlaciones realizadas entre los resultados de la evaluación antioxidante por ambos métodos ( $TEAC_{DPPH}$  y  $TEAC_{FRAP}$ ), así como entre estos y el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides.

Tabla 7: Correlaciones entre compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante.

<b>Correlación entre parámetros</b>	<b>Coefficiente de correlación (R<sup>2</sup>)</b>
TEAC <sub>DPPH</sub> vs TEAC <sub>FRAP</sub>	0,979
TEAC <sub>DPPH</sub> vs contenido de fenoles	0,780
TEAC <sub>DPPH</sub> vs contenido de flavonoides	0,807
TEAC <sub>FRAP</sub> vs contenido de fenoles	0,727
TEAC <sub>FRAP</sub> vs contenido de flavonoides	0,778

Analizando la correlación existente entre la capacidad antioxidante medida por ambos métodos (0,979), se evidencia que esta es positiva, muy fuerte y superior a los valores de R<sup>2</sup> obtenidos para el resto de los parámetros correlacionados. Lo anterior pudiera atribuirse a que los compuestos presentes en las muestras de propóleos, capaces de reducir los radicales libres, también fueron capaces de reducir los iones férricos; resultados análogos han sido referidos por otros autores, al evaluar la capacidad antioxidante de extractos de plantas por métodos similares <sup>117</sup>.

Las correlaciones correspondientes a los parámetros restantes (TEAC<sub>DPPH</sub>/fenoles totales; TEAC<sub>DPPH</sub>/flavonoides; TEAC<sub>FRAP</sub>/fenoles; TEAC<sub>FRAP</sub>/flavonoides) muestran un valor de R<sup>2</sup> que podría catalogarse como una correlación positiva media, entre los resultados analizados. Este comportamiento ha sido antes observado en experimentos análogos con muestras de propóleos colombianos <sup>15</sup>. Lo observado pudiera atribuirse a que el método de Folin-Ciocalteu es apropiado para compuestos fenólicos, sin embargo, la actividad antioxidante no es exclusivamente atribuida a compuestos de naturaleza fenólica <sup>120</sup>. No se descarta, además, la posibilidad de que existan interacciones sinérgicas entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos, lo cual podría favorecer la capacidad antioxidante <sup>121</sup>. Adicionalmente, los compuestos fenólicos, dependiendo de la cantidad de grupos fenólicos que tienen, pueden responder de manera diferente al reactivo Folin-Ciocalteu <sup>122</sup>. No obstante, es necesario un análisis cualitativo y cuantitativo más detallado de los marcadores químicos de dichos propóleos, para, de esa manera, poder establecer una mejor correlación con su actividad antioxidante.

El propóleos es una fuente potencial de antioxidantes naturales, tales como los ácidos fenólicos y los flavonoides. Por múltiples razones, en el mundo actual se presta cada vez más atención a las sustancias naturales capaces de contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, que subyace en enfermedades tales como, la diabetes, el cáncer y la aterosclerosis <sup>123</sup>. Dependiendo de sus fuentes botánicas, el propóleos contiene cantidades variables de flavonoides, que son compuestos orgánicos reconocidos por su actividad antioxidante. Entre todos los compuestos polifenólicos que existen en la naturaleza, los flavonoides han sido los más investigados, siendo asociados a numerosos estudios, la mayoría de ellos relacionados con los efectos quimiopreventivos de tales metabolitos. Estos compuestos se pueden encontrar en las resinas de los árboles, de donde generalmente se obtiene el propóleos <sup>102</sup>. Estudios refieren que metabolitos identificados en propóleos como son: la crisina, galangina, kaempferol y quercetina, disminuyen la producción de óxido nítrico <sup>124</sup>.

Aunque la composición del propóleos es muy variada, uno de sus componentes más estudiados es el éster fenólico del ácido cafeico (CAPE, siglas en inglés) del que se plantea puede bloquear la producción de especies reactivas de oxígeno en varios sistemas, de hecho, ha sido identificado al CAPE como uno de los principales compuestos quimiopreventivos del propóleos <sup>125</sup>. También se informa que la actividad antioxidante significativa de dicho compuesto fenólico, guarda estrecha relación con su efecto neuroprotector <sup>126</sup> y con la actividad antiinflamatoria que posee <sup>127</sup>.

## CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

- Los rendimientos logrados, luego del proceso de maceración dinámica realizado en las tres muestras de propóleos, resultaron ser buenos, con valores cercanos al 50%.
- Los ensayos cualitativos realizados sugirieron la presencia, fundamentalmente, de compuestos fenólicos en general y de flavonoides, además de la capacidad antioxidante. Adicionalmente, se sugiere un comportamiento cromatográfico similar para las tres muestras y la existencia de metabolitos de estructura terpénica.
- La muestra procedente de Pichincha (PE-20) presentó la mayor cantidad de compuestos fenólicos (EAG) y de flavonoides (EQ), seguida de la muestra de Imbabura (PE-22) y de Los Ríos (PE-21), respectivamente.
- La muestra PE-20 presentó la mayor capacidad antioxidante equivalente a trolox, determinada por los ensayos de DPPH y FRAP. Sin embargo, aunque la muestra PE-21 resultó ser más efectiva para reducir férrico a ferroso que la PE-22; en relación a la capacidad secuestradora del DPPH, no mostraron diferencias estadísticamente significativas.
- Las elevadas concentraciones de compuestos fenólicos totales y de flavonoides en la muestra procedente de Pichincha (PE-20), favorecieron a dicha muestra con la mejor actividad antioxidante, por ambos modelos evaluados.
- Analizando la correlación existente entre la capacidad antioxidante medida por ambos métodos, se evidencia que esta es positiva y muy fuerte. Las correlaciones correspondientes a los parámetros restantes ( $TEAC_{DPPH}/\text{fenoles totales}$ ;  $TEAC_{DPPH}/\text{flavonoides}$ ;  $TEAC_{FRAP}/\text{fenoles}$ ;  $TEAC_{FRAP}/\text{flavonoides}$ ) podría catalogarse como positiva media.

## **CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES**

- Realizar un análisis cualitativo y cuantitativo más detallado de los marcadores químicos de las tres muestras de propóleos, para establecer una mejor correlación con su actividad antioxidante.
- Evaluar el comportamiento cinético de las disoluciones de propóleos a varias concentraciones más elevadas.
- Establecer el origen botánico de los propóleos estudiados procedentes de apiarios localizados en Pichincha, Los Ríos e Imbabura.

## ANEXOS

Anexo 1: Compuestos químicos identificados en propóleos provenientes de diferentes localizaciones geográficas.

