



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA  
MUESTRA DE PROPÓLEOS ECUATORIANO EP12**

**MERCHAN ORTEGA KLEBER FABRICIO  
BIOQUIMICO FARMACEUTICO**

**VALLE QUINDE VIVIANA ANDREA  
BIOQUIMICA FARMACEUTICA**

**MACHALA  
2023**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA DE PROPÓLEOS  
ECUATORIANO EP12**

**MERCHAN ORTEGA KLEBER FABRICIO  
BIOQUIMICO FARMACEUTICO**

**VALLE QUINDE VIVIANA ANDREA  
BIOQUIMICA FARMACEUTICA**

**MACHALA  
2023**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**TRABAJOS EXPERIMENTALES**

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA DE PROPÓLEOS  
ECUATORIANO EP12**

**MERCHAN ORTEGA KLEBER FABRICIO  
BIOQUIMICO FARMACEUTICO**

**VALLE QUINDE VIVIANA ANDREA  
BIOQUIMICA FARMACEUTICA**

**CUESTA RUBIO OSMANY**

**MACHALA  
2023**

# CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA DE PROPÓLEOS ECUATORIANO EP12

*por Viviana Andrea Valle Quinde*

---

**Fecha de entrega:** 21-sep-2023 10:16p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2173260220

**Nombre del archivo:** ANTIOXIDANTE\_DE\_LA\_MUESTRA\_DE\_PROP\_LEOS\_ECUATORIANO\_EP12\_1.docx  
(3.02M)

**Total de palabras:** 11413

**Total de caracteres:** 61590

# CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA DE PROPÓLEOS ECUATORIANO EP12

## INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://es.scribd.com">es.scribd.com</a> Fuente de Internet	1%
2	<a href="https://idoc.pub">idoc.pub</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	<1%
4	<a href="https://revistas.unal.edu.co">revistas.unal.edu.co</a> Fuente de Internet	<1%
5	<a href="https://qdoc.tips">qdoc.tips</a> Fuente de Internet	<1%
6	Gloria Holguín Martínez. "Memorias del XI Congreso Colombiano de Fitoquímica", Vitae, 2011 Publicación	<1%
7	<a href="https://fr.slideshare.net">fr.slideshare.net</a> Fuente de Internet	<1%
8	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	<1%



Excluir citas      Activo

Excluir coincidencias      < 20 words

Excluir bibliografía      Activo

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

Los que suscriben, MERCHAN ORTEGA KLEBER FABRICIO y VALLE QUINDE VIVIANA ANDREA, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA DE PROPÓLEOS ECUATORIANO EP12, 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.

Los autores 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.

Los autores 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.



MERCHAN ORTEGA KLEBER FABRICIO

0706989332



VALLE QUINDE VIVIANA ANDREA

0704415447

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de titulación va dedicado a cada una de las personas que han hecho parte de mi formación académica y crecimiento personal. En especial a mi familia, quienes me han apoyado incondicionalmente para poder cumplir con esta meta de ser un profesional bioquímico farmacéutico.

Kleber Merchán

Dedico con todo mi corazón este trabajo a mi madre Toty, mi hija Noraly, tío Felipe, abuelita Gloria y mi compañero Lenin por creer en mi capacidad pues sin ellos no lo habría logrado. Su afecto y cariño han hecho de mí, una profesional con carácter capaz de afrontar cualquier obstáculo. Gracias a todos.

Viviana Valle

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a mi madre Astrid Ortega, ya que ella me ha dado las fuerzas para seguir adelante y lograr llegar hasta donde estoy. También a mis hermanos Vicente, Cinthia y Johan Merchán quienes siempre me han dado su apoyo.

Extiendo un agradecimiento especial a mi docente tutor del presente trabajo de titulación el Dr. Osmany Cuesta por su predisposición y paciencia en ayudarnos a concluir con éxito nuestra formación académica. De igual manera a La Dra. Mercedes Campo y la Dra. Ingrid Márquez por su ayuda y recomendaciones respecto a nuestra tesis de grado.

Por último, quiero agradecer mis amigos Gabriela Aguilar, Andrés Flores, Diego Pesantez y Viviana Valle por apoyarme y estar conmigo durante estos años de vida universitaria.

Kleber Merchán

Agradezco a Dios por haberme otorgado una familia extraordinaria, quienes han confiado en mí a lo largo de mi formación profesional, a su sacrificio y amor. A todos ellos por haber incitado en mí, el crecer, superar y triunfar en la vida.

Agradezco también a mi tutor Dr. Osmany Cuesta Rubio por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y su amplio conocimiento científico, así como también por la paciencia brindada durante todo el desarrollo de este trabajo. De la misma forma a las Dra. Ingrid Márquez Hernández y Dra. Mercedes Campo Fernández por el constante apoyo y tiempo brindado durante esta grata experiencia.

Y por último a mi amigo y compañero Kleber Merchán, por las tardes y horas de trabajo invertidos y por habernos complementado con nuestras debilidades y fortalezas y lograr un apoyo mutuo.

Viviana Valle

## RESUMEN

El propóleo es un producto resinoso elaborado por las abejas, principalmente *Apis mellifera*, a partir de exudados o partes de diferentes plantas que se encuentran cercanas a la colmena. De forma general, el propóleo está compuesto químicamente por: ácidos orgánicos, flavonoides, fenoles, terpenoides, enzimas, minerales y vitaminas; responsables de sus propiedades protectoras, conservantes y terapéuticas. El objetivo del presente trabajo experimental fue identificar los componentes químicos mayoritarios y la capacidad antioxidante de la muestra de propóleo ecuatoriano EP12. Para lo cual, en primera instancia, el extracto fue fraccionado a través de una columna de Sephadex LH-20 empleando metanol como fase móvil. Las 11 fracciones obtenidas fueron analizadas por CCD y por CLAE/EM y se seleccionó la fracción 1/4 para continuar con el proceso de purificación.

La fracción 1/4 (0,4 g) fue sometida a cromatografía en columna de fase normal con Sílica gel como fase estacionaria, mientras que las fases móviles se prepararon empleando como disolventes: hexano, cloroformo y metanol, incrementando la polaridad paulatinamente. Las fracciones obtenidas se reunieron según los resultados observados en CCD y CLAE/EM en 9 fracciones (3/1-3/9).

La fracción 3/8 mostró menor complejidad, con posibilidad de aislar al menos un componente mayoritario. Para ello, se sometió la muestra a una cromatografía en columna en fase reversa, usando Sílica gel RP18 como fase estacionaria, y agua y metanol como fase móvil, disminuyendo la polaridad paulatinamente. De aquello se obtuvieron 66 fracciones, las cuales fueron analizadas por CCD y CLAE/EM, siendo la fracción 4/18 la seleccionada para su análisis por RMN, con el fin de caracterizar el pico más intenso. Las señales más intensas en RMN sugirieron un compuesto con una cadena alifática larga y un residuo aromático que mostró similitud con los compuestos típicos de propóleos. La muestra EP12 mostró actividad antioxidante y se apreciaron diferencias en el potencial de algunas fracciones.

En conclusión, la aplicación de métodos cromatográficos permitió el fraccionamiento de la muestra de propóleos EP12, la cual exhibe una composición química diferente respecto a los principales tipos de propóleos conocidos y contiene un compuesto caracterizado por una cadena alifática larga y un residuo aromático. Además, se comparó la capacidad antioxidante equivalente a Trolox, donde el extracto total y sus fracciones secuestran el radical DPPH, pero se observan diferencias entre ellas.

**Palabras clave:** Propóleos ecuatorianos – Cromatografía – CLAE/EM – Capacidad antioxidante

## ABSTRACT

Propolis is a resinous product made by bees, mainly *Apis mellifera*, from exudates or parts of different plants that are close to the hive. In general, propolis is chemically composed of: organic acids, flavonoids, phenols, terpenoids, enzymes, minerals and vitamins; responsible for its protective, preservative and therapeutic properties.

The objective of this experimental work was to identify the major chemical components and the antioxidant capacity of the Ecuadorian propolis sample EP12. For which, in the first instance, the extract was fractionated through a Sephadex LH-20 column using methanol as the mobile phase. The 11 fractions obtained were analyzed by TLC and by HPLC/MS and fraction 1/4 was selected to continue with the purification process.

Fraction 1/4 (0.4 g) was subjected to normal phase column chromatography with Silica gel as stationary phase, while the mobile phases were prepared using hexane, chloroform and methanol as solvents, gradually increasing the polarity. The fractions obtained were combined according to the results observed in TLC and HPLC/MS into 9 fractions (3/1-3/9).

Fraction 3/8 showed less complexity, with the possibility of isolating at least one major component. To do this, the sample was subjected to reverse phase column chromatography, using Silica gel RP18 as the stationary phase, and water and methanol as the mobile phase, gradually decreasing the polarity. From this, 66 fractions were obtained, which were analyzed by CCD and HPLC/MS, with fraction 4/18 being selected for analysis by NMR in order to characterize the most intense peak. The most intense signals in NMR suggested a compound with a long aliphatic chain and an aromatic residue that showed similarity to typical propolis compounds. Sample EP12 showed antioxidant activity and differences were seen in the potential of some fractions.

In conclusion, the application of chromatographic methods allowed the fractionation of the propolis sample EP12, which exhibits a different chemical composition with respect to the main types of known propolis and contains a compound characterized by a long aliphatic chain and an aromatic residue. In addition, the equivalent antioxidant capacity was compared to Trolox, where the total extract and its fractions sequester the DPPH radical, but differences are observed between them.

**Keywords:** Ecuadorian propolis – Chromatography – HPLC/MS- Characterization – Antioxidant capacity

## ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN-----	1
1. MARCO TEÓRICO-----	4
1.1 Generalidades-----	4
1.2 Antecedentes-----	4
1.3 Métodos de colecta-----	5
1.3.1 Raspado de la colmena-----	5
1.3.2 Rejillas o mallas plásticas-----	5
1.3.3 Colector de propóleos inteligente (CPI)-----	6
1.4 Métodos de extracción-----	6
1.4.1 Procedimiento de extracción general-----	6
1.4.2 Extracción de compuestos volátiles-----	7
1.5 Métodos de análisis utilizados en el estudio de propóleos-----	7
1.5.1 Cromatografía en capa delgada (CCD)-----	7
1.5.2 Cromatografía en columna convencional (CC)-----	8
1.5.4 Cromatografía de gases (CG)-----	9
1.5.5 Espectroscopía UV-VIS-----	10
1.5.6 Resonancia magnética nuclear (RMN)-----	10
1.5.7Potencial antioxidante basado en el secuestro de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)-----	11
1.6 Composición química-----	11
1.7 Actividad biológica-----	13
1.7.1 Actividad antioxidante-----	13
1.7.2 Actividad antimicrobiana-----	13
1.7.1 Actividad antiinflamatoria-----	14
1.7.2 Actividad antitumoral-----	15
1.7.3 Otras actividades biológicas-----	15
2. METODOLOGÍA-----	17
2.1 Tipo de estudio-----	17

2.2 Variables-----	17
2.2.1 Variables dependientes-----	17
2.2.2 Variable independiente-----	17
2.3 Extracto seco de propóleos-----	17
2.4 Métodos de análisis del propóleos-----	17
2.4.1 Métodos de separación-----	17
2.4.2 Métodos de caracterización química-----	18
2.5 Análisis de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox por el método DPPH-	19
2.6 Análisis estadístico-----	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	21
3.1 Métodos de separación-----	21
3.2 Caracterización mediante resonancia magnética nuclear (RMN)-----	30
3.3 Identificación de flavonoides-----	32
3.4 Capacidad antioxidante equivalente a Trolox por el método DPPH-----	34
4. CONCLUSIONES-----	37
5. RECOMENDACIONES-----	38
REFERENCIAS-----	39

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Proporción y frecuencia de las fases móviles utilizadas.-----	23
Tabla 2. Información deducida a partir de los cromatogramas de masas de las fracciones obtenidas de la columna de Sílica gel, correspondiente con los picos cromatográficos más intensos.-----	26
Tabla 3. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox.. -----	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. CCD de las fracciones de la primera Sephadex. FM: CHCl <sub>3</sub> / MeOH (9:1), y FE: Sílica gel G60F <sub>254</sub> . P = Precitado de la fracción 1/8.....	21
Figura 2. CCD FM: CHCl <sub>3</sub> – C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> y FE: placa de Sílica gel G60F <sub>254</sub> y cromatograma de masas de la corriente iónica total de la fracción 1/4. ....	22
Figura 3. CCD de las fracciones 3/2-3/7, FM: C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> / CHCl <sub>3</sub> (6:4) y FE: Sílica gel G60F <sub>254</sub> . ....	24
Figura 4. CCD en Fase reversa de las fracciones 3/2 – 3/10, FM: CH <sub>3</sub> OH / H <sub>2</sub> O (8:2) y FE: Sílica gel RP18 .....	25
Figura 5. Cromatograma de masas de la corriente iónica total de la fracción 3/8. ....	27
Figura 6. CCD fracciones 4/14-4/19. FM: CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH (9:1) y FE: Sílica gel. ....	27
Figura 7. Cromatogramas de la fracción 4/18.....	29
Figura 8. Espectro de RMN ( <sup>1</sup> H) de la fracción 4/18. ....	30
Figura 9. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la fracción 4/18. ....	31
Figura 10. Cromatogramas de la fracción EP12 1/8 .....	32
Figura 11. Estructura química de la Genkwanina y Acacetina .....	34
Figura 12. Curva de calibración.....	34

## INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto resinoso elaborado por las abejas, principalmente *Apis mellifera*, a partir de exudados o partes de diferentes plantas que se encuentran cercanas a la colmena (Rodríguez et al., 2020), que presenta varios constituyentes con propiedades terapéuticas (Martínez, 2020). El material vegetal se mezcla con cera y saliva, y es utilizado para sellar partes de la colmena que se encuentran vulnerables a la entrada de agentes externos. Además, constituye una barrera que provee protección ante el ataque de posibles intrusos (Delgado et al., 2018).

Actualmente, se han reconocido diferentes tipos de propóleos con numerosos componentes activos que dependen de la vegetación cercana a las colmenas. La composición química del propóleo varía apreciablemente ya que depende de su origen geográfico y botánico. Entre los componentes químicos más comunes se encuentran: flavonoides, terpenoides, ácidos fenólicos y sus ésteres (Muñoz et al., 2011).

Diferentes estudios demuestran que la composición química del propóleo y su actividad biológica se encuentran correlacionadas, entre las que destacan mayoritariamente: antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antifúngica, cicatrizante, entre otras. Sin embargo, estas varían en cuanto al origen botánico, la especie de abeja por la que es producido, la región y condición climática de donde es recolectado (de Oliveira et al., 2022). Se ha demostrado la existencia de diferencias significativas entre muestras recolectadas en un mismo país, pero provenientes de diferentes ecosistemas (Rodríguez et al., 2012).

En lo que respecta a propóleos ecuatorianos, estos ya han sido analizados anteriormente, en un estudio se realizó la caracterización química de 19 muestras de propóleos, donde se lograron identificar 68 compuestos, de los cuales 59 se identificaron por primera vez en propóleos ecuatorianos. De estos compuestos destacaron los flavonoides, diterpenos, triterpenos, derivados de ácidos orgánicos y alquilresorcinoles (Cuesta et al., 2022).

En otro estudio, se analizaron tres muestras de propóleos de diferentes regiones: Quito, Guayaquil y Cotacachi. La muestra de Cotacachi resultó ser rica en flavonoides, y las muestras de Quito y Guayaquil contenían, principalmente, alcoholes triterpénicos y acetyl triterpenos como constituyentes. Los tres extractos de propóleos demostraron capacidad para inhibir el crecimiento de *Leishmania amazonensis*, pero la muestra rica en flavonoides resultó ser la más activa (Cuesta et al., 2017).

