

## Composición fenólica, actividad antihemolítica, antiinflamatoria y antibacteriana de propóleos del sur de Sonora

Phenolic compounds, antihemolytic, anti-inflammatory and antibacterial activity of propolis from southern Sonora

Portela-Márquez MA<sup>1</sup>, Ruiz Cruz S<sup>2</sup>, Morán-Palacio EF<sup>3</sup>, Chaidez-Quiroz C<sup>4</sup>, Silva-Beltrán NP<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Col. Centro, 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México.

<sup>2</sup> Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, 83000, Hermosillo, Sonora, México.

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuaria, Universidad de Sonora, Lázaro Cárdenas del Río 100, Francisco Villa, 85880, Navojoa, Sonora, México.

<sup>4</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera El Dorado Km 5.5, Campo el Diez, 80110, Culiacán, Sinaloa, México.

<sup>5</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Blvd. Bordo Nuevo S/N, Ejido Providencia, 85199, Cajeme, Sonora, México.

### ABSTRACT

Propolis is a resin made by *Apis mellifera* bees from vegetation exudates. Biological properties have been documented. This study evaluated the antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activity of ethanolic extracts from southern Sonora, Mexico propolis. The concentration of total phenols and flavonoids was measured. Antioxidant activity was measured and antihemolytic and anti-inflammatory activity of human erythrocytes was determined. In addition, the activity against *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* bacteria was evaluated. The ethanolic extracts presented concentrations of 16.36 ± 1.93 mg EAG/gPS and 42.96 mg EQ/gPS of phenols and flavonoids, respectively. The DPPH and ABTS radicals showed values of 75.65 ± 3.76 and 29.61 ± 0.01 mg ET/gPS respectively, the extracts protected up to 49.56% from hemolysis and prevent cell inflammation up to 49%. They also presented antibacterial activity against all the strains evaluated, showing inhibition halos of 8 to 11.3 mm and MIC of 1 and 2 mg of extract/mL. The results are the basis for the study of natural formulations with propolis from southern Sonora.

**Key words:** Propolis, antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory.

### RESUMEN

El propóleo es una resina que elaboran las abejas *Apis mellifera* a partir de los exudados de la vegetación. Las propiedades biológicas han sido documentadas. Este estudio evaluó la composición química, actividad antioxidante (con radicales DPPH y ABTS), actividad antihemolítica, antiinflamatoria (sobre eritrocitos humanos) y antibacteriana en *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* en extractos etanólicos de propóleos de sur de Sonora, México. La composición química fue de 16.36 ± 1.93 mg EAG/PS y 42.96 mg EQ/PS de fenoles y flavonoides, respectivamente. Los radicales DPPH y ABTS mostraron valores de 75.65 ± 3.76 y 29.61 ± 0.01 mg ET/

\*Autor para correspondencia: Norma Patricia Silva Beltrán  
 Correo electrónico: norma.silva@unison.mx

Recibido: 27 de abril de 2022

Aceptado: 19 de julio de 2022

gPS respectivamente. Los extractos protegieron hasta en un 49.56 % de la hemólisis por el radical y previnieron la inflamación por arriba del 49 %. Todos los extractos de propóleos mostraron actividad antibacteriana con halos de inhibición de 8 a 11.3 mm y CMI de 1 y 2 mg de extracto/mL. Los resultados obtenidos son la base para el estudio de formulaciones naturales con propóleos del sur de Sonora.

**Palabras clave:** Propóleo, antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio

### INTRODUCCIÓN

El propóleo es una resina elaborada por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de exudados de la vegetación circundante de la colmena, el cual es utilizado con fines desinfectantes y de eliminación de invasores que pueden estar dentro de la misma (Bankova, 2005). Gracias a la protección que genera el propóleo en las colmenas, se mantienen condiciones óptimas de humedad, temperatura y otros factores que garantizan la asepsia, de esta manera se evita la proliferación de microorganismos como bacterias, hongos o virus (Palomino *et al.*, 2010). En los últimos años se han documentado las propiedades beneficiosas del propóleo destacándose la gran actividad antimicrobiana, antiviral, anestésica, antiinflamatoria, anticancerígena y antioxidante (Rivero y Martínez, 2015). En ese sentido los extractos elaborados a base de propóleo se han venido utilizado en el área alimenticia o farmacológica.