COMPUESTOS	CITA BIBLIOGRÁFICA
<b>COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	
● Flavonoides	
Flavonas	
Kaempferol	
Crisina	
Galangina	
Ramnocitrina	
Ramnacina	
Isalpinina	
Betuletol	
Tectocrisina	
Acacetina	
Apigenina	7, 9, 12, 14, 15, 18-22, 26, 30, 31,
Luteolina	34-37, 45, 47, 51, 56, 61, 62, 69,
Fisetina	74, 75, 82, 85, 107, 117, 126-134,
4-dimetoxiflavona	135-137, 139-141
Morina	
Genkwanina	
Hispidulina	
Flavonoles	
Kaempferido	
Butelenol	
Rhamnacina	
Isorhamnetina	
Ermanina.	
Quercetina	
Flavanonas	
Naringenina	
Pinocembrina	
Pinostrobina	
Sakuranetina	
Isosakuranetina	
Hesperidina	
4-dimetoxiflavonona	
Pinobanskina (3,5,7-trihidroxiflavanona)	
Pectolinaringenina	
Isoflavonoides	
Pterocarpanos	
Neoflavonoides	

---

Chalconas y dihidrochalconas

Alpinetina chalcona  
Naringenina chalcona  
Pinostrobina chalcona  
Pinocembrina chalcona  
Pinobanksina chalcona  
Sakuranetina chalcona

Antocianidinas

● Compuestos fenólicos simples

Fenoles simples

Fenilpropanoides

Cumarinas

Ácido cumarínico  
Esculetolo  
Scopoletolo  
Esculetina  
Escopoletina

Xantonas

Estilbenos

Resveratrol  
Pterostilbeno

Lignanós

Sesamina  
Yangambina  
Sesartenina

Ácidos fenólicos

Ácido cafeico  
Ácido cinámico  
Ácido p-cumárico  
Ácido ferúlico  
Ácido isoferúlico  
Ácido quínico  
Ácido clorogénico  
Éster fenétlico del ácido cafeico (CAPE)

---

**TERPENOS**

● Monoterpenos

$\alpha$ -pinano  
 $\beta$ -pinano  
 $\gamma$ -terpinano  
Geraniol  
Propionato de linalilo

7, 9, 12, 15, 18, 19, 22, 32, 35-37,  
45, 47, 69, 74, 84, 130, 132, 137,  
138, 140

● Diterpenos

Ácido pimárico  
Ácido isopimarico  
Ácido imbricatoloico  
Ácido comunico

- 
- Ácido isocuprésico
  - Ácido acetilisocuprésico
  - Ácido abiético
  - Clerodano
  - Triterpenos
    - Cicloartenol
    - $\alpha$  y  $\beta$ -amirina
    - Acetato de  $\alpha$ -amirina
    - Acetato de  $\beta$ -amirina
    - Cicloartenol
    - Escualeno
    - Lanosterol
    - Lupeol
    - Lupenona
  - Sesquiterpenos
    - Ledol
    - Spatulenol
    - Isospatulenol
    - Palustrol
    - Ledeno
    - Germacreno D

---

## ÁCIDOS ORGÁNICOS

- Ácidos aromáticos y derivados
  - Ácido hidroxí-4 benzoico
  - Ácido metoxi-4 benzoico
  - Ácido protocatéquico
  - Ácido gálico
  - Ácido ftálico
  - Ácido salicílico
  - Ácido gentísico
  - Fenilmetil éster de ácido benzoico
  - Fenilmetil éster de ácido salicílico
  - Benzoato de transconiferilo
- Ácidos p-coumáricos prenilados
  - 3-prenilcinamato de alilo
  - Artepillina C
  - Ácido -3-prenil-4-hidroxi-cinámico
  - Ácido-3,4-dimetoxicinámico
- Ácidos grasos
  - Ácido linoleico
  - Ácido oleico
  - Ácido esteárico
  - Ácido mirístico
  - Ácido pentadecanoico
  - Ácido palmítico
  - Ácido undecanóico

7, 14, 15, 19, 37, 45, 51, 75, 82,  
107, 126, 128, 130, 132

- 
- Ácidos alifáticos
    - Ácido 4-hidroxi-butírico
    - Ácido 3-hidroxi-butírico
    - Ácido nicotínico
    - Ácido láctico
- 

### **ALDEHIDOS AROMÁTICOS**

- Vainillina 19, 22, 26, 32, 45, 61, 62, 82, 126,
  - Isovainilla 127, 130, 132
  - Aldehídos caproicos
- 

### **ÉSTERES**

- Palmitato de metilo
  - Palmitato de etilo
  - Ácido esteárico
  - Éster metílico 7, 9, 12, 14, 15, 19, 47, 69, 82,
  - Éster ftalato 130, 132
  - Benzoato de bencilo
  - Benzil-trans-4- cumarato
  - 3-metil-3-cafeína de butenilo
  - Cafeato de bencilo
  - Cafeato de feniletilo
  - Cafeato de cinamilo
  - Cafeato de tetradecilo
- 

### **SAPONINAS**

21, 82, 127

### **TANINOS**

21, 82, 127

---

### **CETONAS AROMÁTICAS**

- Benzofenonas polipreniladas 14, 19, 22, 26, 35, 63, 82, 128,
  - Propolonas A-D 130, 132, 134, 139
  - Garcinielliptona.
  - Hiperibona B
  - Nemorosoma
- 

### **HIDROCARBUROS**

- Alcanos 9, 132
  - Alquenos
  - Alcadienos
- 

### **ESTEROIDES**

- Colesterol 12, 14, 19, 26, 32, 45, 47, 82, 130,
  - 132
  - Fucosterol
  - Estigmasterol
- 

### **AZÚCARES**

- Xilosa
  - Galactosa
  - Manosa
  - Lactosa
-

---

● Maltosa	12, 14, 15, 19, 20, 47, 51, 82, 128,
● D-ribofuranosa	131, 132
● D-fructosa	
● D-glucitol	
● D-gulosa	
● Talosa	
● Sacarosa	
● D-glucosa	
● Polioles	
Inositol	
Eritritol	
Xilitol	

---

### VITAMINAS

● B1	
● B2	
● B6	14, 19, 20, 22, 61, 82, 128, 129,
● C	132
● E	
● Ácido nicotínico	
● Provitamina A	

---

### AMINOÁCIDOS

● Arginina	
● Prolina	
● Isoleucina	
● Leucina	
● Alanina	
● B-alanina	
● Ácido $\alpha$ -amino butírico	12, 14, 19, 22, 26, 32, 51, 82, 85,
● Ácido $\gamma$ -amino butírico	128, 132
● Asparagina	
● Ácido aspártico	
● Cistina	
● Cisteína	
● Ácido glutámico	
● Glicina	
● Histidina	
● Hidroxiprolina	
● Lisina	
● Metionina	
● Ornitina,	
● Fenilalanina	
● Prolina	
● Ácido piroglutámico	
● Serina	
● Treonina	