En nuestro país ha crecido la demanda de fitofármacos basados en extractos naturales, como terapia complementaria a los medicamentos sintéticos. Sin embargo, aunque un medicamento sea de origen natural, esto no garantiza que cumpla con la acción terapéutica de interés. Es necesario hacer un estudio exhaustivo de los extractos y su composición química con el objetivo de corroborar si a través de la misma se puede llegar a cumplir esa acción terapéutica (Guaraca & Palomino, 2018).

Al aplicar métodos cromatográficos como la cromatografía líquida se pueden separar e identificar los componentes de la compleja mezcla que es el propóleo. Mientras que, aplicar técnicas espectroscópicas a las fracciones o productos aislados permite dilucidar la estructura de los componentes mayoritarios o de interés investigativo. De esta manera, se puede correlacionar la composición química de los extractos de propóleos con sus propiedades biológicas (Gallignani et al., 2008).

Ecuador posee una notable riqueza botánica, que influye de forma determinante en la composición química del propóleo. Resulta conveniente utilizar las mejores materias primas para garantizar, en la mayor medida posible, la eficacia y seguridad de los productos que consume la población. En ese sentido, el control de la composición química juega un rol fundamental (Verdugo & Tola, 2017)

Al tener en cuenta los señalamientos anteriores se proponen las siguientes consideraciones para el desarrollo de esta investigación:

### **Problema científico**

Necesidad de identificar la composición química y capacidad antioxidante de la muestra de propóleos ecuatoriano EP12.

### **Hipótesis**

La composición química y la capacidad antioxidante de la muestra de propóleos EP12 difiere respecto a muestras de propóleos ecuatorianos previamente estudiadas.

### **Objetivo general**

Identificar los componentes químicos mayoritarios y la capacidad antioxidante de la muestra de propóleos ecuatoriano EP12 mediante la aplicación de métodos cromatográficos y espectroscópicos para la determinación de sus características químicas y potencial antioxidante.

### **Objetivos específicos**

- Aplicar métodos cromatográficos al extracto seco de propóleos para el fraccionamiento de sus componentes.
- Caracterizar estructuralmente extractos, fracciones y productos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos
- Comparar el potencial antioxidante equivalente a Trolox del extracto seco de propóleos con sus fracciones mediante el ensayo del DPPH.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Generalidades

El propóleo es un producto resinoso elaborado por las abejas, principalmente *Apis mellifera*, a partir de exudados o partes de diferentes plantas que se encuentran cercanas a la colmena (Rodríguez et al., 2020). El material vegetal se mezcla con cera y saliva, y es utilizado para sellar partes de la colmena que se encuentran vulnerables a la entrada de agentes externos. Además, constituye una barrera que provee protección ante el ataque de posibles intrusos (Delgado et al., 2018).

La composición química del propóleo varía apreciablemente ya que depende de su origen geográfico. Entre los componentes químicos más comunes se encuentran: flavonoides, terpenoides, ácidos fenólicos y sus ésteres (Muñoz et al., 2011).

Este producto resinoso procedente de las abejas ya era conocido antiguamente. En Egipto lo utilizaban los sacerdotes en procedimientos para embalsamar, luego en Grecia que es de donde proviene su nombre “propóleo”: siendo *-pro-*, “delante de” y *-polis-* que significa “ciudad”, lo que se llegó a traducir como defensor de la ciudad. En el pasado, el propóleo era considerado como un remedio que mitigaba infecciones de tipo cutáneas como llagas en la piel (Grosso et al., 2004).

### 1.2 Antecedentes

Debido a una gran cantidad de investigaciones realizadas a lo largo de las últimas décadas, se conoce que el propóleo contiene compuestos con actividad biológica. Estos compuestos de origen vegetal son utilizados por las plantas con diferentes fines y las abejas los emplean para su beneficio. Por lo antes mencionado, ha crecido el interés en el estudio de los propóleos para demostrar su uso terapéutico y cosmético. Por tal motivo, se requieren procesos estandarizados que permitan identificar y cuantificar compuestos bioactivos (Bankova et al., 2018).

El trabajo con productos naturales ha mostrado un cambio de paradigma en los últimos años. Los metabolitos especializados presentes en la materia vegetal eran analizados bajo técnicas específicas con fines particulares hasta inicios del siglo XXI, entre estos procesos destaca la cuantificación de compuestos bioactivos en el material de interés. Sin embargo, en los últimos años se han estandarizados procesos que involucran métodos más efectivos con el uso de equipos automatizados, lo que permite la obtención de valores quimiométricos en mezclas complejas de extractos naturales, haciendo uso de huellas dactilares y perfiles metabólicos (Peña, 2008).

En un estudio anterior se realizó la caracterización química por CLAE-DAD-EM asistida por un análisis de CG-EM de 19 muestras de propóleos y se lograron identificar 68

compuestos, de los cuales 59 se identificaron por primera vez en propóleos ecuatorianos. Entre estos compuestos destacaron los flavonoides, diterpenos, triterpenos, derivados de ácidos orgánicos y alquilresorcinoles. La actividad antioxidante y la cuantificación de fenoles totales se determinó mediante el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y Folin-Ciocalteu, respectivamente (Cuesta et al., 2022).

En otro estudio, se consideraron tres muestras de propóleos de diferentes regiones: Quito, Guayaquil y Cotacachi. Se prepararon sus extractos metanólicos y se analizaron aplicando métodos cromatográficos y espectroscópicos que indicaron lo siguiente: la muestra de Cotacachi (CPS), resultó ser rica en flavonoides, y las muestras de Quito (QPS) y Guayaquil (GPS), contenían, principalmente, alcoholes triterpénicos y acetyl triterpenos como constituyentes. Los tres extractos de propóleos demostraron capacidad para inhibir el crecimiento de *Leishmania amazonensis*, pero la muestra rica en flavonoides resultó ser la más activa. Este estudio constituye la primera investigación sobre composición química de propóleos ecuatorianos (Cuesta et al., 2017).

### **1.3 Métodos de colecta**

**1.3.1 Raspado de la colmena** La ventaja de este método está en su fácil ejecución, bajos costos y optimización del tiempo para la recolección del propóleos. Se basa en raspar las paredes internas de la colmena haciendo uso de una espátula, obteniendo así el propóleos en pequeños trozos. Aunque es importante considerar que al hacer uso de este método no se puede conocer la edad exacta del propóleos, ya que en las paredes de la colmena pueden quedar remanentes de recolecciones anteriores, y esto podría alterar la composición química del mismo. Además, al momento de realizar el raspado, el propóleos trae consigo impurezas propias de la colmena por lo que requiere de un tratamiento posterior (Sotolongo, 2021).

**1.3.2 Rejillas o mallas plásticas** Las rejillas son láminas o mallas hechas de plástico que poseen aberturas para que las abejas depositen el propóleos, esto facilita retirar y recolectar el material de interés. La ventaja de este método es que el propóleos tiene una mejor calidad comparada con el método de raspado de la colmena.

La técnica se fundamenta en que las abejas cubren los espacios vacíos en la colmena por su instinto natural de mantener cubiertas las paredes internas y crear de esta manera un piso natural. Las láminas se ubican entre la tapa y la cabeza de los cuadros. Las abejas también cubren las ranuras u orificios con el fin de impedir el enfriamiento de la cría o nido (Aranguena, 2019).

*1.3.3 Colector de propóleos inteligente (CPI)* Es un dispositivo que tiene el tamaño de una colmena original y forma de cajón, que a diferencia de otros recolectores de propóleos no es de madera en sus paredes laterales, sino que presenta una serie de listones de ese mismo material con espacios para la entrada del propóleos. El propóleos se recoge haciendo uso de un punzón, y según se vaya llenando pasa la trampa antes mencionada.

El CPI podría reemplazar a la cámara de cría, sin embargo, en la experiencia se han evidenciado efectos adversos cuando las condiciones no son las adecuadas. Al ser un dispositivo automático se espera obtener grandes cantidades de propóleos, pero las cosechas generalmente son bajas y en ocasiones se llega a perder una colmena completa. Para que la recolección sea abundante se requiere contar con las abejas apropiadas, en zonas geográficas especiales donde se asegure que las abejas puedan producir propóleos (Castro, 2006).

#### **1.4 Métodos de extracción**

*1.4.1 Procedimiento de extracción general* Para extraer los compuestos químicos del propóleos se puede aplicar una extracción sólido - líquido, específicamente la maceración de la muestra. El disolvente, generalmente, es una mezcla hidroalcohólica, este se deja reposar junto con la muestra que debe estar pulverizada o en trozos para acelerar la velocidad de extracción. El tiempo de maceración va de 4 a 10 días, aunque esto varía según la muestra y la técnica.

El proceso de maceración se debe realizar en un envase cerrado para evitar la entrada de contaminantes, en una zona libre de humedad, a temperatura ambiente y agitando regularmente para lograr una mejor extracción. Una vez haya transcurrido el tiempo necesario se filtra el disolvente, esta parte es la que contiene los metabolitos de interés (Chilán & Consuegra, 2020).

Los disolventes más utilizados para la extracción de los metabolitos presentes en el propóleos son los alcoholes. La ventaja de este método es que se obtienen la mayoría de los compuestos solubles en disolventes de mediana y alta polaridad, además se obtiene un extracto bajo en cera y otras sustancias que no son de interés biológico (Guanche, 2022).

Al ser un extracto metanólico o etanólico impide su uso en especialidades como pediatría, oftalmología, otorrinolaringología y en pacientes con intolerancia al alcohol. Si el interés de estudio es la fracción lipídica del propóleos, se puede aplicar el método de Soxhlet, el cual se basa en la solubilidad de los lípidos en disolventes apolares como el hexano, cloroformo y éter de petróleo. De esta manera se pueden separar los

componentes apolares de aquellos de mediana y alta polaridad, siendo este un proceso de extracción sólido-líquido (Kubiliene et al., 2015).

**1.4.2 Extracción de compuestos volátiles** La extracción de los compuestos volátiles se puede realizar aplicando métodos como la hidrodestilación o la destilación por arrastre de vapor. En la actualidad también hay métodos automatizados y eficientes como la hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) o la extracción con fluidos supercríticos haciendo uso de dióxido de carbono como disolvente (León et al., 2015). Es importante destacar que los compuestos volátiles presentes en el propóleo son los que le brindan su olor característico y entre estos se encuentran los aceites esenciales, que también tienen importantes actividades biológicas. Al elegir un correcto método de extracción se garantiza que estos compuestos no se pierdan o se degraden (Carrasco & Cepeda, 2020).

## **1.5 Métodos de análisis utilizados en el estudio de propóleos**

**1.5.1 Cromatografía en capa delgada (CCD)** Está técnica cromatográfica consta de una fase móvil y una fase estacionaria. La fase móvil es la que permite el movimiento y recorrido de la sustancia a cierta distancia y velocidad, siendo este recorrido inversamente proporcional a su afinidad por la fase estacionaria. La fase estacionaria es la que logra la retención de los analitos de interés (Corzo, 2019).

La separación ocurre, primordialmente, por el fenómeno de la adsorción, de esa manera el compuesto que está en la fase líquida se une con el sólido adsorbente y se procede a fijar con la superficie del mismo a través de una fuerza física, pudiendo volver a su condición anterior. Al utilizar esta técnica se pueden comparar varias muestras, ya que los compuestos migran de distinta manera y se pueden diferenciar empleando reveladores físicos y químicos. Es un método de fácil realización, bajo costo y permite separaciones en un lapso de tiempo corto (Vallejo et al., 2021).

Las fases estacionarias más usadas son: alúmina, sílice y celulosa, y se seleccionan teniendo en cuenta el tipo de sustancia que se quiera separar. La fase móvil se compone de un disolvente puro o una mezcla de ellos, siendo el hexano, cloroformo, metanol o etanol los de mayor uso. El soporte de la fase estacionaria puede ser una placa de aluminio, vidrio o plástico. La selección de la fase móvil influye en la calidad de la separación y la velocidad del proceso (Corzo, 2019; Vallejo et al., 2021).

En un estudio realizado a 70 muestras de propóleos cubanos, entre ellas propóleos pardos (Tipo I), propóleos rojos (Tipo II) y propóleos amarillos (Tipo III) se realizó el análisis cualitativo mediante la técnica de Cromatografía en Capa Delgada (CCD). La fase estacionaria empleada fue Sílica gel G60F<sub>254</sub> y se desarrollaron corridas

ascendentes utilizando como fase móvil las mezclas: hexano-acetato de etilo (7:3) y hexano-acetato de etilo (9:1), logrando identificar y diferenciar los tres tipos de propóleos cubanos (Campo et al., 2008).

*1.5.2 Cromatografía en columna convencional (CC)* La cromatografía en columna es otra técnica que permite separar o purificar los componentes de una muestra. Se comprende de una fase móvil en estado líquido y una fase estacionaria generalmente sólida. Ambas se colocan en un tubo cilíndrico de vidrio en posición vertical, que incluye una llave que permite regular la salida de la fase móvil que se emplea.

El fundamento de esta técnica se basa en que, al descender la fase móvil por la fase estacionaria empieza la separación de los compuestos según su afinidad por alguna de las fases. Los compuestos originan bandas horizontales que se colectan como fracciones. En cromatografía de fase normal los componentes más polares son los que más se retienen, mientras que las menos polares son los primeros en eluir (Zamora, 2017).

*1.5.3 Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (CLAE/EM)* Es una de las técnicas cromatográficas de mayor uso en el análisis de productos naturales, debido a su eficiente capacidad para la separación de componentes de mezclas complejas. En esta técnica intervienen la fase móvil y la estacionaria, la primera se encuentra en estado líquido y pretende llevar a la muestra a través de la fase estacionaria, la cual puede ser sólida o una película líquida que es sostenida por un sólido inerte. Los analitos que tengan mayor afinidad por la fase estacionaria se trasladan a una velocidad menor y por tanto muestran mayores tiempos de retención (Suarez & Morales, 2018).

Las condiciones cromatográficas de CLAE comprenden, principalmente, el uso de detectores de arreglo de diodos (DAD UV-Vis) con datos espectrales para cada uno de los picos. Estos se visualizan en un rango de 200 a 900 nm, siendo 280 nm la longitud de onda donde suelen aparecer los compuestos fenólicos que existen en los propóleos debido a su absorbancia alrededor de ese valor (Bankova et al., 2019).

CLAE posee una elevada precisión en cuanto a sus resultados, también permite que los compuestos se separen y puedan ser recolectados. Acoplada a espectrometría de masas se convierte en una herramienta poderosa para la caracterización estructural y cuantificación de los analitos (de la Rosa et al., 2019).

El uso de la técnica CLAE/EM para lograr análisis de tipo cuantitativo y cualitativo de los componentes presentes en propóleos se ha ido incrementando en los últimos años. La separación por CLAE depende en gran parte de las distintas afinidades que hay entre los constituyentes de propóleos y la fase estacionaria. Por esto, en una aplicación se

deben tener en consideración las propiedades físicas de la columna con la que se llevará a cabo el procedimiento (p.ej. las dimensiones de la columna y el tamaño de partícula) y las propiedades químicas del relleno (Bankova et al., 2019).

CLAE/EM tiene diversas aplicaciones en el análisis de muestras que contienen compuestos orgánicos (Romero et al., 2016). En la industria farmacéutica permite la cuantificación de principios activos para el control de calidad y el desarrollo de nuevos fármacos (Samaniego et al., 2021). Dentro de la industria alimentaria se utiliza para la identificación y cuantificación de suplementos nutricionales presentes en ciertos alimentos, por ejemplo, la determinación de ácido fólico en frutas como el melón (Vega & Ramón, 2007). En lo que respecta a la fitoquímica, CLAE/EM resulta ser un método efectivo para el estudio de especies vegetales, a través de la separación, caracterización y cuantificación de sus componentes (Ringuelet & Viña, 2013).