Los extractos de propóleo (acuosos, etanólicos o supercríticos) contienen sustancias activas como flavonoides y polifenoles, a dichos compuestos se les ha atribuido actividad farmacológica (Silva *et al.*, 2012). Además, se han demostrado en numerosas investigaciones la complejidad de su composición química, reportándose más de 300 compuestos tales como terpenoides, esteroides, aminoácidos o polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres) (Mello y Hubinger, 2012). Los flavonoides son ácidos aromáticos diterpenoides y junto con los compuestos fenólicos forman los principales constituyentes químicos responsables de las propiedades biológicas del propóleo (Siripatrawan

*et al.*, 2013). Estudios previos en propóleos mexicanos han reportado la presencia de compuestos activos tales como flavonoides, principalmente pinocembrina, pinobanksina y crisina (Hernández *et al.*, 2007), también se han detectado propiedades antibacterianas contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, y *Staphylococcus aureus*, atribuyéndose esta propiedad biológica a las flavonas presentes en el extracto (Londono *et al.*, 2010; Carrillo *et al.*, 2011). En el estado de Sonora, se han realizado estudios similares, los resultados muestran la identificación y cuantificación de compuestos activos, además de las diversas actividades biológicas de los propóleos, como la actividad antiproliferativa en extractos metanólicos (Li *et al.*, 2010). También se ha observado que las estaciones del año influyen en la actividad biológica de los mismos (Valencia *et al.*, 2012) y que la composición depende de la región donde se recolecta puesto que sus características están relacionadas por factores botánicos, geográficos y por el clima (Mello y Hubinger, 2012). Debido a esto existe una relación estrecha de la composición química del propóleo con la flora disponible para que las abejas produzcan el propóleo (Aguilar *et al.*, 2019).

Los conocimientos que se tienen actualmente sobre la composición del propóleo y sus propiedades biológicas en México son limitados. En la literatura consultada, no se encuentra reporte alguno sobre otras actividades biológicas de propóleos con actividad y antiinflamatoria utilizando células sanguíneas o algún estudio antioxidante donde se evalúe la capacidad protectora del eritrocito humano de propóleos en el sur de Sonora. En ese contexto el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana presente en los extractos etanólicos de propóleos obtenidos del sur de Sonora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de recolección de los propóleos

Las muestras de propóleo de abejas (*Apis mellifera*) fueron obtenidas en bruto de apiarios y se muestreó de acuerdo con SAGARPA, (2017). La ubicación de los apiarios se muestra en la Tabla 1 y el periodo de recolección fue de octubre de 2019 a enero de 2020. Las muestras se almacenaron en bolsas herméticas y se trasladaron al Laboratorio de Tecnologías Emergentes e Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación e Innovación Biotecnológica, Agropecuaria y Ambiental (CIIBAA) en el Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) unidad centro de Cd. Obregón Sonora, en donde se fraccionaron en trozos de 2 cm aproximadamente y se colocaron en refrigeración a -20 °C para su posterior análisis. Las claves con las que se identificaron las muestras obtenidas de los diversos apiarios del sur de Sonora México, así como su origen se muestra en la Tabla 1, así mismo, en la Figura 1 se observa en dónde se localizan dichas poblaciones.

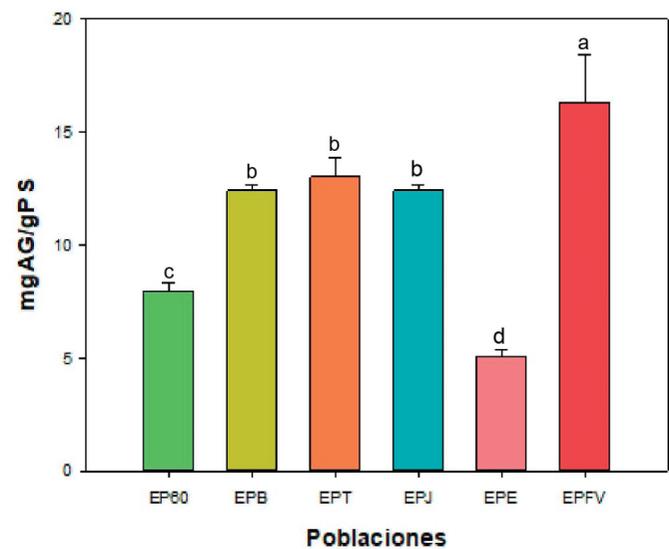
### Preparación del extracto etanólico de propóleo

La preparación del extracto etanólico se realizó según la NOM-003 (2017). Se pesaron 50 g de los propóleos en bruto previamente triturado con una licuadora convencional hasta