---

- 
- Triptófano
  - Tirosina
  - Valina
- 

### **OLIGOELEMENTOS**

- Cadmio
  - Calcio
  - Cobalto
  - Cobre
  - Potasio
  - Aluminio
  - Bario
  - Mercurio
  - Hierro
  - Magnesio
  - Manganeso
  - Selenio
  - Zinc
- 9, 14, 19, 20, 22, 26, 47, 61, 82,  
85, 129, 132
-

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Maldonado, L. M.; Borelli, R. S.; Salomon, V. M.; Alvarez, A. R.; Sayago, J.; Isla, M. I.; Borelli, V. Clasificación geográfica de propóleos de Tucumán utilizando parámetros físicoquímicos y análisis quimiométrico. *Rev. Investig. Agropecu.* **2018**, 44 (3), 324-332.
- (2) Delgado, M. D.; Andrade, J. Á.; Ramírez, C. A. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en El Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Rev. Mex. Cienc. For.* **2018**, 6 (28), 74-97. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i28.270>
- (3) Ozdal, T.; Sari, G.; Mutlu, E.; Boyacioglu, D.; Capanoglu, E. Evaluation of turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity, anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line. *J. Apic. Res.* **2018**, 57 (5), 627-638. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494888>
- (4) Sánchez, F. Perfil químico y evaluación de actividad antioxidante de propóleos recolectados en La Región Del Bajo Cauca Antioqueño. Tesis en opción al título de Magister en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, **2018**.  
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/68744/1129503639.2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- (5) Lopes, M.; Nunes, L. F.; Falcão, S. I; Vilas, M. Harmonização de metodologias de análise da própolis. *Rev. Ciências Agrárias.* **2017**, 40 (Spe), 208-215. <https://doi.org/10.19084/rca16225>
- (6) Sosa, Á. A.; Cabrera, M. G.; Álvarez, M. Y. Parámetros físicos y características organolépticas de propóleos provenientes de la provincia de Misiones, Argentina. *J. Selva Andin. Biosph.* [Online]. **2017**, 5 (1), 51-58.  
[http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2308-38592017000100006](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592017000100006)
- (7) Rufatto, L. C.; Dos Santos, D. A.; Marinho, F.; Henriques, J. A. P.; Roesch, M.; Moura, S. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacif. J. of Trop. Biomedic.* **2017**, 7 (7), 591-598.  
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.06.009>

- (8) Campo, M.; Cuesta, O.; Montes, R.; Porto, D. O. Qualitative analysis of cuban propolis by thin layer chromatography. *Lat. Am. J. Pharm.* [Online]. **2008**, 27 (3), 380-386.  
[https://www.researchgate.net/publication/297807781\\_Qualitative\\_analysis\\_of\\_Cuban\\_propolis\\_by\\_thin\\_layer\\_chromatography](https://www.researchgate.net/publication/297807781_Qualitative_analysis_of_Cuban_propolis_by_thin_layer_chromatography)
- (9) Vargas, R. D.; Torrescano, G. R.; Sánchez, A. El propóleos: Conservador potencial para la industria alimentaria. *Intercienc.* [Online]. **2013**, 38 (10), 705-711.  
[https://www.researchgate.net/publication/264083805\\_EL\\_PROPOLEOS\\_CONSERVADOR\\_POTENCIAL\\_PARA\\_LA\\_INDUSTRIA\\_ALIMENTARIA](https://www.researchgate.net/publication/264083805_EL_PROPOLEOS_CONSERVADOR_POTENCIAL_PARA_LA_INDUSTRIA_ALIMENTARIA)
- (10) Silva, M.; Torres, A.; Hoffmann, W. Determinación de propiedades fisicoquímicas de propóleos provenientes de cinco especies de abejas sin aguijón de Norte de Santander-Colombia. *Bistua Rev. Fac. Cienc. Basic.* **2016**, 14 (1), 3-16.  
<https://doi.org/10.24054/01204211.v1.n1.2016.1928>
- (11) Puerto, N. J.; Prieto, G. A.; Castro, S. R. Análisis proximal y fisicoquímico de propóleos (*propolis*) provenientes de apiarios boyacenses. *Bistua Rev. Fac. Cienc. Basic.* **2016**, 14 (2), 126-140. <https://doi.org/10.24054/01204211.v2.n2.2016.2189>
- (12) Salgueiro, F. B.; Castro, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. *Quim. Nova.* **2016**, 39 (10), 1192-1199. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160136>
- (13) Bastos, E.; Guzman, D.; Figueroa, J.; Tello, J.; Scoaris, D. O. Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de muestras de propóleos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) de la Región Andina Colombiana. *Act. Biológ. Colomb.* [Online]. **2011**, 16 (1), 175–184.  
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/10346/21572>
- (14) Anjum, S. I.; Ullah, A.; Khan, K. A.; Attaullah, M.; Khan, H.; Ali, H.; Bashir, M.; Tahir, M.; Ansari, M. J.; Ghramh, H. A.; et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A Review. *Saudi J. of Biolog. Scienc.* **2019**, 26 (7), 1695-1703. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>
- (15) Palomino, L. R.; García, C. M.; Gil, J.; Rojano, B. A.; Durango, D. L. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae.*

- [Online]. **2009**, 16 (3), 388-395. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042009000300013&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042009000300013&script=sci_abstract&tlng=es)
- (16) Al, M. Propolis and its direct and indirect hypoglycemic effect. *J. Fam. Community Med.* **2011**, 18 (3), 152-154. <https://doi.org/10.4103/2230-8229.90015>
- (17) Bankova, V.; Bertelli, D.; Borba, R.; Conti, B. J.; Da Silva, I. B.; Danert, C.; Eberlin, M. N.; Falcão, S.; Isla, M. I.; Moreno, M. I. N.; et al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *J. Apicult. Research.* **2019**, 58 (2), 1-49. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>
- (18) Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* **2000**, 31 (1), 3-15. <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>
- (19) Kuropatnicki, A. K.; Szliszka, E.; Krol, W. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-based Comp. Alt. Med.* **2013**, 6 (2) 1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/964149>
- (20) Soto, M. R. Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. *In Cresc.* [Online]. **2015**, 6 (2), 22-32. [https://www.researchgate.net/publication/290418655\\_Metabolitos\\_secundarios\\_cuantificacion\\_de\\_fenoles\\_y\\_flavonoides\\_totales\\_de\\_extractos\\_etanolicos\\_de\\_propoleos\\_de\\_tres\\_localidades\\_del\\_Peru](https://www.researchgate.net/publication/290418655_Metabolitos_secundarios_cuantificacion_de_fenoles_y_flavonoides_totales_de_extractos_etanolicos_de_propoleos_de_tres_localidades_del_Peru)
- (21) Dos Santos, D. C.; David, J. M.; Pereira, J. D. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. *Quim. Nova.* **2017**, 40 (2), 171-175. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160174>
- (22) Rodríguez, Y.; Sánchez, F.; Rojano, B.; Durango, D.; Gil, J.; Marín, J. Physicochemical characterization and evaluation of antioxidant activity of propolis collected in the Atlántic Department, Colombia. *Rev. U.D.C.A Act. Divulg. Cient.* [Online]. **2012**, 15 (2), 303-311. [https://www.researchgate.net/publication/262670147\\_PHYSICOCHEMICAL\\_CHARACTERIZATION\\_AND\\_EVALUATION\\_OF\\_ANTIOXIDANT\\_ACTIVITY\\_OF\\_PROPOLIS\\_COLLECTED\\_IN\\_THE\\_ATLANTIC\\_DEPARTMENT\\_COLOMBIA](https://www.researchgate.net/publication/262670147_PHYSICOCHEMICAL_CHARACTERIZATION_AND_EVALUATION_OF_ANTIOXIDANT_ACTIVITY_OF_PROPOLIS_COLLECTED_IN_THE_ATLANTIC_DEPARTMENT_COLOMBIA)