*1.5.4 Cromatografía de gases (CG)* La cromatografía de gases es un método de alta resolución que permite el análisis de la fracción volátil de los propóleos, siempre y cuando los compuestos presentes en el mismo sean termorresistentes. En la mayoría de los casos va acoplada a un espectrómetro de masas que aporta información estructural. Los compuestos volátiles que conforman el propóleos se hayan en bajas concentraciones, por lo que se hace necesario un previo tratamiento de la muestra que incluye su preconcentración (De La Fuente, 2006; Melliou et al., 2007).

La cromatografía de gases se ha aplicado en la identificación de triterpenos en propóleos de Brasil, que incluyen a: lupenona, lupeol,  $\beta$ -amirina y  $\alpha$ -amirina. También se identificaron alcanos de triterpenos y un compuesto que no había sido encontrado en los propóleos hasta entonces, el 9,19-ciclolanosta-24-en-3-ol y su acetato (Bracho et al., 2009).

Antes de analizar los componentes no volátiles del propóleos se debe realizar una derivatización de los extractos, ya que contiene metabolitos que no son lo suficientemente volátiles para aplicar directamente en cromatografía de gases. El reactivo con mayor uso en cuanto a este tipo de método es la N,O-bis trimetilsilil trifluoroacetamida (BSTFA). Los derivados trimetilsililados obtenidos son menos polares y más volátiles que sus precursores, y se pueden analizar correctamente por CG (Bankova et al., 2018).

*1.5.5 Espectroscopía UV-VIS* La espectroscopía ultravioleta-visible es una técnica que se basa en la interacción de la luz UV-Vis con la materia. Generalmente, se mide la luz absorbida y la interacción se valora a través de la absorbancia o transmitancia, donde se emplea una referencia o blanco. Este método requiere el uso de la luz, la cual posee una energía que es inversamente proporcional a la longitud de onda. Por ello, se considera que longitudes de onda cortas transportan mayor energía mientras que las ondas largas son las que transportan menor energía (CSIC, 2014).

El espectrofotómetro es el instrumento que se emplea en la obtención de un espectro, se compone por una fuente de radiación UV y visible, por lo general se usan lámparas de wolframio, xenón y/o deuterio; un monocromador en el que intervienen un colimador y un prisma de dispersión que permiten seleccionar la longitud de onda que incide sobre la muestra. Para la detección se pueden utilizar uno o más detectores que son los encargados de medir la intensidad de la radiación que refleja la sustancia (Cubas et al., 2018).

*1.5.6 Resonancia magnética nuclear (RMN)* La resonancia magnética nuclear es otra técnica eficaz que se utiliza para esclarecer las distintas estructuras de compuestos orgánicos. Se fundamenta en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos. Los núcleos más usados son el Hidrógeno y el Carbono, constituyentes principales de las moléculas orgánicas (Laurella, 2020).

Esta técnica ha sido ampliamente usada para estudiar la estructura de las moléculas. (Kwan & Huang, 2008). También es empleada en el análisis de mezclas complejas de extractos de plantas, alimentos, entre otros (Forseth & Schroeder, 2011). La cantidad de información recolectada en un espectro de RMN y la facilidad de preparación de la muestra, favorecen que esta técnica espectroscópica sea muy reconocida para evaluar la calidad de un producto (Bankova et al., 2019).

Una gran ventaja de RMN sobre otro tipo de métodos es su amplia capacidad de proporcionar información estructural y detalles cualitativos de componentes químicos en un solo análisis de RMN. Es compleja, pero altamente informativa.

Para analizar mezclas en RMN existen dos maneras principales: (1) separar los constituyentes de la mezcla previo al análisis de RMN; y (2) examinar la mezcla como tal. La primera manera se utiliza cuando el propósito del trabajo es caracterizar un compuesto aislado y que no esté sujeto a disputa. La segunda manera permite obtener una imagen universal de la mezcla en estudio, sin haber realizado ningún otro pretratamiento de la muestra, excepto la solubilización ocasional en un disolvente adecuado. Los espectros resultantes son considerados una huella química del producto

investigado. El análisis de los espectros de mezclas complejas puede apoyarse en la aplicación de métodos estadísticos multivariados (Papotti et al., 2010).

*1.5.7 Potencial antioxidante basado en el secuestro de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)* Este método consiste en la captación de radicales libres y sugiere el potencial antioxidante de la muestra objeto de estudio. Los radicales libres son capaces de reaccionar con compuestos antioxidantes mediante la entrega de un átomo de hidrógeno suministrado por el agente antioxidante. Este reactivo se puede solubilizar en disolventes orgánicos (Guija et al., 2015).

La fundamentación de usar DPPH como reactivo es que permite ceder electrones del antioxidante hacia el radical DPPH y al realizarse este proceso ocurre un cambio de color que se correlaciona con la capacidad del antioxidante (Shahidi & Zhong, 2015). A lo largo de los años se ha utilizado esta técnica descrita por Brand-Williams, pero varios autores le han hecho modificaciones con diversos objetivos (Gruszycki et al., 2019; Guija et al., 2015).

## **1.6 Composición química**

La variedad de fitoquímicos presentes en el propóleo se atribuye a que las abejas recolectan exudados vegetales ricos en compuestos orgánicos de diversas especies de plantas. De forma general, el propóleo está compuesto químicamente por: ácidos orgánicos, flavonoides, fenoles, enzimas, minerales y vitaminas; responsables de sus propiedades protectoras, conservantes y terapéuticas (Bankova et al., 2018).

Este material resinoso posee variedad de compuestos fenólicos, también conocidos como polifenoles entre los que destacan los flavonoides cuyo esqueleto es  $C_6C_3C_6$ , donde los grupos  $C_6$  forman anillos bencénicos y la fracción  $C_3$  pertenece a un heterociclo (Campo, 2007).

Los compuestos fenólicos mencionados se obtienen de plantas en diferentes etapas de desarrollo y tienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Los flavonoides se subdividen en varias clases, incluyendo chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonoides, antocianidinas y flavanoles. Además, hay otros compuestos fenólicos presentes en el propóleo, como los ácidos fenólicos, cumarinas, xantonas, estilbenos, y lignanos. Los ácidos fenólicos se dividen en derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico, fundamentalmente. La composición química del propóleo es muy variable y puede contener una gran cantidad de compuestos fenólicos de diferentes clases, incluyendo compuestos fenólicos glicosilados. El análisis de la composición química del propóleo puede ser desafiante debido a la gran cantidad de compuestos presentes en él (Bankova et al., 2019). También se debe considerar que varía

dependiendo del origen botánico y geográfico del mismo, por ejemplo, se ha informado que el propóleo cubano que proviene principalmente de *Clusia rosea* Jacq., contiene benzofenonas poliisopreniladas que son distintas del propóleo europeo y brasileño (Hossain et al., 2022).

En una investigación donde se aplicó la técnica de electroforesis capilar en tres extractos diferentes de propóleos: etanol, etanol-acuoso y acuoso-ácido glicólico, se identificaron doce flavonoides, dos ácidos fenólicos y un derivado de estilbeno. Se encontró que el extracto de propóleos acuoso-etanólico contenía una alta concentración de ácido cafeico, galangina, quercetina y crisina, mientras que la preparación de etanol tenía una gran cantidad de resveratrol, crisina y ácido cafeico. Por otro lado, la preparación acuoso-glicólico estaba conformada, principalmente, por compuestos no identificados y contenía una baja cantidad de flavonoides (Rodríguez et al., 2014).

Se ha reportado que existe una importante cantidad de terpenoides, esteroides, azúcares y alcaloides reportados en propóleos recolectados en 6 regiones de India (Salleh et al., 2021). Siendo los alcaloides y sus derivados el descubrimiento más llamativo en los últimos años respecto a la composición química del propóleo (Šturm & Ulrih, 2020).

El propóleo también contiene minerales como: hierro, magnesio, potasio, calcio, zinc, sodio y yodo, así como vitaminas B1, B2, B6, C y E y una variedad de ácidos grasos y enzimas como la deshidrogenasa succínica, la ácido fosfatasa y la glucosa-6-fosfatasa. Además, contiene cobre y manganeso en concentraciones de 26,5 mg/kg y 40 mg/kg, respectivamente. También se encontraron residuos de ceniza que contenían hierro, calcio, aluminio, vanadio, estroncio, manganeso y silicio (Adanero, 2017; Quiñones, 2020; J. Rodríguez et al., 2014).

Los terpenos identificados en propóleos son, principalmente, diterpenos y alcoholes triterpénicos, mientras que las fracciones volátiles de varios tipos de propóleos contienen monoterpenos y sesquiterpenos, aunque en concentraciones no muy altas. Sin embargo, estos compuestos son importantes ya que influyen en el aroma característico de muchos tipos de propóleos (Verdugo & Tola, 2017).

Diferentes tipos de propóleos de distintas partes del mundo han sido analizados por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), y se han identificado varios tipos de flavonoides. En muestras recolectadas de Argentina, Italia y España, se encontró una alta concentración de pinocembrina, representando el 49%, 48% y 39% del contenido total de flavonoides, respectivamente. Estas muestras también contenían genisteína, kampferol, apigenina, crisina y acacetina. Por otro lado, una muestra de propóleos recolectada en China presentó una concentración alta de pinocembrina,

representando el 63% del total de flavonoides, pero carecía de genisteína, kaempferol, apigenina y crisina (Volpi & Bergonzini, 2006).

## **1.7 Actividad biológica**

*1.7.1 Actividad antioxidante* Los radicales libres son especies químicas muy reactivas que poseen al menos un electrón sin pareja, y pueden afectar estructuras celulares. Los antioxidantes contrarrestan los efectos negativos de los radicales libres a los que nos vemos expuestos diariamente. Los hábitos alimenticios, la inhalación del humo de cigarrillo, entre otros favorecen el incremento de los radicales en nuestro organismo (Angulo, 2014).

Sin embargo, el organismo también produce radicales libres de forma natural al realizar diversos procesos biológicos importantes como la síntesis de ATP, procesos inmunológicos como la fagocitosis, señalización intracelular, regulación del crecimiento celular, etc. Los radicales libres más importantes son especies reactivas de oxígeno y pueden modificar la estructura de lípidos de membranas celulares, proteínas, carbohidratos e incluso el ADN, que pueden originar enfermedades (Revilla, 2021).

Debido a lo mencionado anteriormente, el sistema activa sus sistemas endógenos y exógenos antioxidantes. Este último involucra a flavonoides y ácidos fenólicos que se adquieren en la dieta. La actividad antioxidante de los propóleos se debe, principalmente, a los compuestos fenólicos que posee, destacando de forma general a la quercetina, naringenina, pinobanksina, kaempferol, galanina, crisina, entre otros (Vargas et al., 2013).

*1.7.2 Actividad antimicrobiana* La actividad antibacteriana es una de las propiedades básicas del propóleos, y su acción bacteriostática y bactericida se basa en la inhibición de los ácidos nucleicos y la degradación de las membranas citoplasmáticas, debido, principalmente a flavonoides como acacetina, quercetina, naringenina, apigenina, crisina, pinobanksina, galangina, pinoembrina y kaempferol. Las alteraciones de los canales iónicos, como resultado de las reacciones de fosforilación y desfosforilación, producen la inhibición de la motilidad bacteriana, un factor clave en la virulencia (Rodríguez et al., 2020).

Existen gran cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos que integran la fracción resinosa del propóleos, estos son de gran interés terapéutico sobre todo cuando actúan de forma sinérgica. Esta actividad es usada por las abejas para evitar la proliferación de microorganismos. Además, las personas utilizan extractos de propóleos como antimicrobianos en formas farmacéuticas o en los alimentos (Samara et al., 2011).

Un estudio donde se evalúa la actividad antimicrobiana de propóleos del desierto de Sonora evidencia la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*. En esta investigación relacionan la actividad antibacteriana con la presencia de compuestos como la acetina, pinocembrina, éster fenilético del ácido cafeico, naringenina, pinobanksina, crisina y galanina. Sin embargo, sobre otras cepas como la *E. Coli* y *P. aeruginosa* no se observó efecto alguno del propóleos (Bucio & Martínez, 2016; Velázquez et al., 2007).

La actividad antibacteriana del propóleos se puede relacionar con los compuestos antioxidantes que posee, en un estudio se llegó a la conclusión de que la actividad antimicrobiana se ve afectada por el tipo de antioxidante mas no a la cantidad presente del mismo. También se observó que los extractos de propóleos tienen acción únicamente sobre bacterias Gram positivas, sin embargo, no presenta efecto inhibitorio sobre bacterias Gram negativas (Checalla & Sánchez, 2021).

Esta actividad se relaciona con la presencia de ciertos compuestos como quercetina, kaempferol, pinocembrina, ácido cinámico y crisina, que según la literatura presentan actividad antimicrobiana y antioxidante (Vargas et al., 2014).

En lo que respecta a la actividad antimicótica, los extractos de propóleos tienen capacidad fungistática y fungicida frente a varios hongos filamentosos y levaduras, lo que resulta una alternativa poco invasiva y económica sobre todo frente a infecciones micóticas leves. Compuestos como los ésteres fenólicos, flavonoides y ácido cafeico actúan inhibiendo el tubo germinativo de los hongos y modificando su pared celular con la adición de espacios irregulares de gemación que impiden su reproducción. Cabe recalcar que la actividad antifúngica se da por la presencia de los compuestos fenólicos, si estos están ausentes o en baja concentración la actividad es escasa o nula (Benavidez, 2018).

**1.7.1 Actividad antiinflamatoria** A gran cantidad de compuestos fenólicos se les atribuye la capacidad antiinflamatoria que poseen los propóleos, los cuales actúan de forma sinérgica para lograr la actividad de interés. Esto se evidencia en estudios *in vitro* e *in vivo* donde se puede evidenciar que los compuestos presentes en el propóleos como: ácido ferúlico, galangina, pinocembrina, quercetina, kaempferol, entre otros, estabilizan a los glóbulos rojos, sobre todo, a temperaturas elevadas y en medios hipotónicos (Portela et al., 2022).

La actividad antiinflamatoria de los propóleos es similar al efecto que tienen los antiinflamatorios no esteroideos como el diclofenaco. Ejercen su efecto sobre los macrófagos y como consecuencia se reduce la producción de prostaglandinas y leucocitos, quienes provocan la vasodilatación y de esta manera la inflamación. Esto se

evidencia en estudios *in vivo* e *in vitro* donde también se constata que el propóleo actúa inhibiendo la vía de la lipooxigenasa del ácido araquidónico, quien también interviene en el proceso inflamatorio (Padrón et al., 2012).

En base a los mecanismos antes mencionados se reduciría la inflamación aguda sobre las lesiones tóxicas debido a que el propóleo posee polifenoles en grandes cantidades. El tratamiento con propóleo protege al tejido epitelial, disminuye la congestión y vasodilatación de los vasos sanguíneos. Además, disminuye la cantidad de líquido en la zona de hinchazón (edema), por medio de la reducción de la respuesta inflamatoria que recibe el tejido afectado (Núñez et al., 2018).

*1.7.2 Actividad antitumoral* La variedad botánica que circunda a la colmena garantiza que el propóleo producido contenga una gran variedad de flavonoides y otros compuestos fenólicos. Se ha demostrado que estos compuestos pueden contribuir a la prevención del cáncer y enfermedades cardíacas. Los principales compuestos fenólicos que se evidencian en el propóleo son: galangina, crisina, apigenina, crisina, pinocembrina, galangina, pinocembrina, sakuranetina, kaempferol, entre otros. Los cuales pueden ayudar en la reducción y neutralización de tumores y células cancerígenas (Palomino et al., 2009; Vargas et al., 2013).