**Tabla 1.** Ubicación de los apiarios donde fue obtenido el propóleo sonorense.

**Table 1.** Location of the apiaries where Sonoran propolis was obtained.

POBLACIÓN	COORDENADAS	CLAVE
Ejido Francisco Javier Mina (Campo 60)	(27°27'43"N) (110°6'53"W)	EP60
Bácum	(27°30'40"N) (110°6'32"W)	EPB
Tinajera	(27°33'16"N) (110°00'47"W)	EPLT
Jusibampo	(27°19'N) (111°16'W)	EPJ
Etchojoa	(27°0'12"N) (109°35'0.2"W)	EPE
Ejido Francisco Villa	(27°29'0.9"N) (110°03'24"W)	EPFV



**Figura 1.** Contenido de fenoles totales en extractos etanólicos de propóleos de diversas poblaciones del sur de Sonora. Media ± desviación estándar (n=3).

**Figure 1.** Total phenol content in ethanolic extracts of propolis from different populations in southern Sonora. Mean ± standard deviation (n=3).

obtener un polvo. Posteriormente, se añadió el pulverizado obtenido a etanol al 70% en una relación muestra: disolvente 1:3 y se colocó en baño ultrasónico durante 20 min a temperatura ambiente. Seguido de esto se filtró al vacío con papel Whatman No. 1. Por último, se concentró el extracto mediante evaporación rotativa a 45 °C (Buchi Heating Bath B-490, Buchi Rotavapor R-200) (Sultana *et al.*, 2009). El extracto fue almacenado a -20 °C en ausencia de luz para su posterior análisis.

### Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se cuantificó mediante el método descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se colocaron 150 µL del reactivo Folin-Ciocalteu en una microplaca de 96 pocillos con 30 µL de extracto y 120 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se dejó reposar 30 min en completa oscuridad y se leyó a una absorbancia de 750 nm en lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan™ Sky). La concentración de fenoles totales se calculó utilizando una curva estándar de ácido gálico y los resultados se expresaron

como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG/PS).

### Determinación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó de acuerdo con el método descrito por Chen *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Primero se tomó 100  $\mu$ L del extracto y se mezcló con 430  $\mu$ L de  $\text{NaNO}_2$  al 5 %, seguido de una incubación por 5 min. Pasado el tiempo se adicionaron 30  $\mu$ L de  $\text{AlCl}_3$  al 10 % y 440  $\mu$ L de  $\text{NaOH}$  (1 M). Se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de microplaca (Thermo Scientific MultiskanTM Sky). Se realizó una curva estándar de quercetina y los resultados se expresaron como mg EQ/PS.

### Determinación de la actividad antioxidante de los propóleos

#### Inhibición del radical DPPH (2,2 - difenil-1-picrilhidracil)

Se midió la capacidad antioxidante de los extractos para inhibir el radical DPPH según Moein y Moein (2010), con algunas modificaciones. Se tomaron 280  $\mu$ L de la solución del radical DPPH (0.025 mg/mL en etanol) y se mezcló con 20  $\mu$ L del extracto. La reacción se dejó reposar por 30 min en completa oscuridad y se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific MultiskanTM Sky). La actividad antioxidante se calculó usando una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como  $\mu$ mol Equivalente Trolox/g de peso seco ( $\mu$ mol ET/PS).

#### Inhibición del radical ABTS (2,2' - azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

Se determinó de acuerdo con la técnica descrita por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. El radical ABTS se preparó al mezclar 19 mg en 5 mL de agua destilada. Por otro lado, se preparó una solución de persulfato de potasio (37.8 mg/mL en agua destilada). Se tomaron 88  $\mu$ L del radical ABTS preparado y se le añadió a la solución de persulfato de potasio, dicha mezcla se dejó reposar por 12 - 16 h a temperatura ambiente. De esta solución incubada se tomó 500  $\mu$ L y se diluyó en 30 mL de etanol para posteriormente ajustar la absorbancia a  $0.7 \pm 0.02$  en lector de microplacas a 750 nm. Finalmente se colocaron 295  $\mu$ L de radical y 5  $\mu$ L del extracto. La actividad antioxidante se calculó usando una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como  $\mu$ mol eq. Trolox/g de peso seco ( $\mu$ mol ET/PS).