- (23) Belfar, M. L.; Lanez, T.; Rebiai, A.; Ghiaba, Z. Evaluation of antioxidant capacity of propolis collected in various areas of Algeria using electrochemical techniques. *Int. J. Electrochem. Sci.* [Online]. **2015**, 10 (1), 9641-9651.  
[https://www.researchgate.net/publication/282672044\\_Evaluation\\_of\\_Antioxidant\\_Capacity\\_of\\_Propolis\\_Collected\\_in\\_Various\\_Areas\\_of\\_Algeria\\_Using\\_Electrochemical\\_Techniques](https://www.researchgate.net/publication/282672044_Evaluation_of_Antioxidant_Capacity_of_Propolis_Collected_in_Various_Areas_of_Algeria_Using_Electrochemical_Techniques)
- (24) Martínez, G.; Garcia, C. M.; Durango, D. L.; Gil, J. H. Caracterización de propóleos provenientes del Municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Rev. MVZ Cordoba.* **2012**, 17 (1), 2861-2869. <https://doi.org/10.21897/rmvz.254>
- (25) Palomino, L. R.; Martínez, J.; García, C. M.; Durango, D. L.; Gil, J. H. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Fac. Ciencias Agrar.* [Online]. **2009**, 63 (1), 5373-5383. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472010000100013&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472010000100013&script=sci_abstract&tlng=es)
- (26) Pobiega, K.; Kraśniewska, K.; Derewiaka, D.; Gniewosz, M. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, 56 (2), 5386-5395.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-04009-9>
- (27) Nogueira, K. B.; Rodriguez, E. M.; De Franca, M. M. Propolis and Its cosmetic applications: a technological propection. *J. Young Pharm.* **2019**, 11 (4), 350-352.  
<https://doi.org/10.5530/jyp.2019.11.72>
- (28) Carhuapoma, M.; Loayza, B.; Tinco, J.; López, S.; Iannacone, S.; Chávez, M. Efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis Mellifera* “ABEJA” en anillos traqueales aislados de *Cavia Porcellus* “COBAYOS.” *Cienc. Invest.* **2017**, 19 (1), 13-18. <https://doi.org/10.15381/ci.v19i1.13622>
- (29) Hernández, M. S.; Abraham, M. del R.; Cerón, A.; Ozuna, C.; Gutiérrez, A. A.; Segoviano, J. de J. N.; Avila, F. Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Sci. Technol.* **2018**, 38 (2), 210-215. <https://doi.org/10.1590/fst.29916>

- (30) Rosado, A.; Cuesta, O.; Campo, M.; Márquez, I.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. Otros isoflavonoides en propóleos cubanos. *Rev. Cuba. Quím.* [Online]. **2005**, 17 (3), 237. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543687094>
- (31) Bucio, C. M.; Martínez, O. A. Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del Municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agron. Mesoam.* **2016**, 28 (1), 223-227. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.24253>
- (32) Moncayo, M. del R.; Moreno, A.; Galván, G. S.; Reyes, J. L.; Carrillo, M. L. Antibacterial activity and phenolic content of propolis extracts obtained by different extraction methods. *Nov. Sci.* **2018**, 10 (20), 397-412. <https://doi.org/10.21640/ns.v10i20.1392>
- (33) Oldoni, T. L.; Oliveira, S. C.; Andolfatto, S.; Karling, M.; Calegari, M. A.; Sado, R. Y.; Maia, F. M. C.; Alencar, S. M.; Lima, V. A. Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees *Apis mellifera*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, 26 (10), 2054-2062. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150186>
- (34) Almeida, W. A.; Antunes, A. S.; Penido, R. G.; Correa, H. S.; Nascimento, A. M.; Andrade, Â. L.; Santos, V. R.; Cazati, T.; Amparo, T. R.; Souza, G. H.; et al. Photoprotective activity and increase of spf in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2019**, 29 (3), 373-380. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.02.003>
- (35) Augusto, T. R.; De Oliveira, J.; Da Gloria, E. M.; Spoto, M. H.; Godoy, K.; De Souza, T. M.; Scheuermann, E. Benefits of superfine grinding method on antioxidant and antifungal characteristic of brazilian green propolis extract. *Sci. Agric.* **2019**, 76 (5), 398-404. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0056>
- (36) De Souza, E. C.; Da Silva, E. J.; Cordeiro, H. K.; Lage, N. M.; Da Silva, F. M.; Dos Reis, D. L.; Porto, C.; Pilau, E. J.; Da Costa, L. A.; De Souza, A. D.; et al. Chemical compositions and antioxidant and antimicrobial activities of propolis produced by *Frieseomelitta longipes* and *Apis mellifera* bees. *Quim. Nova.* **2018**, 41 (5), 1-7. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170208>
- (37) Lima, V. H.; Almeida, K de C.; Alves, C. C.; Rodrigues, M. L.; Crotti, A. E.; Souza, J. M.; Ribeiro, A. B.; Squarisi, I. S.; Tavares, D. C.; Martins, C. H.; et al. Biological