Se ha evidenciado que el propóleo tiene acción citotóxica, apoptótica y antiproliferativa frente a células que derivan en la formación de tumores, en distintas líneas celulares del cáncer. Desde el punto de vista molecular esta actividad se hace presente a través de la reducción del ciclo celular, activación de la muerte celular o apoptosis ya sea por vía intrínseca o extrínseca y mediante la reducción de la expresión de las ciclinas. Así también, los componentes presentes en el propóleo inhiben el crecimiento tumoral impidiendo el desarrollo neoplásico y haciendo uso de mecanismos angiogénicos (Torres, 2017).

La ingesta de ésteres del ácido cafeico ayuda a disminuir, significativamente, la posibilidad de desarrollar adenocarcinoma de colon, reduce el volumen tumoral de colon hasta un 45%, reduce la acción de ciertas fosfolipasas en tumor y mucosas hasta en un 50%, dependiendo de la concentración de los principios activos (Serrano, 2000).

*1.7.3 Otras actividades biológicas* Trabajos de investigación consultados demuestran la acción de los propóleos sobre la inmunidad específica e inespecífica, así como también sobre la inmunidad humoral y celular. Un estudio realizado en ratones de laboratorio infectados con el virus de la influenza A, que fueron tratados con propóleos, reflejó un aumento de fagocitos y células T, lo que reducía la mortalidad frente a aquellos ratones que no fueron tratados con propóleos. De esta manera se determinó que el

propóleos contribuye a liberar el factor que inhibe la migración leucocitaria (Palomino et al., 2009).

En lo que respecta a la actividad antiasmática, es atribuida a los terpenos que se encuentran en el propóleos. Otros compuestos como los ácidos grasos ayudan a reducir el riesgo de trombosis ya que reducen el colesterol LDL en el organismo. De esta manera se regula el metabolismo, y varios procesos del sistema endocrino. (Plana & Perurena, 2011)

Además de las propiedades farmacológicas mencionadas anteriormente, el propóleos puede ejercer acción analgésica y cicatrizante. En países como Brasil se comercializa la tintura de propóleos como fitofármaco para aliviar ciertas sintomatologías leves en afecciones como el herpes, mucositis bucal, gastritis, entre otras (Carrasco & Cepeda, 2020; Suarez et al., 2013).

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Tipo de estudio

El presente trabajo de investigación es de tipo descriptivo y correlacional

### 2.2 Variables

#### 2.2.1 Variables dependientes

- Composición química de la muestra de propóleos ecuatoriano EP12.
- Capacidad antioxidante de la muestra de propóleos ecuatoriano EP12.

2.2.2 Variable independiente Origen geográfico de la muestra de propóleos ecuatoriano EP12.

### 2.3 Extracto seco de propóleos

El extracto seco de propóleos que constituyó la base de este trabajo se obtuvo a partir de la muestra EP12 (10 g), obtenida en San Pedro de Vilcabamba, Loja. El cual se preparó por maceración (3 x 24 h) con metanol (FISHER SCIENTIFIC) como disolvente. El extracto se reunió y filtró a través de papel de filtro, y se concentró a sequedad en un rotoevaporador (HEIDOLPH LABORATA 2001) a 40°C acoplado a una bomba de vacío (VACUBRAND PC 600) y un criostato (LAUDA/ALPHA RA-8). El extracto seco se conservó en viales de vidrio a 4°C protegidos de la luz.

### 2.4 Métodos de análisis del propóleos

#### 2.4.1 Métodos de separación

##### • Cromatografía en columna (Sephadex LH-20)

Se pesó alrededor de 2,5-3 g del extracto seco de propóleos (ESP) en una balanza analítica (Weicin systems) con la ayuda de una espátula y un vaso de precipitado. El residuo sólido se disolvió con 9 mL de metanol grado CLAE, para favorecer la disolución se utilizó un baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5.7L Fisher Scientific). Se colocó la misma cantidad de disolución en dos tubos de ensayo de igual tamaño para luego centrifugar la muestra durante 5 min a 50000 rpm en una centrífuga (Clay Adams), a fin de separar la parte sólida de la líquida.

La muestra líquida se depositó en la cabeza de la columna SR-25 (1000 x 25 mm), cargada con Sephadex LH-20, con la ayuda de una pipeta Pasteur. El metanol fue usado como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Las fracciones (10 mL) se recogieron en tubos de ensayo previamente rotulados.

#### • **Cromatografía en columna (Sílica gel)**

Como muestra de análisis se utilizó la fracción EP12 1/4 (0,4 g) obtenida de la cromatografía en columna de Sephadex. La columna se rellenó con 30 g de Sílica (Fluka Analytical) y se montó por la vía húmeda empleando hexano. La fracción se adsorbió sobre una cantidad suficiente de la misma sílica y se aplicó con una espátula por el extremo superior de la columna. Las fases móviles se prepararon empleando como disolventes hexano (Fisher Chemical, cloroformo (Sigma-Aldrich) y metanol (Fisher Chemical), incrementando la polaridad paulatinamente.

#### • **Cromatografía en columna (Sílica gel RP18)**

Se trabajó en el modo de fase reversa utilizando 20 g de Sílica gel RP18. Se empleó la vía húmeda para el montaje de la misma, utilizando una disolución de agua-metanol (50:50). Para preparar las fases móviles se utilizaron los disolventes: agua y metanol, disminuyendo la polaridad de forma paulatina durante el fraccionamiento de la muestra seleccionada, fracción EP12 3/8.

#### • **Cromatografía en capa delgada**

Se emplearon placas de Sílica gel G60F<sub>254</sub> con soporte de aluminio y la corrida se desarrolló en una cámara cromatográfica de vidrio (21,5cm de altura, 23cm x 6cm en la base y 28cm x 13cm la cara superior). La aplicación de las muestras se realizó con capilares. Previo a la corrida se acondicionó la cámara cromatográfica por alrededor de 5 min con la fase móvil (cloroformo-metanol (9:1)) en el análisis de las fracciones obtenidas en la primera y segunda Sephadex. Mientras que para las fracciones obtenidas en la columna de Sílica se utilizó (hexano-cloroformo (6:4)) para la fase normal y (metanol-agua (8:2)) para el análisis en fase reversa, en esta última se utilizó como fase estacionaria placas de Sílica gel RP18.

El revelado físico se ejecutó con una lámpara (MiniMAX<sup>TM</sup> UV-5NF) a longitudes de onda de 254 nm y 365 nm. El revelado químico se realizó con 50 % ácido sulfúrico en etanol (v/v) y 1% vainillina en etanol (m/v). Después de nebulizar la placa con los reactivos mencionados, esta se calentó a 75°C sobre una cocineta (Electric Life) hasta la aparición de las manchas.

### **2.4.2 Métodos de caracterización química**

#### • **Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE)**

El extracto seco de la muestra EP12 y sus fracciones obtenidas por los diferentes métodos de separación utilizados se disolvieron en metanol grado HPLC (10 mg/mL) y

se filtraron utilizando un filtro de membrana de 0,2 µm. El análisis se realizó en un sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) debidamente equipado con un detector de masas y un detector de arreglo de diodos. Se empleó una columna Accucore RP-MS (100 mm x 2.1mm, 2.6 µm) y la temperatura se ajustó a 35 °C. La fase móvil fue: acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico y se utilizó el modo gradiente. La velocidad de flujo fue de 0,4 mL/min y el volumen de inyección 2 µL.

La detección UV se realizó a 200, 250, 280 y 330 nm. Para la detección de masas se empleó un espectrómetro de masas de trampa lineal de iones dotado con una fuente de ionización por electronebulización. Se empleó nitrógeno como gas principal, de barrido y auxiliar.

#### • Resonancia magnética nuclear (RMN)

El análisis se realizó en un equipo de resonancia magnética nuclear de la marca BRUKER (Magnet System 500'54 Ascend ULH) de serie MSC 1020, con una radiofrecuencia de resonancia de 500 MHz para <sup>1</sup>H y 125 MHz para <sup>13</sup>C. Se realizaron los experimentos RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C. Se empleó cloroformo deuterado como disolvente y tetrametilsilano como referencia interna. La muestra analizada fue la fracción 4/18 (1,8 mg), la cual se introdujo en un tubo de vidrio de 3 mm de diámetro y 10 cm de altura.

### 2.5 Análisis de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox por el método DPPH

**Preparación de las muestras:** Se pesaron alrededor de 15 mg del extracto seco y de cada fracción obtenida de la primera Sephadex, los que se disolvieron con 1,5 mL de etanol (FISHER SCIENTIFIC) con la ayuda de un Vortex (Fisher Scientific mini vortex).

**Ensayo:** El ensayo se realizó por triplicado para cada una de las muestras mencionadas. Los resultados se expresaron como la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) por gramo de extracto seco. Para ello se realizó una curva de calibración donde se prepararon disoluciones etánolicas por triplicado, a concentraciones de 0,027; 0,077; 0,127; 0,177; 0,227 y 0,277 mg/mL de Trolox. Para medir la concentración equivalente a Trolox se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = (\%I_{nh} + 3,6507) / 308,13 \quad (1)$$

De cada una de las muestras se tomaron 200 µL y se mezclaron con 3,8 mL de la disolución etanólica de DPPH (0,1 mM), manteniendo las disoluciones a temperatura

ambiente y oscuridad por un lapso de 30 min. Del mismo modo se preparó la muestra control incorporando 200 µL de etanol y 3,8 mL de DPPH (0,1 mM).

Se utilizó el espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific) y se procedió a leer a 517 nm empleando microcuvetas de 2 mL y como blanco etanol absoluto. En base a la absorción de cada muestra se calculó el porcentaje de inhibición haciendo uso de la ecuación:

$$\%DPPH = (A \text{ control} - A \text{ muestra}) / A \text{ control} * 100 \quad (2)$$

## **2.6 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se ejecutó en el programa Microsoft Excel 2016. Se utilizó en la medición de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox mediante el método DPPH, donde se calculó la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos en base al factor de dilución. También se realizó el análisis de regresión lineal de la curva de calibración.

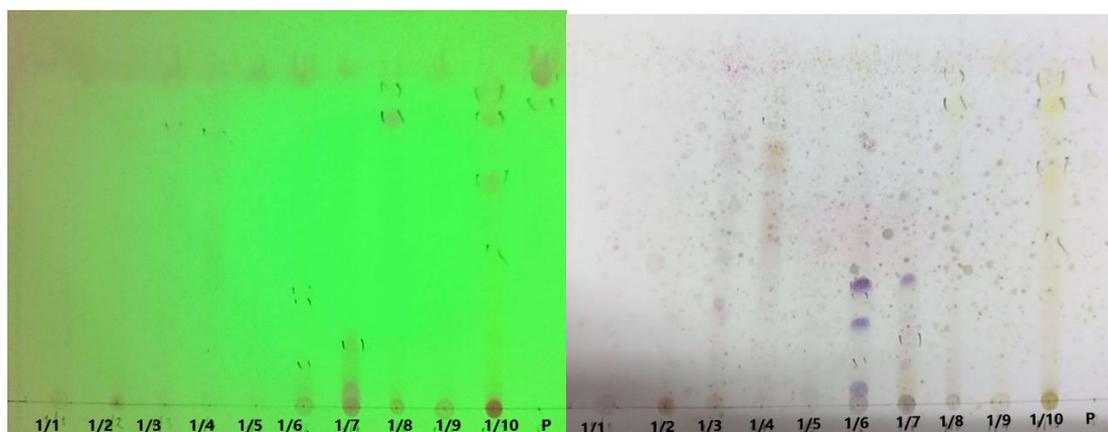
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Métodos de separación

- **Cromatografía en columna (Sephadex LH-20)**

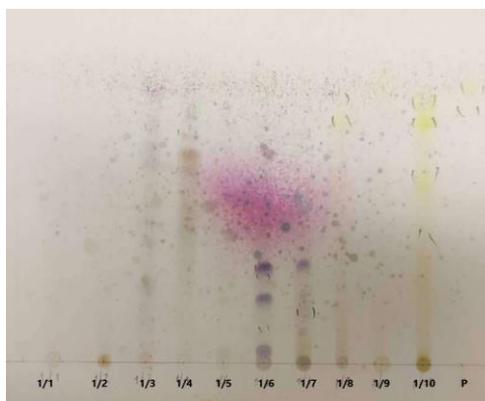
La cromatografía en columna con soporte de Sephadex LH-20 se realizó con el objetivo de fraccionar el extracto de propóleos, separando los compuestos en base al tamaño molecular, logrando así la obtención de fracciones menos complejas respecto al extracto inicial. La técnica se aplicó por duplicado a la muestra EP12, obteniendo 10 fracciones en la primera corrida cromatográfica y 9 fracciones en la segunda. En la figura 1 se muestran los resultados de la cromatografía en capa delgada al comparar las fracciones, donde se ejemplifica con las fracciones de la primera Sephadex LH-20 (1/1 – 1/10). Esta metodología es ampliamente utilizada en el fraccionamiento de extractos de productos naturales desde hace décadas, ya que se puede realizar con una sola fase móvil, se recupera la fase estacionaria y los resultados son reproducibles (Hostettmann et al., 1986).

Figura 1. CCD de las fracciones de la primera Sephadex. FM:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1), y FE: Sílica gel G60F<sub>254</sub>. P = Precipitado de la fracción 1/8



**A. Revelado físico:** Luz UV 254 nm

**B. Revelado químico:**  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y calor



**C. Revelado químico:**  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y calor más vainillina

Las placas cromatográficas evidenciaron la separación favorecida por la columna de Sephadex LH-20. De forma general, se visualizaron manchas cuyos valores de Rf y coloraciones variaron. Al revelar las placas con luz UV a 254 nm (A), se observaron manchas en las fracciones 1/3, 1/4, 1/6, 1/7, 1/8, 1/10 y P, indicando la presencia de compuestos con cromóforos conjugados que absorben a esa longitud de onda. Mientras que el revelado químico (B y C), sugiere que las fracciones 1/4, 1/6, 1/7, 1/8 y 1/10 presentaron mayor diversidad de componentes. Las 3 últimas fracciones se caracterizan por la presencia de compuestos químicos con coloración amarilla y alto valor de Rf. La separación en columna se repitió una vez más y las fracciones de ambos procesos se unieron según su similitud cromatográfica en capa delgada y CLAE/EM.

- **Cromatografía en columna (Sílica gel)**

Las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna con Sephadex LH-20, se compararon tanto por CCD como por CLAE/EM con el objetivo de definir la fracción con la que se continuaría el estudio. La fracción EP 12 1/4 mostró menor complejidad cromatográfica (figura 2) y por lo tanto fue seleccionada para realizar un proceso de separación por cromatografía en columna con Sílica gel como fase estacionaria.

Figura 2. CCD FM:  $\text{CHCl}_3$  y FE: placa de Sílica gel G60F<sub>254</sub> y cromatograma de masas de la corriente iónica total de la fracción 1/4.