### Capacidad protectora del eritrocito humano

La hemólisis fue inducida por el radical AAPH (2-2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride) de acuerdo con la metodología de Son (2016). Los eritrocitos fueron lavados en 3 tiempos con buffer salino (PBS) a pH de 7.4. Una vez lavados se preparó una suspensión de eritrocitos humanos al 5 % en PBS. Para el ensayo se colocaron en un tubo Eppendorf 50  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos, 50  $\mu$ L del extracto a evaluar y 200  $\mu$ L del radical AAPH, se mezcló e incubó a 37 °C en baño María con agitación (30 rpm) durante 3 h. Una mezcla de reacción similar se preparó sin extracto

como control (hemólisis completa). Terminada la incubación se agregó 1 mL de PBS, se centrifugó a 3500 rpm por 10 min y se midió la absorbancia en un lector de microplacas (Thermo Scientific MultiskanTM Sky) a 540 nm. El resultado se expresó en porcentaje de inhibición, mediante la fórmula:

### Actividad antiinflamatoria

#### Estabilidad de la membrana del eritrocito por calor

El ensayo de la estabilidad de la membrana del eritrocito frente al calor se realizó según Sakat *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Se realizaron dos lavados de eritrocitos colocando 1 mL de sangre y 3 mL de solución salina, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante. Enseguida con los eritrocitos lavados se preparó una solución de eritrocitos, se tomaron 500  $\mu$ L de la solución en 5 mL de solución salina para obtener una solución de eritrocitos al 5 %. Para el ensayo, en microtubos se colocaron 100  $\mu$ L de eritrocitos y 100  $\mu$ L de extracto, se calentó en baño María a 56 °C por 30 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 1 mL de solución salina, se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min y se leyó a una absorbancia de 560 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific MultiskanTM Sky).

#### Estabilidad de la membrana del eritrocito mediante la prueba de hipotonicidad

Para la estabilidad de la membrana del eritrocito mediante un medio hipotónico se realizará según Niraimathi *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Se preparó de igual manera que el ensayo de calor una solución de eritrocitos al 5%. El ensayo se realizó de la siguiente manera: Se colocó 200  $\mu$ L de extracto en 100  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos y se adicionó 500  $\mu$ L de solución hipotónica (agua destilada). Se incubó a 37 °C durante 30 min y se colocó 200  $\mu$ L de solución salina. Posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm por 10 min y se tomó el sobrenadante para leer a una absorbancia de 560 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific MultiskanTM Sky).

### Evaluación de la capacidad antibacteriana

#### Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Los microorganismos se obtuvieron del Laboratorio de Tecnologías Emergentes e Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación e Innovación en Biotecnología, Agropecuaria y Ambiental (CIIBAA) de ITSON. *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC 43890), *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus* (ATCC 65384), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

### Ensayos microbiológicos

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la observación de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano descrito por Andrews (2001). En placas de agar Müller Hinton se inocularon con 100  $\mu$ L de suspensión bacteriana la cual se homogenizó mediante perlas de vidrio estériles, se colocó 40  $\mu$ L de extracto correspondiente en discos estériles de papel filtro (5 mm de diámetro, Whatman N° 1). Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h para su observación.

### Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos que presenten actividad antibacteriana se determinó mediante la técnica de dilución en caldo MuelleHinton. A cada tubo se le agregó 2 mg del extracto a evaluar en 1 mL de caldo Mueller-Hinton. Por último, se agregó 100  $\mu$ L de inóculo en una concentración  $10^8$  UFC/mL, se incubó a 37 °C por 24 h. Se determinó la turbidez de cada tubo, siendo el de menor concentración y sin turbidez el que contiene la CMI (Gil *et al.*, 2008).

### Análisis Estadístico

La evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos se realizó a través de experimentos independientes para cada tipo de extracto y de las especies microbianas estudiadas. El diseño estadístico fue asignado completamente al azar con tres repeticiones. En el análisis de los distintos tratamientos se asumió ( $P < 0.05$ ). Se utilizó el paquete estadístico Stat Graphics versión 15.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Fenoles totales

Evaluar el contenido de fenoles y flavonoides totales en los propóleos es uno de los parámetros más importantes ya que de esta manera ayuda a establecer la calidad del material, así como su potencial biológico principalmente para la actividad antioxidante que puede representar (Rodríguez *et al.*, 2012). En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos de las diferentes muestras analizadas, donde se obtuvieron valores que van de  $5.06 \pm 0.289$  a  $16.30 \pm 1.93$  mgEAG/g PS. Se puede observar que en el extracto de propóleo del Ejido Francisco Villa presentó el valor más alto ( $p < 0.05$ ), seguido del extracto de EPT, EPB y EPJ, los cuales no presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). La menor cantidad de fenoles totales se observó en el extracto EPE el cual tuvo una diferencia significativa por debajo de las muestras mencionadas anteriormente. Esta variación puede deberse a la vegetación que rodea los apiarios situados en los diferentes sitios muestreados, ya que se ha demostrado la influencia que tiene la región donde las abejas toman el propóleo sobre los compuestos biológicos (Banskota *et al.*, 2001). Sulaeman *et al.* (2019), utilizaron el mismo proceso de extracción que en este estudio (etanol 75 %) y obtuvieron valores semejantes reportando concentraciones de 10 mg EAG/gPs en los propóleos de Indonesia.