- properties of volatile oil from brazilian brown propolis. *Braz. J. Pharmacogn.* **2019**, 29 (6), 807-810. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.07.004>
- (38) Oroian, M.; Dranca, F.; Ursachi, F. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, 57 (1), 70-78. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04031-x>
- (39) Leonhardt, S. D.; Schmitt, T.; Blüthgen, N. Tree resin composition, collection behavior and selective filters shape chemical profiles of tropical bees (Apidae: Meliponini). *PLoS One.* **2011**, 6 (8), 1-10.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023445>
- (40) Solorzano, E. R.; Bortolini, C.; Bogialli, S.; Di Gangi, I. M.; Favaro, G.; Maldonado, L.; Pastore, P. Use of a LC-DAD-QTOF System for the characterization of the phenolic profile of the argentinean plant zuccagnia punctata and of the related propolis: new biomarkers. *J. Funct. Foods.* **2017**, 33 (1), 425-435. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.003>
- (41) Da Cruz, E. T.; Da Silva, M. C.; Oliveira, J. M.; Kamiya, R. U.; Arruda, R. E.; Vieira, D. A.; Silva, V. da C.; Escodro, P. B.; Basílio, I. D.; Do Nascimento, T. G. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with brazilian red propolis extract. *J. Pharm. Anal.* **2017**, 7 (5), 280-287.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.03.004>
- (42) Galeotti, F.; Maccari, F.; Fachini, A.; Volpi, N. Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. *Foods.* **2018**, 7 (3), 1-10.  
<https://doi.org/10.3390/foods7030041>
- (43) Mendonça, L.; Mota, E.; Lopez, B.; Sawaya, A.; Freitas, L.; Jain, S.; Batista, M.; Araújo, E. Chemical and genetic similarity between *Dalbergia ecastaphyllum* and Red Propolis from the Northeastern Brazil. *J. Apic. Res.* **2017**, 56 (1), 32-39.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1277603>
- (44) Alday, E.; Navarro, M.; Garibay, A.; Robles, R.; Hernandez, J.; Velazquez, C. Advances in pharmacological activities and chemical composition of propolis

- produced in Americas. *Beekeep. and Bee Conserv. – Adv. Research.* **2016**.  
<https://doi.org/10.5772/63145>
- (45) Cuesta, O.; Piccinelli, A. L.; Campo, M.; Márquez, I.; Rosado, A.; Rastrelli, L. Chemical characterization of cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow cuban varieties of propolis. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55 (18), 7502-7505. <https://doi.org/10.1021/jf071296w>
- (46) De la Cruz, J. A.; Benavides, F.; Sánchez, J. G.; Vázquez, M. de la L.; Ruiz, A. J. Propolis in aquaculture: A review of its potential. *Rev. in Fish. Scienc. and Aquac.* **2018**, 26 (3), 337-349. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1424798>
- (47) Benítez, N.; Ortega, N.; Cabezas, F. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del Departamento Del Cauca. *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroind. BSAA*. [Online]. **2011**, 9 (1), 8-16. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotechnologia/article/view/766>
- (48) Bracho, J.; Rodríguez, C.; Llanes, F. Triterpenos pentacíclicos en propóleo. *Rev. la Soc. Quím. Perú*. [Online]. **2009**, 75 (4), 439-452.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371937615006>
- (49) Yang, L.; Yan, Q. H.; Ma, J. Y.; Wang, Q.; Zhang, J. W.; Xi, G. X. High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in propolis. *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, 12 (5), 771-776.  
<https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i5.17>
- (50) Andrade, J. K.; Denadai, M.; De Oliveira, C. S.; Nunes, M. L.; Narain, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian Northeast Region. *Food Res. Int.* **2017**, 101, 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.066>
- (51) Paula, V. B.; Estevinho, L. M.; Dias, L. G. Quantification of three phenolic classes and total phenolic content of propolis extracts using a single UV-Vis spectrum. *J. Apic. Res.* **2017**, 56 (5), 569-580. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1370904>
- (52) Cottica, S. M.; Sawaya, A. C.; Eberlin, M. N.; Franco, S. L.; Zeoula, L. M.; Visentainer, J. V. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22 (5), 929-935.  
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000500016>

- (53) Schmidt, E. M.; Stock, D.; Chada, F. J.; Finger, D.; Frankland, A. C.; Eberlin, M. N.; Felsner, M. L.; Quináia, S. P.; Monteiro, M. C.; Torres, Y. R. Comparison between characterization and biological properties of brazilian fresh and aged propolis. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 2014, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2014/257617>
- (54) Righi, A. A.; Alves, T. R.; Negri, G.; Marques, L. M.; Breyer, H.; Salatino, A. Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, 91 (13), 2363-2370. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4468>
- (55) Araújo, K. S.; dos Santos Júnior, J. F.; Sato, M. O.; Finco, F. D.; Soares, I. M.; Barbosa, R.; Alvim, T. D.; Ascêncio, S. D.; Mariano, S. M. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and apis from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amaz.* **2016**, 46 (1), 61-68. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201501045>
- (56) Ahn, M. R.; Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Bang, K. S.; Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of korea. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (24), 7286-7292. <https://doi.org/10.1021/jf048726s>
- (57) Ahn, M. R.; Kumazawa, S.; Usui, Y.; Nakamura, J.; Matsuka, M.; Zhu, F.; Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* **2007**, 101 (4), 1383-1392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.045>
- (58) Hatano, A.; Nonaka, T.; Yoshino, M.; Ahn, M. R.; Tazawa, S.; Araki, Y.; Kumazawa, S. Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. *Food Sci. Technol. Res.* **2012**, 18 (4), 577-584. <https://doi.org/10.3136/fstr.18.577>
- (59) Guo, X.; Chen, B.; Luo, L.; Zhang, X.; Dai, X.; Gong, S. Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of chinese propolis. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59 (23), 12610-12616. <https://doi.org/10.1021/jf202818p>
- (60) Alaribe, C. S.; Esposito, T.; Sansone, F.; Sunday, A.; Pagano, I.; Piccinelli, A. L.; Celano, R.; Cuesta, O.; Coker, H. A.; Nabavi, S. M.; et al. Nigerian Propolis: Chemical composition, antioxidant activity and  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Nat. Prod. Res.* **2019**. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1682576>

- (61) Peña, R. Estandarización en propóleos: Antecedentes químicos y biológicos. *Cienc. Investig. Agrar.* **2008**, 35 (1), 17-26. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202008000100002>
- (62) Cuesta, O; Campo, M.; Márquez, I.; Rosado, A.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. Nuevas benzofenonas preniladas en propóleos cubanos. *Rev. Cuba. Quím.* [Online] **2005**, 17 (3), 238. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543687095>
- (63) Cabral, I. S.; Oldoni, T. L.; Prado, A.; Bezerra, R. M.; De Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis Vermelha Brasileira. *Quim. Nova.* **2009**, 32 (6), 1523-1527. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600031>
- (64) Tolosa, E, L. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *ARS Pharm.* [Online] **2002**, 43 (1-2), 187-204. <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5681>
- (65) Huaytalla, R. M.; Gálvez, C. M.; Carhuapoma, M.; Alvarez, M. A.; López, S. Efecto inhibitor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. *Rev. Estomatol. Hered.* **2018**, 28 (1), 36-43. <https://doi.org/10.20453/reh.v28i1.3281>
- (66) Eguizábal, M.; Moromi, H. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. *Odontol. Sanmarquina* **2014**, 10 (2), 18-20. <https://doi.org/10.15381/os.v10i2.3028>
- (67) Londoño, A.; Pinieres, J.; García, C.; Carrillo, L.; Quintero, M.; García, S.; Mendoza, M.; Cruz, T. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. *Tecnol. en Marcha.* [Online]. **2008**, 21 (1), 49-55. [https://www.researchgate.net/publication/267271152\\_Estudio\\_de\\_la\\_actividad\\_antifungica\\_de\\_un\\_extracto\\_de\\_propoleo\\_de\\_la\\_abeja\\_Apis\\_mellifera\\_proveniente\\_del\\_estado\\_de\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/267271152_Estudio_de_la_actividad_antifungica_de_un_extracto_de_propoleo_de_la_abeja_Apis_mellifera_proveniente_del_estado_de_Mexico)
- (68) Shehu, A.; Adzim, M.; Rohin, K.; Aziz, A. A.; Ismail, S. Antifungal, characteristic properties and composition of bee glue (propolis). *J. Chem. Pharm. Res.* [Online]. **2015**, 7 (3), 1992-1996.