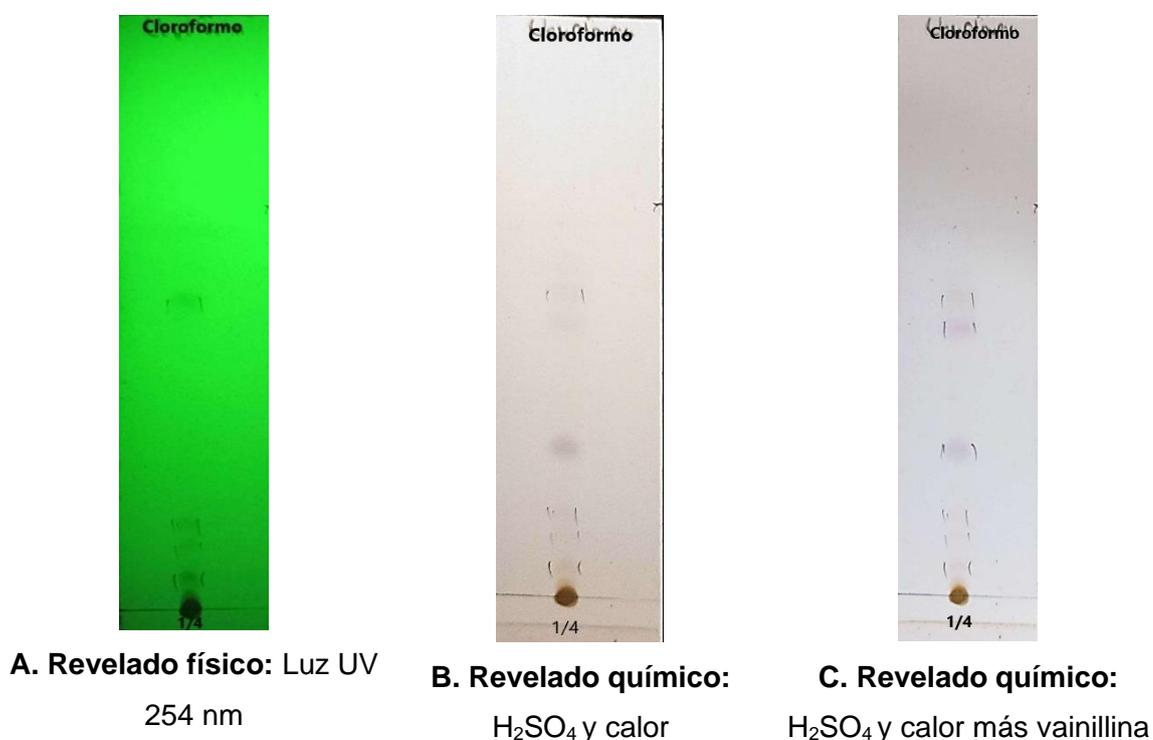
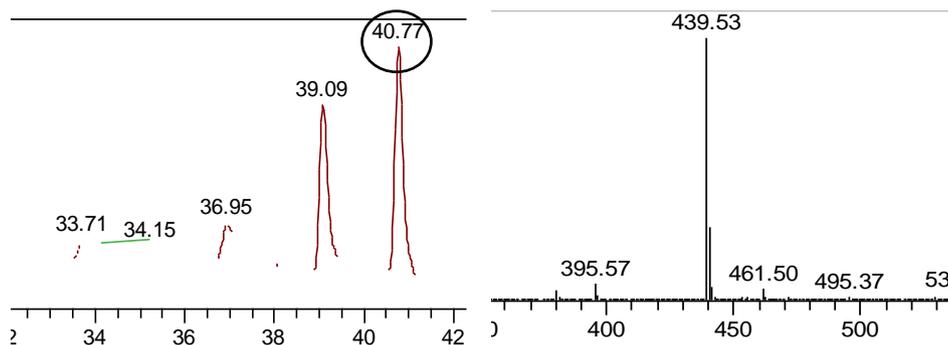


Figura 2. (Continuación)



**D.** Cromatograma de masas de la corriente iónica total (32-42 min) y  $[M-H]^-$  correspondiente al pico cromatográfico en 40,7 min.

El análisis por CCD de la fracción 1/4 mostró que en ella existía la posibilidad de aislar al menos un componente al continuar su purificación mediante cromatografía en columna de Sílica, debido a que se visualizaron manchas resueltas en la placa. Por otro lado, el cromatograma de masas confirmó que esta era la fracción idónea para continuar con su análisis ya que presentó baja complejidad respecto a la cantidad de picos más intensos, presentando estos un mayor tiempo de retención con posibilidad de separarlos del resto de señales menos intensas.

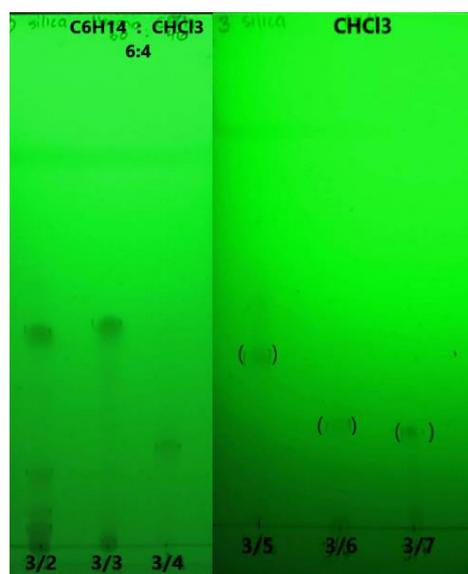
Durante el proceso de la columna de Sílica se fue variando de fase móvil según el comportamiento de las fracciones en CCD, usando diferentes disolventes y proporciones según se especifica en la Tabla.1

Tabla 1. Proporción y frecuencia de las fases móviles utilizadas.

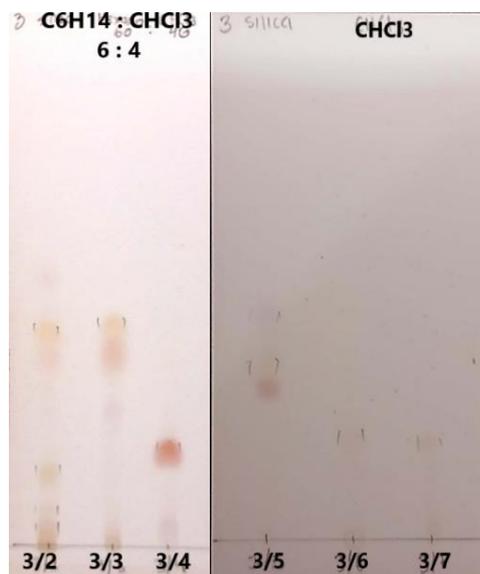
Mezcla de disolventes	Proporción - Frecuencia
Hexano – Cloroformo	(50:50) - 4; (45:55) - 1; (40:60) - 1; (35:65) - 1; (30:70) - 1; (25:75) - 1; (20:80) - 1; (15:85) - 1; (10:90) - 1
Cloroformo – Metanol	(95:5) - 4; (90:10) - 1; (80:20) - 3; (70:30) - 1; (60:40) - 1; (50:50) - 1; (40:60) - 1; (30:70) - 1

A partir de la separación que se realizó, se lograron obtener 10 fracciones reunidas (3/1-3/10). En las figuras 3 y 4 se muestran los resultados de la cromatografía en capa delgada al comparar las fracciones.

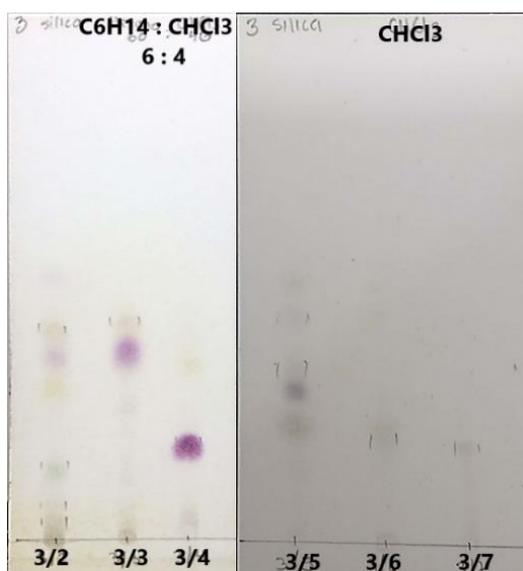
Figura 3. CCD de las fracciones 3/2-3/7, FM: C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> / CHCl<sub>3</sub> (6:4) y FE: Sílica gel G60F<sub>254</sub>.



A. Revelado físico: Luz UV 254 nm



B. Revelado químico: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calor

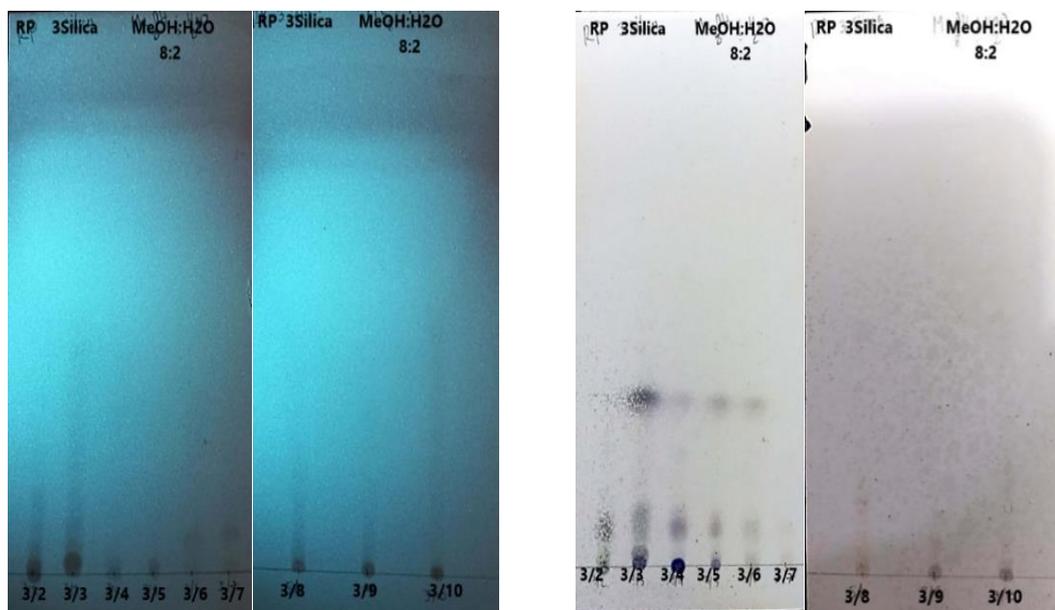


C. Revelado químico: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calor más vainillina

Para realizar el análisis en CCD de las fracciones obtenidas, se utilizó una fase móvil de baja polaridad a fin de mantener los compuestos un poco más retenidos a la fase estacionaria, al usarse el modo de fase normal. En base a lo observado en las placas, se logró identificar que las primeras fracciones aun presentaban una elevada complejidad por las manchas que se evidenciaron. Las últimas fracciones fueron menos complejas y en ellas se visualizaron menor cantidad de manchas ante los métodos de revelado utilizados. En fracciones como la 3/2 y 3/3 se evidenciaron un mayor número de manchas, de R<sub>f</sub> bajo e intermedio lo que indicó la presencia de compuestos de baja y mediana polaridad.

Adicionalmente, las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa delgada de fase reversa con el objetivo de evaluar la posibilidad de continuar el proceso de separación con una columna de fase reversa.

Figura 4. CCD en Fase reversa de las fracciones 3/2 – 3/10, FM: CH<sub>3</sub>OH / H<sub>2</sub>O (8:2) y FE: Sílica gel RP18



**A. Revelado físico:** Luz UV 254 nm

**B. Revelado químico:** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calor más Vainillina

Al revelar las placas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> /Vainillina (figura 4), se pudo observar que ciertos compuestos quedaron retenidos cerca al punto de aplicación, sobre todo en las fracciones 3/3 y 3/4, estas manchas representan compuestos poco polares ya que se utilizó una fase estacionaria apolar. Mientras que otro grupo de compuestos presentaron mayor R<sub>f</sub>, es decir, ascendieron más en la placa, siendo estos más polares. De forma preliminar se determinó que las fracciones 3/7 y 3/8 presentaron una mejor separación respecto a las demás fracciones obtenidas, debido a que se observó una sola mancha de bajo R<sub>f</sub>.

Por otro lado, el análisis en CLAE/EM de las fracciones obtenidas permitió caracterizar los picos más representativos, los cuales son presentados en la Tabla 2.

Tabla 2. Información deducida a partir de los cromatogramas de masas de las fracciones obtenidas de la columna de Sílica gel, correspondiente con los picos cromatográficos más intensos.

TR	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup>	FRACCIÓN	PRINCIPALES PÉRDIDAS
13,92	413	395 (10), 341 (100)	3/7	-18 Da (H <sub>2</sub> O)
30,61	299	284 (27), 283 (47), 269 (26), 228 (27), 227 (100)	3/6	-15 Da (CH <sub>3</sub> )
30,83	473	429 (40), 385 (100)	3/9	-44 Da (COO <sup>-</sup> )
32,28	379	321 (14), 307 (100)	3/7	-15 Da (CH <sub>3</sub> )
33,31	313	295 (100), 299 (1)	3/5	-18 Da (H <sub>2</sub> O) -15 Da (CH <sub>3</sub> )
33,33	395	377 (100), 351 (20), 337 (32), 324 (83), 323 (65), 319 (67), 281 (79), 144 (31)	3/3	-18 Da (H <sub>2</sub> O) -44 Da (COO <sup>-</sup> )
35,15	487	443 (35), 411 (100), 367 (38)	3/9	-44 Da (COO <sup>-</sup> )
36,69	395	377 (35), 367 (24), 337 (100), 323 (10)	3/4	-18 Da (H <sub>2</sub> O)
37,66	301	283 (22), 220 (100), 205 (23)	3/7	-18 Da (H <sub>2</sub> O)
37,70	363	345 (17), 319 (99), 285 (100), 217 (36), 294 (20)	3/3	-18 Da (H <sub>2</sub> O) -44 Da (COO <sup>-</sup> )
38,50	425	381 (100), 366 (24)	3/8 – 3/9	-44 Da (COO <sup>-</sup> )
40,20	439	395 (100), 380 (62), 148 (20)	3/8	-44 Da (COO <sup>-</sup> )

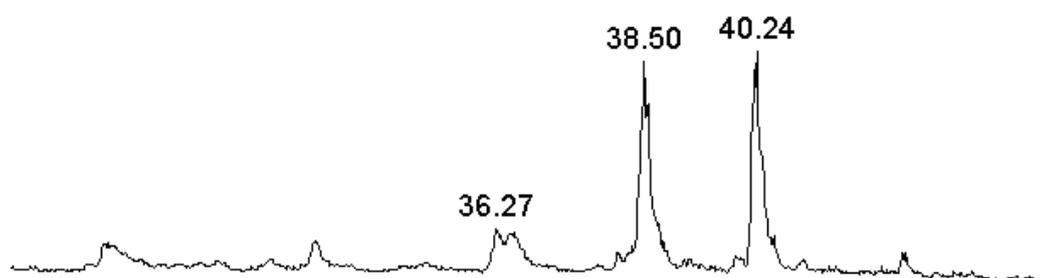
Muchos de los componentes incluidos en la tabla 2 mostraron pérdidas de H<sub>2</sub>O y/o COO<sup>-</sup>. La primera es típica de alcoholes y la segunda de ácidos carboxílicos. En la fracción 3/8 se concentraron los compuestos que caracterizan a la fracción 1/4.

Las masas moleculares inferidas de la Tabla 2 se incluyen en el rango de 300 a 440 Da, el cual es común en muestras de propóleos de diferentes orígenes geográficos (Bankova et al., 2019). Sin embargo, la comparación de los datos de espectrometría de masas obtenidos con la información disponible en la literatura no permitió la identificación de algún componente. Este resultado confirma la novedad de los componentes químicos de EP12 y la necesidad de continuar con el fraccionamiento para purificarlos y realizar experimentos de RMN que permitan su caracterización química.

- **Cromatografía en columna (Sílica gel RP18)**

La cromatografía en columna de Sílica RP18 se realizó con el fin de continuar la purificación de la muestra de propóleos EP12, la cual ya había pasado por el proceso de fraccionamiento por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 y Sílica en fase normal. A partir de esta última se seleccionó la fracción 3/8, la cual presentó menor complejidad respecto a las demás fracciones, evidenciado en el cromatograma de masas de la figura 5.

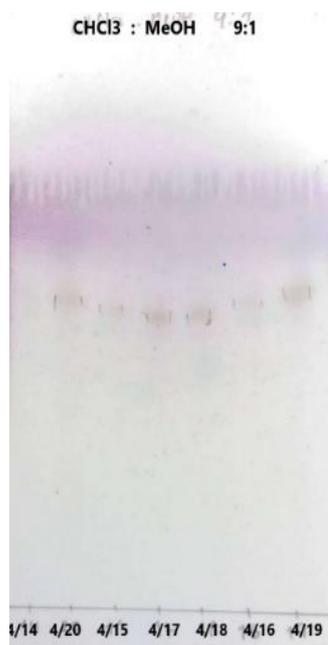
Figura 5. Cromatograma de masas de la corriente iónica total de la fracción 3/8.



El cromatograma de masas evidenció una buena separación, ya que en él se visualizaron dos picos intensos con tiempos de retención de alrededor de 2 min de diferencia, lo que dio pie a continuar con su análisis con el fin de aislar alguno de esos componentes mediante la cromatografía en columna de Sílica RP18.

La cromatografía permitió obtener 66 fracciones totales que se reunieron en 19 (4/1-4/19), las cuales eluyeron según su afinidad con cada fase móvil, siendo las primeras fracciones las más polares hasta terminar con las menos polares. En la figura 6 se muestran las fracciones reunidas en las que se observó menor complejidad cromatográfica.

Figura 6. CCD fracciones 4/14-4/20. FM: CHCl<sub>3</sub> / CH<sub>3</sub>OH (9:1) y FE: Sílica gel G60F254



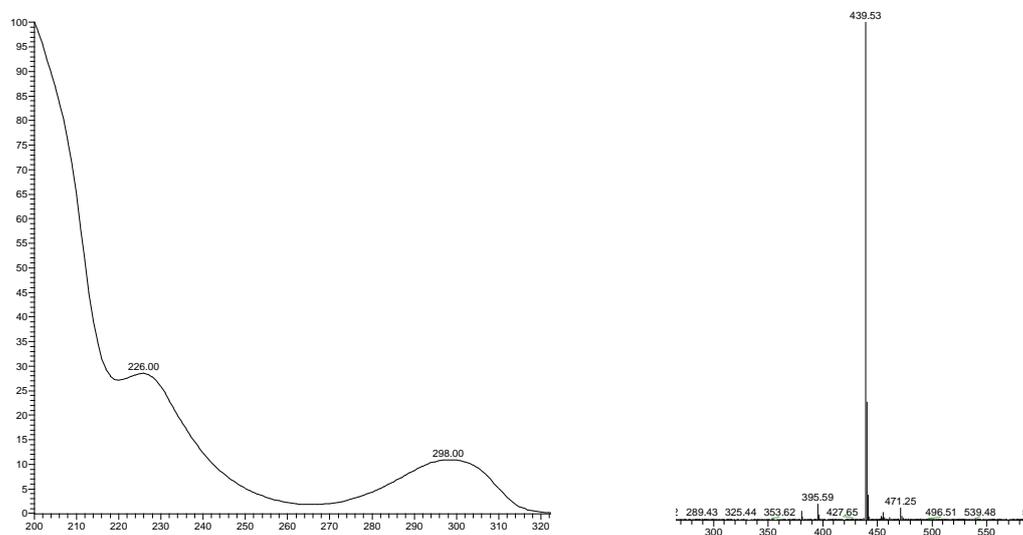
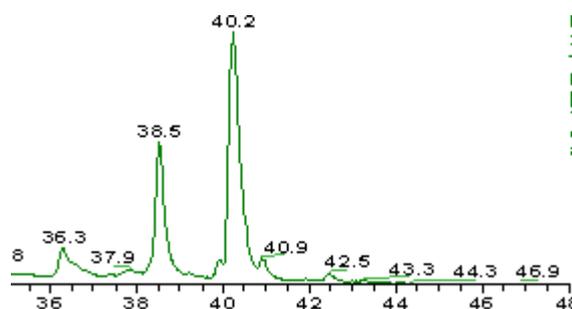
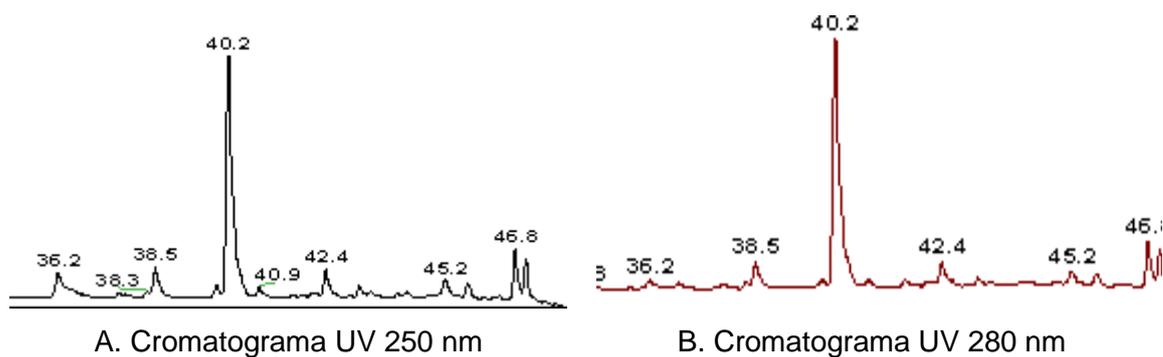
**Revelado químico:** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calor más vainillina

Las fracciones 4/14 – 4/19 fueron las que presentaron mejor separación, ya que en cada una de ellas se observó una mancha más intensa. Sin embargo, sus R<sub>f</sub> mostraron ligeras diferencias y por lo tanto se compararon por CLAE/EM para estimar de mejor forma su complejidad.

En el cromatograma de la fracción 4/18 se apreciaron las señales más intensas con tiempos de retención 38,5 y 40,2 min, que podrían ser compuestos relacionados estructuralmente, ya que ambos mostraron la pérdida de 44 Da (-COO<sup>-</sup>) como pico base en sus espectros EM<sup>2</sup>. Además, sus iones pseudomoleculares difieren en 14 Da, una diferencia lógica que puede atribuirse a un grupo CH<sub>2</sub> propiamente o al cambio de OH por OCH<sub>3</sub>. El compuesto de mayor tiempo de retención produjo una señal más intensa en el cromatograma UV y esto sugiere su posible carácter mayoritario si posee un cromóforo similar al de los otros compuestos que lo acompañan en la misma fracción. La absorción a 250 y 280 nm sugirió un posible cromóforo aromático en la estructura del compuesto con tiempo de retención 40,2 min.

En la figura 7 se muestra el cromatograma de masas y UV de la fracción 4/18, junto a los espectros correspondientes, la cual fue seleccionada para el análisis en RMN con el fin de caracterizar al menos uno de sus picos más intensos.

Figura 7. Cromatogramas de la fracción 4/18, espectros de masas y UV.



A pesar de que se observaron varios picos, es decir, aún se trataba de una mezcla de compuestos, la fracción 4/18 fue la seleccionada para su análisis por RMN con el objetivo de inferir otras particularidades estructurales del compuesto mayoritario.

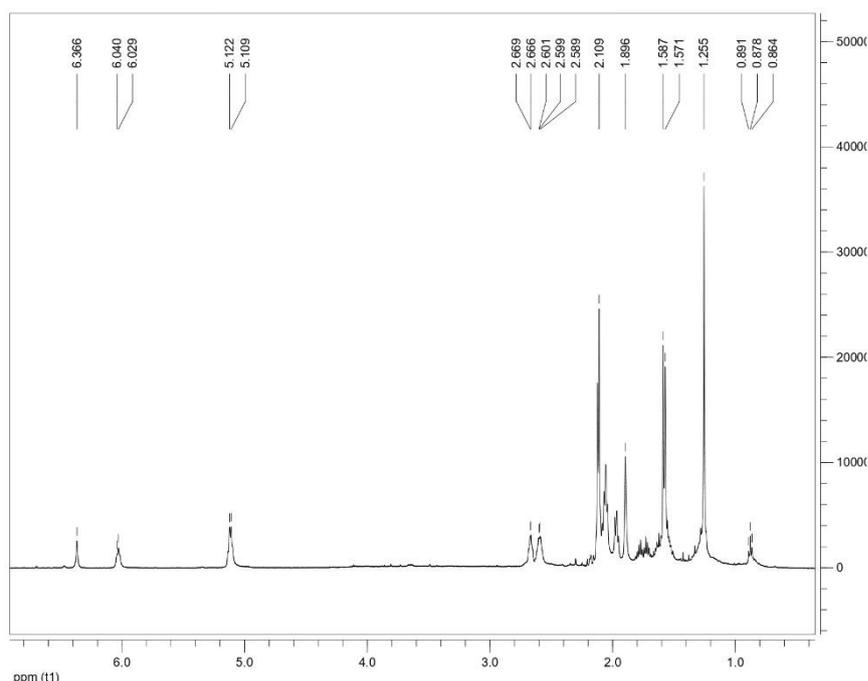
Los procesos cromatográficos descritos han permitido el fraccionamiento del extracto de EP-12, uno de los objetivos que persigue este estudio. La combinación de técnicas

que consideran diferentes mecanismos de separación favoreció este resultado. Es importante señalar que las afectaciones ocurridas en el laboratorio por el terremoto de marzo de 2023, perjudicaron la repetición de procesos y por tanto la obtención de fracciones de mayor masa. Estas a su vez repercuten en la calidad de los espectros de RMN que se pueden obtener.

### 3.2 Caracterización mediante resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN realizados se muestran en las figuras 8 y 9.

Figura 8. Espectro de RMN ( $^1\text{H}$ ) de la fracción 4/18.



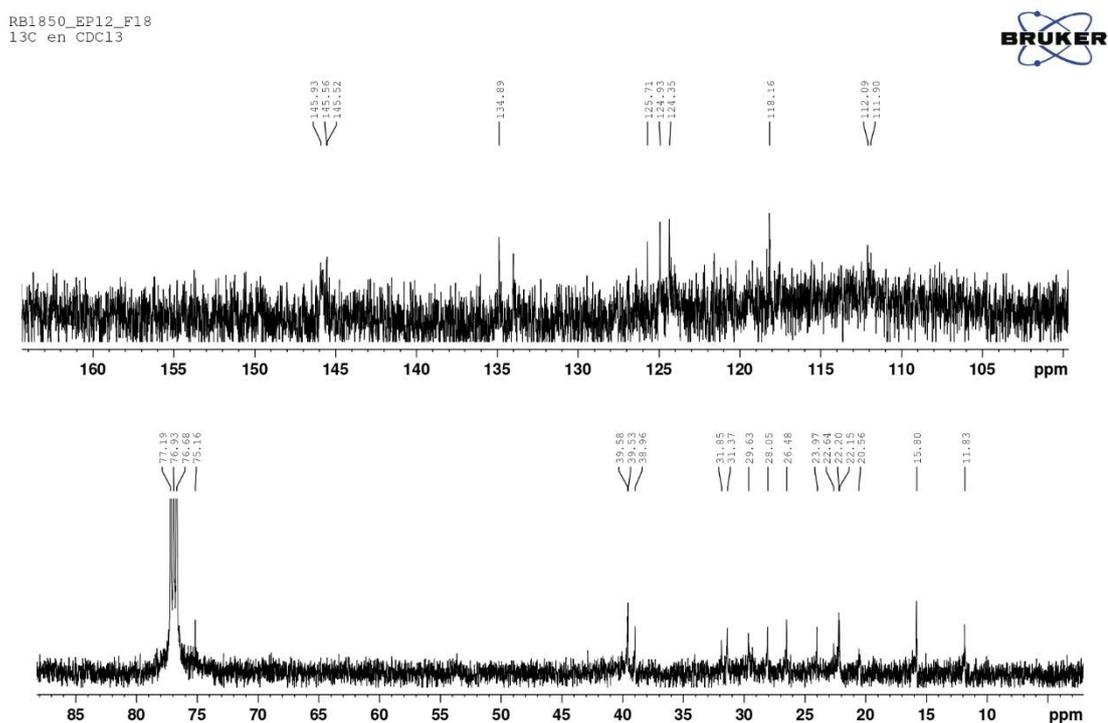
El espectro RMN  $^1\text{H}$  mostró señales típicas de protones alifáticos y aromáticos. Las señales entre 1,2 y 2,1 ppm, donde se aprecian las señales más intensas, son típicas de protones unidos a  $\text{Csp}^3$  y permiten inferir la existencia de una cadena alifática saturada, que debe ser larga si se tiene en cuenta la intensidad de las señales de esta zona respecto a las restantes. La señal más desblindada en 2,6 ppm no se corresponde con el valor base de grupos hidrocarbonados saturados y su posición indica la cercanía de un agrupamiento que origine desblindaje (carbonilo, enlace doble carbono-carbono, anillo aromático, etc). La presencia de grupos alquílicos unidos a oxígeno, al menos para un compuesto mayoritario, fue descartada ya que no se aprecian señales que lo evidencien (3-5 ppm). En particular, un grupo metoxilo de un compuesto mayoritario no se evidencia.

En la región de mayor de corrimiento químico se apreciaron 3 señales en 5,11; 6,03 y 6,36 ppm, respectivamente. La posición de la primera sugiere un residuo olefínico y las

otras dos se asocian con protones aromáticos. La apariencia de las mismas sugiere acoplamientos pequeños o superposición de señales, y no se pudo obtener información adicional a partir de sus multiplicidades.

Por otra parte, se intentó estimar el número de protones a través de la comparación de las integrales, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios, debido probablemente al hecho que se analiza una mezcla de compuestos. La relación entre las señales de protones sobre Csp2 parece ser 1:1,4: 3,4 (6,3: 6,01: 5,11 ppm), respectivamente.

Figura 9. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la fracción 4/18.



El espectro RMN  $^{13}\text{C}$  permitió corroborar que el compuesto mayoritario posee una zona alifática saturada (0-40 ppm), donde se aprecian las señales más intensas. En correspondencia con el espectro RMN  $^1\text{H}$ , también se apreciaron señales en la zona de Csp2 (por encima de 100 ppm), aunque estas son más débiles, indicando la posible presencia de carbonos olefínicos y aromáticos (Hesse et al., 1997). Las señales de mayor corrimiento químico (145 ppm) podrían originarse por carbonos aromáticos sustituidos. No se apreció la señal típica de carboxilo (175 ppm), aunque su carácter de carbono cuaternario y la poca cantidad de muestra empleada pueden justificar este hecho.

De forma general, el compuesto mayoritario parece contener un residuo aromático sustituido por una o más cadenas alquílicas.