[https://www.researchgate.net/publication/274703620\\_Antifungal\\_characteristic\\_properties\\_and\\_composition\\_of\\_bee\\_glue\\_Propolis](https://www.researchgate.net/publication/274703620_Antifungal_characteristic_properties_and_composition_of_bee_glue_Propolis)

- (69) Santana, L. C.; Carneiro, S. M.; Caland, L. B.; Arcanjo, D. D.; Moita, J. M.; Citó, A. M.; Carvalho, F. A. Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Nat. Prod. Res.* **2014**, 28 (5), 340-343. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.856904>
- (70) Cuesta, O.; Campo, M.; Márquez, I.; Jaramillo, C. G.; González, V. H.; Montes, R.; Marrero, D.; Monzote, L.; Piccinelli, A. L.; Campone, L.; et al. Chemical profile and anti-leishmanial activity of three ecuadorian propolis samples from Quito, Guayaquil and Cotacachi Regions. *Fitoterapia.* **2017**, 120, 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.06.016>
- (71) Monzote, L.; Sariago, I.; García, M.; Cuesta, O.; Márquez, I.; Campo, M.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. Activity of cuban propolis extracts on *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. *Nat. Prod. Commun.* [Online]. **2011**, 6 (7), 973-976. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21834236/>
- (72) Mayta, F.; Sacsquispe, S.; Ceccarelli, J.; Alania, J. Propóleo peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en estomatología. *Rev. Estomatológica Hered.* **2014**, 22 (1), 50-58. <https://doi.org/10.20453/reh.v22i1.159>
- (73) Silva, R.; Baltazar, F.; Almeida, C. Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-based Compl. Alt. Med.* **2015**, 2015, 1-29. <https://doi.org/10.1155/2015/206439>
- (74) Oršolić, N. A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *J. ApiProd. ApiMed. Sci.* **2010**, 2 (1), 1-20. <https://doi.org/10.3896/ibra.4.02.1.01>
- (75) Salim, E. I.; Abd, A. D.; Farara, K. M.; Maria, D. S. Antitumoral and antioxidant potential of egyptian propolis against the PC3 prostate cancer cell line. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2015**, 16 (17), 7641-7651. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.17.7641>
- (76) Ang, E. S.; Pavlos, N. J.; Chai, L. Y.; Qi, M.; Cheng, T. S.; Steer, J. H.; Joyce, D. A.; Zheng, M. H.; Xu, J. Caffeic acid phenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the

- suppression of RANKL-Induced NF-KB and NFAT activity. *J. Cell. Physiol.* **2009**, 221 (3), 642-649. <https://doi.org/10.1002/jcp.21898>
- (77) Chen, M. J.; Chang, W. H.; Lin, C. C.; Liu, C. Y.; Wang, T. E.; Chu, C. H.; Shih, S. C.; Chen, Y. J. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreat.* **2008**, 8 (6), 566-576. <https://doi.org/10.1159/000159843>
- (78) Xiang, D.; Wang, D.; He, Y.; Xie, J.; Zhong, Z.; Li, Z.; Xie, J. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the  $\beta$ -catenin/t-cell factor signaling. *Antic. Drugs.* **2006**, 17 (7), 753-762. <https://doi.org/10.1097/01.cad.0000224441.01082.bb>
- (79) Jin, U. H.; Song, K. H.; Motomura, M.; Suzuki, I.; Gu, Y. H.; Kang, Y. J.; Moon, T. C.; Kim, C. H. Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 Cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2008**, 310 (1-2), 43-48. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9663-7>
- (80) Watabe, M.; Hishikawa, K.; Takayanagi, A.; Shimizu, N.; Nakaki, T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF $\kappa$ B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (7), 6017-6026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306040200>
- (81) Marcucci, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidolog.* **1995**, 26 (2), 83-99. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>
- (82) Ronaldi, G. C.; Palludo, A. G.; Pensin, N. R.; Hahn, C. F.; Boleta, D. D. Avaliação do efeito de pomada de própolis para tratamento de herpes labial recorrente – um estudo piloto. *Arq. Ciências da Saúde da UNIPAR.* **2017**, 21 (1), 13-18. <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v21i1.2017.6071>
- (83) Vras, N.; En, A.; Fpcl, P.; Vr, S. Propolis gel versus benzydamine in preventing oral mucositis for patients irradiated in head and neck: A preliminary study. *Canc. Rep. Rev.* **2017**, 1 (2), 1-4. <https://doi.org/10.15761/crr.1000112>
- (84) Fedotova, V. V.; Konovalov, D. A. Propolis research in Russia. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* [Online]. **2019**, 53 (4), S500-S509.

[https://www.researchgate.net/publication/337192000\\_Propolis\\_Research\\_in\\_Russia](https://www.researchgate.net/publication/337192000_Propolis_Research_in_Russia)

- (85) Sanpa, S.; Popova, M.; Tunkasiri, T.; Eitssayeam, S.; Bankova, V.; Chantawannakul, P. Chemical profiles and antimicrobial activities of thai propolis collected from *Apis mellifera*. *Chiang Mai J. Sci.* [Online]. **2017**, 44 (2), 438-448. [https://www.researchgate.net/publication/316986286\\_Chemical\\_profiles\\_and\\_antimicrobial\\_activities\\_of\\_Thai\\_propolis\\_collected\\_from\\_Apis\\_mellifera](https://www.researchgate.net/publication/316986286_Chemical_profiles_and_antimicrobial_activities_of_Thai_propolis_collected_from_Apis_mellifera)
- (86) Campo, M.; Asencio, C. G.; Bastidas, E. V.; Susal, K. M.; Matute, N. L.; Carrión, J. V.; Cuesta, O.; Jaramillo, C. G.; Márquez, I. Design of an infusion of *Moringa oleifera* L. (Moringa) leaves and *Theobroma cacao* L. (Cocoa) husk. *Rev. Cuba. Plantas Med.* [Online]. **2019**, 24 (1).  
<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/803/357>
- (87) Campo, M.; Cunalata, G. Infusiones de Moringa Oleifera (Moringa) Combinada Con *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) y *Lippia alba* (Mastranto). *Unemi.* [Online]. **2020**, 13 (34), 114-126.  
<http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/1112>
- (88) Benzie, I. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, 239 (1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- (89) Barrón, R. M.; Del Rosario, M.; Soto, M. R.; Colinas, T.; Kite, G. Flavonoides y actividad antioxidante de Calia secundiflora (Ort.) *Yakovlev*. *Rev. Fitotec. Mex.* [Online]. **2011**, 34 (3), 151-157.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802011000300005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802011000300005)
- (90) Pietta, P. G.; Gardana, C.; Pietta, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia.* **2002**, 73 (1), S7-S20. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00186-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00186-7)
- (91) Park, Y. K.; Ikegaki, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62 (11), 2230-2232. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.2230>