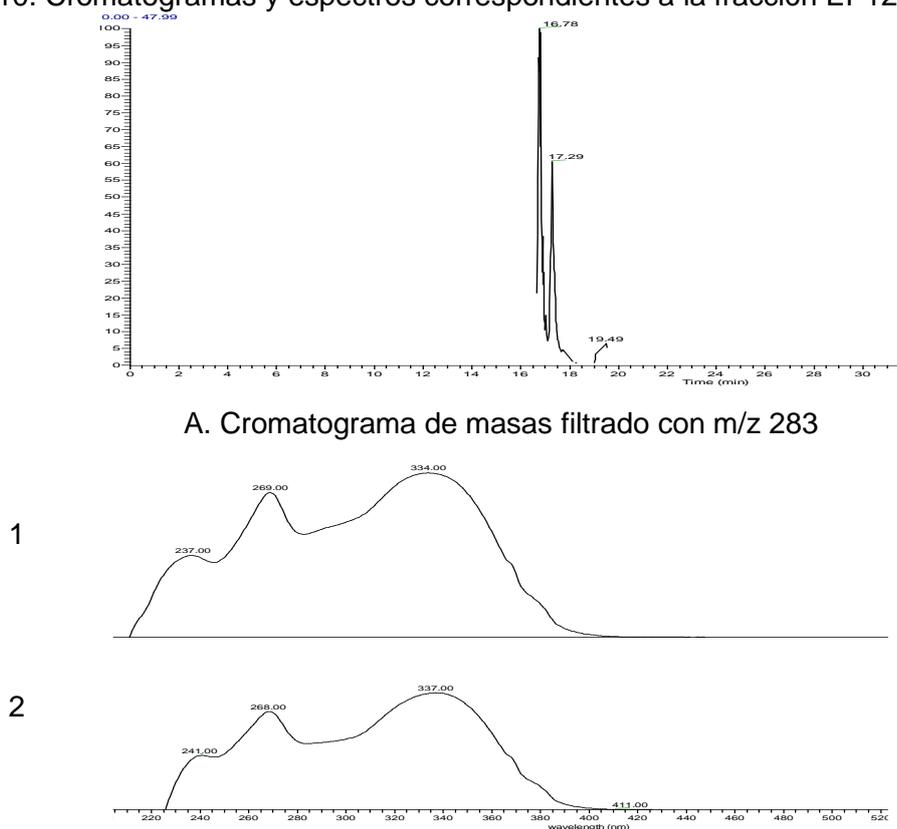
En propóleos de diferentes orígenes geográficos se han identificado derivados de alquilresorcinoles conocidos como ácidos anacárdicos, cardoles y cardanoles (Morais et al., 2017; Popova et al., 2013). Sin embargo, una comparación detallada con los datos disponibles de RMN de dichos compuestos, sugieren incongruencias sobre todo con el corrimiento químico de los protones aromáticos. Al menos un protón de estos sistemas de espines aromáticos resuena por encima de 7 ppm, y en el espectro RMN  $^1\text{H}$  realizado no se detectó dicha señal.

Los resultados parciales obtenidos parecen confirmar la posible presencia de compuestos con estructura química novedosa en la muestra objeto de estudio. Es necesario aumentar la masa de la muestra que contiene al compuesto analizado y mejorar su pureza para realizar otros experimentos de RMN.

### 3.3 Identificación de flavonoides

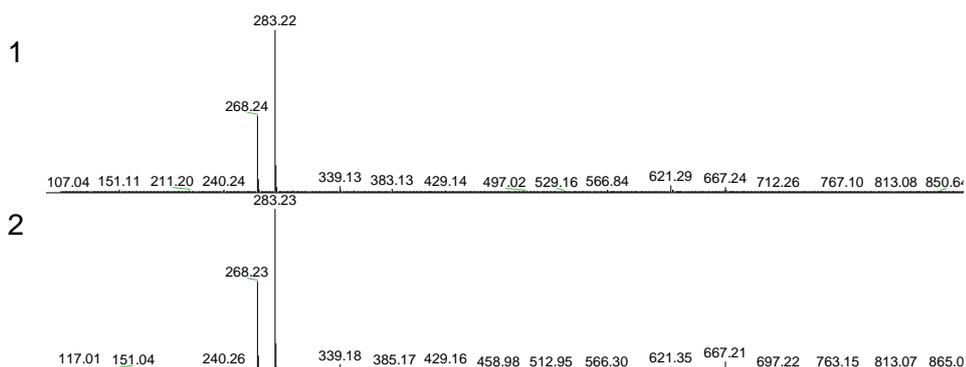
El análisis por CLAE-DAD-EM (figura 10), permitió deducir la presencia de dos flavonoides en la muestra objeto de estudio por comparación con la literatura.

Figura 10. Cromatogramas y espectros correspondientes a la fracción EP12 1/8

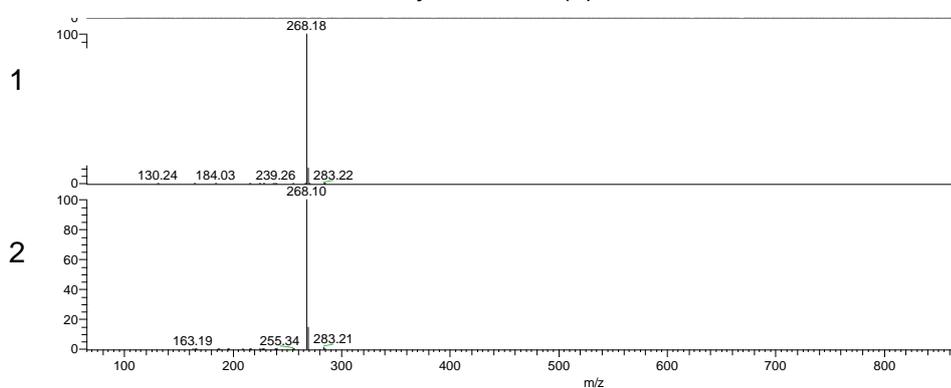


B. Espectros UV/VIS de los compuestos con tiempo de retención en 16,7 min (1) y 17,2 min (2)

Figura 10. (Continuación)



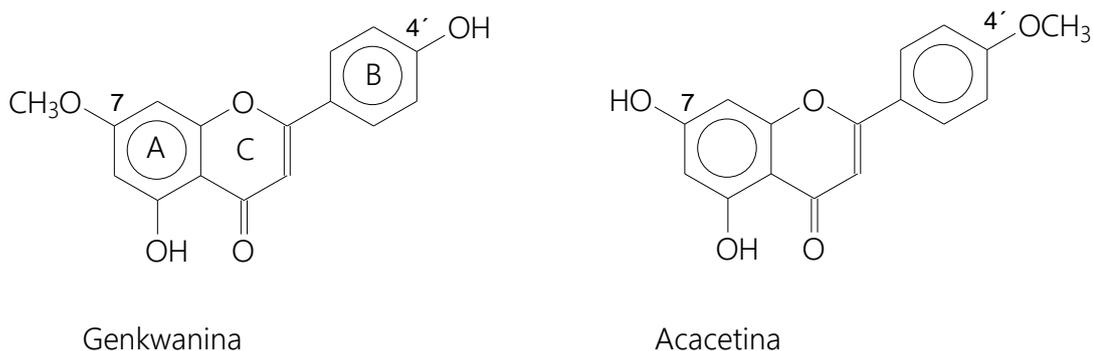
C. Espectros de masas de los compuestos con tiempo de retención en 16,7 min (1) y 17,2 min (2)



D. Espectros MS<sup>2</sup> de los compuestos con tiempo de retención en 16,7 min (1) y 17,2 min (2)

La fracción EP12 1/8 presentó dos picos con tiempo de retención en 16,7 y 17,2 min, respectivamente, cuyos [M-H]<sup>-</sup> en m/z 283 coinciden con lo esperado para dos flavonoides aislados de propóleos: Acacetina y Genkwanina. Según Cuesta et al. (2022) en las muestras de propóleos ecuatorianos EP17-19, la Genkwanina y la Acacetina fueron detectadas con tiempos de retención de 16,78 min y 16,27 min, respectivamente, usando condiciones cromatográficas similares. Ambas flavonas O-metiladas son isómeros constitucionales de posición, ya que comparten la misma fórmula molecular, pero difieren en la posición del grupo metoxilo. La Genkwanina posee un grupo metoxilo en el C-7 y la Acacetina en el C-4', según se muestra en la figura 11.

Figura 11. Estructura química de la Genkwanina y Acacetina

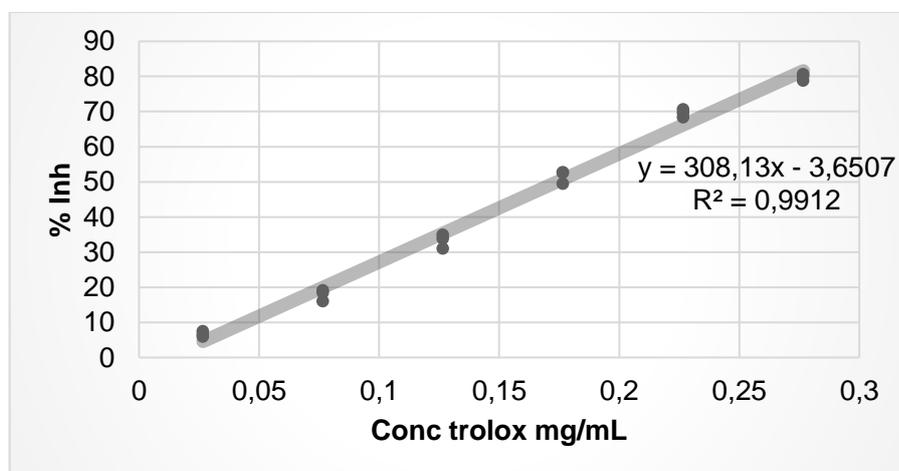


Ambos flavonoides muestran el ion fragmento  $m/z$  268 como pico base en su espectro EM2, originado por la pérdida de un grupo metilo. Este comportamiento no permite diferenciar ambos compuestos. Las flavonas pueden fragmentar a través de una ruptura tipo rDA, que permite diferenciar los sustituyentes del anillo A y B fácilmente. Sin embargo, en este caso se favorece la pérdida del grupo metilo y no la ruptura rDa, por lo tanto, no es posible diferenciarlos con la información disponible. Los espectros de masas y UV-Vis se muestran en la figura 10. Los espectros UV-Vis son compatibles con un núcleo de flavona ya que muestran máximos de absorción en 269 y 334 nm (Cuesta et al., 2015). Con la información disponible no es posible realizar una asignación inequívoca.

### 3.4 Capacidad antioxidante equivalente a Trolox por el método DPPH

La curva de calibración (figura 12) se realizó con el fin de expresar los resultados en equivalencia a Trolox.

Figura 12. Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox por el método del DPPH.



El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) obtenido a partir de la curva de calibración fue de 0,9912, lo que indicó que existe una buena relación entre la concentración de Trolox y el porcentaje de inhibición que se obtuvo.

Para el análisis de la capacidad antioxidante del extracto seco y sus fracciones se realizó el análisis de regresión lineal de la curva de calibración, dando como resultado la ec. (1), a partir de la cual se logró expresar el potencial antioxidante equivalente a Trolox por cada mL de extracto seco (en base al factor de dilución), como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox..

Muestra	Masa (mg)	$\bar{X}$ ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) $\pm$ S
EP12 1/1	15	0,084 $\pm$ 0,007
EP12 1/2	15	0,120 $\pm$ 0,005
EP12 1/3	18	0,125 $\pm$ 0,002
EP12 1/4	14	1,523 $\pm$ 0,057
EP12 1/5	16	1,434 $\pm$ 0,134
EP12 1/6	15	1,682 $\pm$ 0,066
EP12 1/7	17	0,979 $\pm$ 0,039
EP12 1/8	15	0,943 $\pm$ 0,075
EP12 1/9	15	2,042 $\pm$ 0,032
EP12 1/10	14	0,027 $\pm$ 0,001
ESP-EP12	16	0,609 $\pm$ 0,129

El ensayo mostró que la fracción EP12 1/9 posee mayor capacidad antioxidante equivalente a Trolox en comparación a las demás fracciones y al extracto seco total de la muestra EP12. Este resultado sugiere que esta fracción agrupa a los metabolitos con mayor capacidad de secuestrar al radical DPPH o que estos se encuentran en mayor concentración en la misma. Por lo tanto, el fraccionamiento del extracto favoreció la obtención de una fracción con mayor actividad, que podría emplearse para producir formulaciones farmacéuticas más eficaces. Por otro lado, la muestra de menor capacidad antioxidante fue la fracción EP12 1/10, la cual es una fracción que se obtuvo en forma de precipitado y tiene la característica de que es poco soluble en disolventes de alta polaridad como el metanol.

Resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado por Aguilar et al. (2021), en el cual se analizó la capacidad antioxidante de un extracto metanólico de hojas de *S. rufescens*, y sus fracciones obtenidas en cromatografía en columna de Sílica gel, donde usaron como disolventes: n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. En este

caso, la fracción metanólica fue la que mayor capacidad antioxidante presentó respecto a las otras fracciones y al extracto total. Esto se justifica en que los metabolitos activos con capacidad antioxidante eluyeron en esa fase móvil.

En lo que respecta a los propóleos ecuatorianos, en un trabajo experimental de Carrasco y Cepeda (2020) se analizan tres extractos secos de propóleos de diferentes zonas geográficas del país, mostrando resultados diferentes entre así. La muestra de Pichincha mostró una mayor capacidad antioxidante (60,49 TEAC/g) respecto a las muestras de Imbabura y Los Ríos (24,34; 24,78 TEAC/g, respectivamente). Comprobando la hipótesis de que la capacidad antioxidante del propóleos está ligada al origen geográfico del mismo.

#### **4. CONCLUSIONES**

- La aplicación de métodos cromatográficos permitió el fraccionamiento de la muestra de propóleos EP12.
- La muestra de propóleos EP12 exhibe una composición química diferente respecto a los principales tipos de propóleos conocidos y contiene un compuesto caracterizado por una cadena alifática larga y un residuo aromático.
- El extracto total y sus fracciones secuestran el radical DPPH, pero se observan diferencias entre ellas.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Continuar con la caracterización química de los componentes de la muestra EP12.
- Evaluar la capacidad antioxidante del extracto y sus fracciones mediante otros métodos como ABTS o FRAP.

## REFERENCIAS

- Adanero, F. (2017). *Caracterización de propóleos de Castilla y León*. [Tesis de Doctorado, Universidad de León]. <http://hdl.handle.net/10612/2273>
- Aguilar, F., Bonilla R., y Enciso, R. (2021). Capacidad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de *Senecio rufescens* DC. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 86(4), 374-385. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i4.309>
- Angulo, J. (2014). *Caracterización y actividad antioxidante de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de Chimborazo utilizados en la Empresa APICARE - Riobamba* [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio Institucional - Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Aranguena, E. (2019). *Evaluación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos del propóleo producido por abejas (apis mellifera) recolectado por los métodos de raspado y rejilla de plástico en las comunidades campesinas de Huinchos Pataccocha y Chiara – Provincia Andahuaylas*. [Tesis de grado, Universidad Nacional José María Arguedas]. Repositorio Institucional Universidad Nacional José María Arguedas <https://hdl.handle.net/20.500.14168/570>
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., Eberlin, M. N., I Falcão, S., Isla, M. I., Moreno, M. I. N., Papotti, G., Popova, M., Santiago, K. B., Salas, A., Sawaya, A. C. H. F., Schwab, N. V., Sforcin, J. M., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., ... Zampini, C. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1–49. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>
- Bankova, V., Popova, M., y Trusheva, B. (2018). The phytochemistry of the honeybee. *Phytochemistry*, 155, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.007>
- Benavidez, L. E. (2018). Actividad antioxidante del extracto de propóleos y su incorporación en una formulación cosmética. *Ciencia e Investigación*, 20(2), 4. <https://doi.org/10.15381/ci.v20i2.14803>
- Bracho Pérez, J. C., Rodríguez Best, C., y Llanes, F. (2009). Triterpenos pentacíclicos en propóleo. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 75(4), 439–450. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2009000400006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2009000400006&lng=es&tlng=es).