- (92) Campo, M. Estudio Químico de Propóleos Rojos Cubanos. Tesis en opción al Título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. [Online], Universidad de la Habana, La Habana, Cuba, **2007**. [http://tesis.sld.cu/FileStorage/000313-6564-Campo\\_Fernandez.pdf](http://tesis.sld.cu/FileStorage/000313-6564-Campo_Fernandez.pdf)
- (93) Márquez, I. Análisis cromatográficos y espectroscópicos de propóleos cubanos. Tesis en opción al Título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, **2008**.
- (94) Cuesta, O. Estudio Químico de Propóleos Cubanos. Tesis en opción al Título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, **2001**.
- (95) Jug, M.; Končić, M. Z.; Kosalec, I. Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, 57 (2), 530-537.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.006>
- (96) Farnsworth, N. R. Biological and phytochemical screening of plants. *J. of Pharmac. Scienc.* **1966**, 55 (3), 225-276. <https://doi.org/10.1002/jps.2600550302>
- (97) Cuesta, O.; Márquez, I.; Campo, F. Introducción a La Caracterización Estructural de Flavonoides, 1ra ed. [Online]; Machala: Universidad Técnica de Machala, Ecuador, **2015**. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6845>
- (98) Waksmundzka, M.; Sherma, J.; Kowalska, T. Thin layer chromatography in phytochemistry, 1ra ed. [Online]; Boca Ratón: CRC Press, **2008**.  
<https://doi.org/10.1201/9781420046786>
- (99) Jasprica, I.; Bojic, M.; Mornar, A.; Besic, E.; Bucan, K.; Medic, M. Evaluation of antioxidative activity of croatian propolis samples using DPPH. and ABTS. + stable free radical assays. *Molecules.* **2007**, 12 (5), 1006-1021.  
<https://doi.org/10.3390/12051006>
- (100) Bertrams, J.; Müller, M. B.; Kunz, N.; Kammerer, D. R.; Stintzing, F. C. Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of german propolis samples based on TLC and TLC-MS. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2013**. 86 (2013). <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.020>

- (101) Steinmann, D.; Ganzera, M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *J. Pharmac. Biom. Anal.* **2011**, 55 (4), 744-757. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.015>
- (102) Alfahdawi, I. Propolis in Medicine & Dentistry. LAMBERT Acad. Pub. [Online]. **2017**. [https://www.researchgate.net/publication/316999147\\_Propolis\\_In\\_Medicine\\_Dentistry](https://www.researchgate.net/publication/316999147_Propolis_In_Medicine_Dentistry)
- (103) Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. The systematic identification of flavonoids; **1970**. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0>
- (104) Ambardekar, R.; Gilda, S.; Mahadik, K.; Harsulkar, A.; Paradkar, A. Free radical scavenging and anti-inflammatory activity of indian propolis. *Pharmacol.* [Online]. **2009**, 3, 991-1002. [https://www.researchgate.net/publication/234880580\\_Free\\_Radical\\_Scavenging\\_and\\_Anti-inflammatory\\_Activity\\_of\\_Indian\\_Propolis](https://www.researchgate.net/publication/234880580_Free_Radical_Scavenging_and_Anti-inflammatory_Activity_of_Indian_Propolis)
- (105) Bridi, R.; Montenegro, G.; Nuñez, G.; Giordano, A.; Morán, M.; Jara, I.; Speisky, H.; Atala, E.; López, C. International regulations of propolis quality: Required assays do not necessarily reflect their polyphenolic-related in vitro activities. *J. Food Sci.* **2015**, 80 (6), C1188-C1195. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12881>
- (106) Mirković, S.; Rajković, K.; Jeremić, S.; Gavrilović, M.; Tomić, L.; Arsenijević, V. A.; Krstić, B. Kinetic profile of the antioxidant activity of propolis extract: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical bleaching assay. *J. Apic. Sci.* **2018**, 62 (1), 39-46. <https://doi.org/10.2478/JAS-2018-0004>
- (107) Bonvehí, J. S.; Coll, F. V. Phenolic composition of propolis from China and from South America. *Zeitschrift für Naturforsch.* **2018**, 49 (11-12), 712-718. <https://doi.org/10.1515/znc-1994-11-1204>
- (108) Lagouri, V.; Prasianaki, D.; Krysta, F. Antioxidant properties and phenolic composition of greek propolis extracts. *Int. J. Food Prop.* **2014**, 17 (3), 511-522. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.654561>
- (109) Potkonjak, N. I.; Veselinović, D. S.; Novaković, M. M.; Gorjanović, S. Ž.; Pezo, L. L.; Sužnjević, D. Ž. Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: A

- polarographic approach. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, 50 (10), 3614-3618.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.029>
- (110) Cottica, S. M.; Sabik, H.; Antoine, C.; Fortin, J.; Graveline, N.; Visentainer, J. V.; Britten, M. Characterization of canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *LWT - Food Sci. Technol.* **2015**, 60 (1), 609-614.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.045>
- (111) Trusheva, B.; Trunkova, D.; Bankova, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis; A preliminary study. *Chem. Cent. J.* **2007**, 1 (13), 1-4. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-1-13>
- (112) Gardana, C.; Scaglianti, M.; Pietta, P.; Simonetti, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 45 (3), 390-399.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.022>
- (113) Sawaya, A. C.; Barbosa, I.; Marcucci, M. C. Analytical methods applied to diverse types of brazilian propolis. *Chem. Cent. J.* **2011**, 5 (27), 1-10.  
<https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-27>
- (114) Castañeda, B.; Ramos, E.; Ibáñez, L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horiz. Med.* [Online]. **2008**, 8 (1), 56-72.  
<http://www.horizontemedico.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/196>
- (115) Morales, G.; Sierra, P.; Paredes, A.; Loyola, L. A.; Borquez, J. Constituents of *Helenium atacamense* Cabr. *J. Chil. Chem. Soc.* **2006**, 51 (1), 769-772.  
<https://doi.org/10.4067/s0717-97072006000100002>
- (116) Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results. *Food Chem.* **2012**, 130 (4), 1036-1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
- (117) Wong, S. P.; Leong, L. P.; Koh, J. H. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.* **2006**, 99 (4), 775-783.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.058>