- Bucio, C., y Martínez, O. (2016). Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 225. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.24253>
- Campo Fernández, M., Cuesta Rubio, O., Márquez Hernández, I., Rosado Pérez, A., y Montes de Oca Porto, R. (2008). Análisis cualitativo de propóleos cubanos por cromatografía en capa delgada. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(3), 380 - 386. [http://www.latamjpharm.org/trabajos/27/3/LAJOP\\_27\\_3\\_1\\_11\\_719RL7788H.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/27/3/LAJOP_27_3_1_11_719RL7788H.pdf)
- Campo, M. (2007). *Estudio Químico de Propóleos Rojos Cubanos* [Tesis de doctorado, Universidad de la Habana]. [http://tesis.sld.cu/FileStorage/000313-6564-Campo\\_Fernandez.pdf](http://tesis.sld.cu/FileStorage/000313-6564-Campo_Fernandez.pdf)
- Carrasco, L., y Cepeda, N. (2020). *Caracterización química y actividad antioxidante de tres muestras de propóleos ecuatorianos*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Machala]. Repositorio Institucional - Universidad Técnica de Machala [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/16269/1/T-3902\\_CARRASCO%20MAXI%20LESLIE%20MALENI.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/16269/1/T-3902_CARRASCO%20MAXI%20LESLIE%20MALENI.pdf)
- Castro, L. (2006). *Producción y evaluación de la velocidad de oxidación de propóleos de Apis mellifera con tres tipos de colectores y de tres pisos altitudinales en Pichanaki – Chanchamayo*. [Tesis de grado, Universidad Nacional del Centro del Perú]. <https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/2891/Castro%20Duran.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Checalla Collatupa, J. y Sánchez Tito, M. (2021). Caracterización Química y Actividad Antibacteriana in vitro de un Extracto Etanólico de Propóleo Peruano Frente a *Streptococcus mutans*. *International Journal of Odontostomatology*, 15(1), 145-151. <https://doi.org/10.4067/s0718-381x2021000100145>
- Chilán, M., y Consuegra, J. (2020). *Determinación de capacidad antioxidante de propóleo obtenido mediante dos métodos de extracción*. [Tesis de grado, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/50968/1/BCIEQ-T-0550%20Chil%C3%A1n%20Le%C3%B3n%20Mirian%20Estefan%C3%ADa%3B%20Consuegra%20Coello%20Jennifer.pdf>
- Corzo, A. (2019). *Técnicas de análisis en química orgánica: cromatografía*. Universidad Nacional de Santiago del Estero. <https://fcf.unse.edu.ar/archivos/series-didacticas/SD-44-Cromatografia-CORZO.pdf>
- CSIC. (2014). *Espectroscopía UV Vis-NIR*. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica. [https://icp.csic.es/archivos/uapoyo/2020/Descripcion%20UV-Vis\\_02.pdf](https://icp.csic.es/archivos/uapoyo/2020/Descripcion%20UV-Vis_02.pdf)

- Cubas, J. M., Guadalupe, R., Pimentel, C., Enrique, I., Merlín, M., San, E., y Martínez, M. (2018). La espectroscopía UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama. *Latin-American Journal of Physics Education*, 12(2).
- Cuesta, O., Campo, M., & Márquez, I. (2015). *Introducción a la caracterización estructural de flavonoides* (1.<sup>a</sup> ed.). Universidad Técnica de Machala.
- Cuesta-Rubio, O., Campo Fernández, M., Márquez Hernández, I., Jaramillo, C. G. J., González, V. H., Montes De Oca Porto, R., Marrero Delange, D., Monzote Fidalgo, L., Piccinelli, A. L., Campone, L., y Rastrelli, L. (2017). Chemical profile and anti-leishmanial activity of three Ecuadorian propolis samples from Quito, Guayaquil and Cotacachi regions. *Phytotherapy*, 120, 177–183.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.06.016>
- Cuesta-Rubio, O., Hernández, I. M., Fernández, M. C., Rodríguez-Delgado, I., De Oca Porto, R. M., Piccinelli, A. L., Celano, R., & Rastrelli, L. (2022). Chemical characterization and antioxidant potential of ecuadorian propolis. *Phytochemistry*, 203, 113415. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113415>.
- De La Fuente, E. (2006). *Avances metodológicos para la determinación de componentes de la miel mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa* [Tesis de grado, Universidad Autónoma de Madrid]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=2316>
- De la Rosa, L. A., Álvarez-Parrilla, E., & García-Fajardo, J. A. (2019). Identificación de compuestos fenólicos en extractos de almendra (*Prunus dulcis*) y nuez pecana (*Carya illinoensis*) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 22. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.179>
- De Oliveira Ramos Melo, N., De Sousa Peres Júnior, H., Araujo Diniz, C., De Sousa Silva, M., Gomes de Lemos, T. L., Fachine Jamaru, F. V., y Dornelas, C. A. (2022). Red propolis reduces inflammation in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Biomédica*, 42(2), 253–263. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6087>
- Delgado Aceves, M. D. L., Andrade Ortega, J. Á., y Ramírez Barragán, C. A. (2015). Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 75–87.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11322015000200006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000200006&lng=es&tlng=es).

- Forseth, R., y Schroeder, F. (2011). NMR-spectroscopic analysis of mixtures: from structure to function. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(1), 38–47.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.010>
- Gallignani, M., Torres, M., Ayala, C., y Brunetto, M. del R. (2008). Determinación de cafeína en café mediante espectrometría infrarroja de transformada de Fourier. *Revista Técnica de La Facultad de Ingeniería Universidad Del Zulia*, 31(2), 159–168.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0254-07702008000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702008000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Grosso, G. S. (2017). Propóleos. Origen y naturaleza en Universidad de Tolima, *Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo*. (1 ed., pp. 43–65). <https://repository.ut.edu.co/bitstreams/d519093b-b89e-419d-9fd6-ad1096e66929/download>
- Gruszycki, M. R., Valenzuela, G. M., Báez, M., Leguiza, P. D., Gruszycki, A. E., y Alba, D. A. (2019). Evaluación de la actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de *Portulaca oleracea* L. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(2).  
<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n2.82720>
- Guanche, D. (2022). Evaluación de diferentes extractos de propóleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 53(3), 243–251. <http://scielo.sld.cu/pdf/rccb/v53n3/2221-2450-rccb-53-03-243.pdf>
- Guaraca, A., y Palomino, D. (2018). *Estudio de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica* [Tesis de maestría, Universidad Politécnica Salesiana].  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15371/1/UPS-CT007559.pdf>
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M., Ponce-Pardo, J., y Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico (Lima)*, 15(1).  
<https://doi.org/10.24265/horizmed.2015.v15n1.08>
- Hesse, M., Meier, H., y Zeeh, B. (1997). *Métodos espectroscópicos en química orgánica* (2.<sup>a</sup> ed.). Síntesis.
- Hossain, R., Quispe, C., Khan, R. A., Saikat, A. S. M., Ray, P., Ongalbek, D., Yeskaliyeva, B., Jain, D., Smeriglio, A., Trombetta, D., Kiani, R., Kobarfard, F., Mojgani, N., Saffarian, P., Ayatollahi, S. A., Sarkar, C., Islam, M. T., Keriman, D., Uçar, A., ... Cho, W. C. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications.

- Chinese Medicine (United Kingdom)*, 17(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00651-2>
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., & Marston, A. (1986). *Preparative chromatography techniques. Applications in Natural Product Isolation*. Springer.
- Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barcauskaite, K., Kubilius, R., Kasparaviciene, G., y Savickas, A. (2015). Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0677-5>
- Kwan, E. E., & Huang, S. G. (2008). Structural Elucidation with NMR Spectroscopy: Practical Strategies for Organic Chemists. *European Journal of Organic Chemistry*, 2008(16), 2671–2688. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200700966>
- Laurella, S. L. (2017). Resonancia magnética nuclear. *Resonancia magnética nuclear*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/62803>
- León Méndez, G., Osorio Fortich, M. del R., y Useche, E. S. R. M. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(4), 742–750. <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v49n4/far14415.pdf>
- Martínez-Pizarro, S. (2020). Effects of Propolis in Periodontitis. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, 23, 27–29. <https://doi.org/10.15517/ijds.2020.42416>
- Melliou, E., Stratis, E., & Chinou, I. (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 103(2), 375–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.033>
- Morais, S. M., Silva, K. A., Araujo, H., Vieira, I. G. P., Alves, D. R., Fontenelle, R. O. S., & Silva, A. M. S. (2017). Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. *Pharmaceuticals*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/ph10010031>
- Muñoz Rodríguez, L., Linares Villalba, S., & Narváez Solarte, W. (2011). Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Biosalud*, 10(2), 101–111. <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/biosalud/article/view/4744/4329>
- Núñez R., D., Balboa P., N., Alvear Z., M., Ceron N., A., Abarzua S., K., & Vasconcellos C., A. (2018). Evaluación de la actividad antiinflamatoria de propóleos chileno sobre cortes

- histológicos de orejas de ratón. *International Journal of Morphology*, 36(1), 192.  
<https://doi.org/10.4067/S0717-95022018000100189>
- Padrón González, A., Domínguez, A., Naranjo, A., Díaz Gallardo, J. J., & Llera Almenteros, R. E. (2012). El propóleo una alternativa de todos los tiempos. *Universidad Médica Pinareña*, 8(1). <https://www.redalyc.org/pdf/6382/638267067004.pdf>
- Palomino G, L. R., García P, C. M., Gil G, J. H., Rojano, B. A., & Durango R, D. L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3), 388-395. <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n3/v16n3a13.pdf>
- Papotti, G., Bertelli, D., Plessi, M., & Rossi, M. C. (2010). Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(8), 1610–1618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02310.x>
- Peña, Raúl C. (2008). Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e investigación agraria*, 35(1), 17-26. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202008000100002>
- Plana, R., & Perurena, M. (2011). Tratamiento de la estomatitis subprótesis en atletas y exatletas con propomiel y nistatina. Segunda parte. *Revista Cubana de Medicina Del Deporte y La Cultura Física*, 6(3), 6.  
<https://revmedep.sld.cu/index.php/medep/article/view/288/304>
- Popova, M., Dimitrova, R., Al-Lawati, H. T., Tsvetkova, I., Najdenski, H., & Bankova, V. (2013). Omani propolis: Chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. *Chemistry Central Journal*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-158>
- Portela, M., Ruíz, S., Morán, E., Chaidez, C., & Silva, N. (2022). Composición fenólica, actividad antihemolítica, antiinflamatoria y antibacteriana de propóleos del sur de Sonora. *Biotecnia*, 24(3), 82–83.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i3.1746>
- Quiñones, J. (2020). *Biocompatibilidad de medicaciones intraconducto* [Tesis de Posgrado, Universidad Autónoma de Sinaloa].  
[https://odontologia.uas.edu.mx/posgradoendodoncia/PDF/gen1719/JUDITH\\_QUINON\\_EZ\\_CARRILLO.pdf](https://odontologia.uas.edu.mx/posgradoendodoncia/PDF/gen1719/JUDITH_QUINON_EZ_CARRILLO.pdf)
- Revilla, E. (2021). Especies reactivas de oxígeno, importancia e implicación patológica. *Revista Científica Ciencia Médica*, 24(2), 125-132.  
<https://doi.org/10.51581/rccm.v24i2.401>

- Ringuelet, J., & Viña, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales* (1st ed., Vol. 1). Editorial de la Universidad de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/27885>
- Rodríguez, J., Delgado, F., De Velazco, P., Navarro, E., Madrigal, E., Robles, V., & Martín del Campo, J. (2014). La utilidad del propóleo en las ciencias de la salud. *Lux Médica*, 26(9). <https://revistas.uaa.mx/index.php/luxmedica/article/view/855>
- Rodríguez Pérez, B., Canales Martínez, M. M., Penieres Carrillo, J. G., & Cruz Sánchez, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, 30, 1–30. <https://doi.org/10.15174/au.2020.2435>
- Rodríguez, Y., Sánchez Catalán, F., Rojano, B., Durango, D., Gil, J., & Marín Loaiza, J. (2012). Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), 303–311. <https://doi.org/10.31910/rudca.v15.n2.2012.828>
- Romero, A., Escalada, J. P., Bregliani, M., & Pajares, A. (2016). Utilización de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para determinar consumo de sustrato. *Informes Científicos Técnicos - UNPA*, 8(2), 52–59. <https://doi.org/10.22305/ict-unpa.v8i2.172>
- Salleh, S. N. A. S., Hanapiah, N. A. M., Johari, W. L. W., Ahmad, H., & Osman, N. H. (2021). Analysis of bioactive compounds and chemical composition of Malaysian stingless bee propolis water extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.049>
- Samaniego, J., Huerta, J., Inocente, M., Obregón, J., & López, M. (2021). Validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 87(2), 180–191. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v87i2.338>
- Samara, N., Benitez, N., & Cabezas, F. (2011). Actividad antibacteriana y composición cualitativa de Propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del cauca. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(enero-junio), 9. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v9n1/v9n1a02.pdf>
- Serrano, J. (2000). Actividad antitumoral del Propóleo y sus derivados. *Natura Medicatrix*, 56, 40–41. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4988987>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>

- Sotolongo, L. (2021). Optimización de la tecnología de elaboración de la tintura de propóleo de los centros de producción local de villa clara. *49(3)*, 69–77.  
[http://centroazucar.uclv.edu.cu/index.php/centro\\_azucar/article/view/715/813](http://centroazucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/715/813)
- Šturm, L., & Ulrih, N. P. (2020). Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: A Review. *EFood*, *1(1)*. <https://doi.org/10.2991/efood.k.191029.001>
- Suarez, M., Rosende, R., & Finten de Tarallo, S. (2013). Propiedades del Propóleo y su relación con la salud y la práctica odontológica. *Revista de La Facultad de Odontología*, *6(1)*, 21–24. <https://doi.org/10.30972/rfo.611684>
- Suarez Ospina, D., & Morales Hernández, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *América Revista Semilleros: Formación Investigativa*, *4(1)*, 7–14.  
<https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7731>
- Torres, A. (2017). *Revisión bibliográfica: mecanismos moleculares reportados asociados a la acción antitumoral del propóleos*. Universidad de Talca.  
[http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/11616/2/torres\\_conejera.pdf](http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/11616/2/torres_conejera.pdf)
- Vallejo, Y., Barrios, L., & Anaya, J. (2021). La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista de Química PUCP*, *35(2)*, 19–25.  
<https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/23788>
- Vargas, J., Camacho, M., & Ramirez, D. (2013). Efectos de los nutrientes y compuestos bioactivos de los alimentos en tejidos y células de cáncer humano: aproximación nutrigenómica. *Revista Facultad de Medicina*, *61(3)*, 295–297.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-00112013000300009&lng=en&tling=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112013000300009&lng=en&tling=es).
- Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Acedo-Félix, E., Carvajal-Millán, E., González-Córdova, A. F., Vallejo-Galland, B., Torres-Llanez, M. J., & Sánchez-Escalante, A. (2014). Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties. *Journal of Food Science*, *79(8)*, 503–504.  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12533>
- Vega, C., & Ramón, J. (2007). Determinación por cromatografía Lícrquida (HPLC) el contenido de ácido fólico y hierro en una bebida láctea fermentada tipo yogurt enriquecida a partir de materias primas naturales. *Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, *5(2)*, 42–48. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90350204>
- Velazquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Robles, R., Lugo, E., Goycoolea, F., Velazquez, E., Astiazaran, H., & Hernandez, J. (2007).

Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1750. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03409.x>

Verdugo, M., & Tola, B. (2017). *Estudio de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica* [Tesis de Maestría, Universidad Politécnica Salesiana].

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14947/1/UPS-CT007371.pdf>

Volpi, N., & Bergonzini, G. (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42(3). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.017>

Zamora, F. (2017). *Estandarización de la metodología de cromatografía de columna para el aislamiento de metabolitos activos a partir de extractos vegetales* [Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/27901>