- (118) Brand, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Scienc. Tech.* **1995**, 28 (1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- (119) Cabral, I. S.; Oldoni, T. L.; de Alencar, S. M.; Rosalen, P. L.; Ikegaki, M. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian J. Pharm. Sci.* **2012**, 48 (3), 557-564. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502012000300023>
- (120) Asami, D. K.; Hong, Y. J.; Barrett, D. M.; Mitchell, A. E. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (5), 1237-1241. <https://doi.org/10.1021/jf020635c>
- (121) Odabasoglu, F.; Aslan, A.; Cakir, A.; Suleyman, H.; Karagoz, Y.; Bayir, Y.; Halici, M. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia.* **2005**, 76 (2), 216-219. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.05.012>
- (122) Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu REAGENT. *Methods Enzymol.* **1999**, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- (123) Vit, P.; Huq, F.; Barth, O.; Campo, M.; Pérez, E.; Tomás, F.; Santos, E. Use of propolis in cancer research. *Br. J. Med. Med. Res.* **2015**, 8 (2), 88-109. <https://doi.org/10.9734/bjmmr/2015/16216>
- (124) Blonska, M.; Bronikowska, J.; Pietsz, G.; Czuba, Z. P.; Scheller, S.; Krol, W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and Its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 91 (1), 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.011>
- (125) Hoşnuter, M.; Gürel, A.; Babuççu, O.; Armutcu, F.; Kargi, E.; Işıkdemir, A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns.* **2004**, 30 (2), 121-125. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2003.09.022>

- (126) Wei, X.; Ma, Z.; Fontanilla, C. V.; Zhao, L.; Xu, Z. C.; Tagliabracci, V.; Johnstone, B. H.; Dodel, R. C.; Farlow, M. R.; Du, Y. Caffeic acid phenethyl ester prevents cerebellar granule neurons (CGNs) against glutamate-induced neurotoxicity. *Neurosc.* **2008**, *155* (4), 1098-1105.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.056>
- (127) Da Cunha, F. M.; Duma, D.; Assreuy, J.; Buzzi, F. C.; Niero, R.; Campos, M.; Calixto, J. B. Caffeic acid derivatives: In vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radic. Res.* **2004**, *38* (11), 1241-1253.  
<https://doi.org/10.1080/10715760400016139>
- (128) Al Naggar, Y.; Sun, J.; Robertson, A.; Giesy, J. P.; Wiseman, S. Chemical characterization and antioxidant properties of canadian propolis. *J. Apic. Res.* **2016**, *55* (4), 305-314. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1233700>
- (129) Pereira, D. S.; Abrantes, M. R.; Coelho, W. A.; Freitas, M. O.; Freitas, C. I.; Silva, J. B. Potencial antibiótico da própolis apícola potiguar em bactérias de importância veterinária. *Rev. Verde Agroecol. e Desenvolv. Sustentável.* **2016**, *11* (3), 151-158. <https://doi.org/10.18378/rvads.v11i3.4377>
- (130) Valenzuela, G.; Castro, C.; Figueroa, C.; Barriga, A.; Silva, X.; De Las Heras, B.; Hortelano, S.; Delporte, C. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *168*, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.050>
- (131) Ahangari, Z.; Naseri, M.; Vatandoost, F. Propolis: Chemical composition and its applications in endodontics. *Iran. Endod. J.* **2018**, *13* (3), 285-292.  
<https://doi.org/10.22037/iej.v13i3.20994>
- (132) Elnakady, Y. A.; Rushdi, A. I.; Franke, R.; Abutaha, N.; Ebaid, H.; Baabbad, M.; Omar, M. O.; Ghamdi, A. A. Characteristics, chemical compositions and biological activities of propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia. *Sci. Rep.* **2017.**, 1-13.  
<https://doi.org/10.1038/srep41453>
- (133) Ferreira, J. M.; Fernandes, C. C.; Salatino, A.; Negri, G.; Message, D. New propolis type from North-East Brazil: Chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. *J. Sci. Food Agric.* [Online]. **2017**, *97* (11), 3552-3558.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28078783/>

- (134) Huang, S.; Zhang, C. P.; Wang, K.; Li, G. Q.; Hu, F. L. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Mole.* **2014**, 19 (12), 19610-19632. <https://doi.org/10.3390/molecules191219610>
- (135) Machado, C. S.; Mokochinski, J. B.; Lira, T. O.; De Oliveira, F. D.; Cardoso, M. V.; Ferreira, R. G.; Sawaya, A. C.; Ferreira, A. G.; Pessoa, C.; Cuesta, O.; et al. Comparative study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown, and red brazilian propolis. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2016**, 2016, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2016/6057650>
- (136) Márquez, I.; Campo, M.; Cuesta, O.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. Polyprenylated benzophenone derivatives from cuban propolis. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68 (6), 931-934. <https://doi.org/10.1021/np0495884>
- (137) Lotti, C.; Fernandez, M. C.; Piccinelli, A. L.; Cuesta, O.; Márquez, I.; Rastrelli, L. Chemical constituents of red mexican propolis. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58 (4), 2209-2213. <https://doi.org/10.1021/jf100070w>
- (138) Piccinelli, A. L.; Campo, M.; Cuesta, O.; Márquez, I.; De Simone, F.; Rastrelli, L. Isoflavonoids isolated from cuban propolis. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (23), 9010-9016. <https://doi.org/10.1021/jf0518756>
- (139) Márquez, I.; Cuesta, O.; Campo, M.; Rosado, A.; Montes, R.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. Studies on the constituents of yellow cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58 (8), 4725-4730. <https://doi.org/10.1021/jf904527n>
- (140) Trusheva, B.; Stancheva, K.; Gajbhiye, N.; Dimitrova, R.; Popova, M.; Saraf, R.; Bankova, V. Two new prenylated stilbenes with an irregular sesquiterpenyl side chain from propolis from Fiji Islands. *Rec. Nat. Prod.* [Online]. **2016** 10 (4), 465-471. [https://www.researchgate.net/publication/303372913\\_Two\\_New\\_Prenylated\\_Stilbenes\\_with\\_an\\_Irregular\\_Sesquiterpenyl\\_Side\\_Chain\\_from\\_Propolis\\_from\\_Fiji\\_Islands](https://www.researchgate.net/publication/303372913_Two_New_Prenylated_Stilbenes_with_an_Irregular_Sesquiterpenyl_Side_Chain_from_Propolis_from_Fiji_Islands)
- (141) Cuesta, O.; Frontana, B.; Ramirez, T.; Cardenas, J. Polyisoprenylated benzophenones in cuban propolis; biological activity of nemorosone. *zeitschrift fur naturforsch. Sect. C J. Biosci.* **2002**, 57 (3-4), 372-378. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-3-429>