Por otro lado, otros estudios han reportado valores superiores a los encontrados en nuestra investigación, inclusive los propóleos evaluados en México. Esta diferencia posiblemente se deba a los solventes utilizados y métodos de extracción (Bucio y Martínez, 2017; Valencia *et al.*, 2012); así como, a los diversos ecosistemas del país, los cuales son influyentes en la calidad del propóleo. Las muestras evaluadas en nuestro estudio provienen del sur de Sonora, el cual se compone de zonas áridas y semiáridas contrario a las zonas boscosas y selváticas del sur del país quienes han reportado valores superiores (Delgado *et al.*, 2015; Socha *et al.*, 2015; Sulaeman

*et al.*, 2019). Estudios previos de propóleos en Sonora han reportado la presencia de polifenoles en concentraciones de 427.9 a 601.8 mg equivalente de pinoembrina-galangina/g extracto, en dicho estudio también han demostrado variaciones en el contenido fenólico en el mismo estado de Sonora México, y que ese contenido también varía en las diferentes estaciones del año (Valencia *et al.*, 2012).

### Flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides en los extractos etanólicos de propóleos, así como de los polifenoles totales, son considerados como un parámetro de calidad según la NOM-003 (SAGARPA, 2017). Se ha documentado que la concentración de los polifenoles depende del origen de la muestra y la actividad biológica se confiere a los flavonoides, por lo que hay una relación flavonoide-efecto biológico, clasificándose para el propóleo como producto bioactivo (Rivero y Martínez, 2015). En la presente investigación se demostró la presencia de flavonoides totales. La Figura 2 muestra el contenido de flavonoides totales presentes en las diversas muestras evaluadas de propóleo y se puede observar que el extracto EPFV presentó la mayor concentración de estas biomoléculas con un valor de  $42.96 \pm 1.74$  mg EQ/g PS ( $p < 0.05$ ). Por el contrario, el extracto EPE mostró la menor cantidad de flavonoides totales ( $2.11 \pm 1.13$  mg EQ/g PS). Lo anterior demuestra alta variabilidad de resultados dependiente del origen de recolección. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos en los extractos de propóleo de Indonesia y Polonia con valores (0.76 - 3.39 mg/g QE), dichos estudios utilizaron el mismo solvente de extracción (Sulaeman *et al.*, 2019).

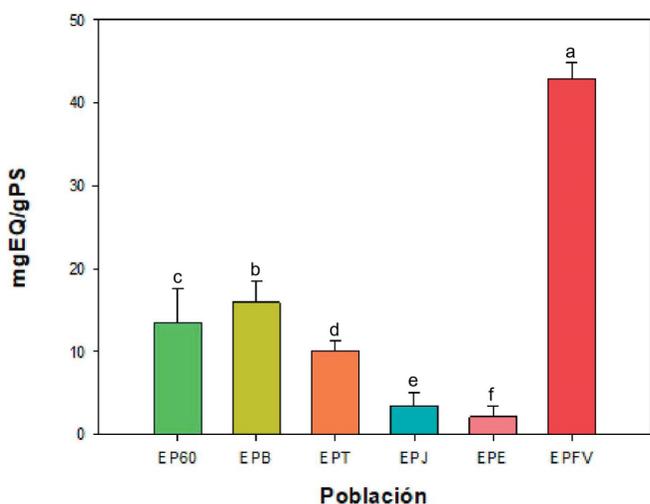
En otros estudios realizados en Jalisco, México se ha demostrado también la presencia de estos compuestos en donde se han reportado valores de 130 mg EQ/g mayores que los del presente estudio, sin embargo, son propóleos de regiones donde abunda la vegetación por sus climas húmedos (Delgado *et al.*, 2015). Por otra parte, se encontró un estudio reciente en donde se muestrearon propóleos de 11 zonas del sur de México quienes reportaron concentraciones de flavonoides que oscilaban entre los 0.04 y 4.04 %. En este estudio los métodos realizados fueron según la NOM-003-SAG/GAN-2017 (Rodríguez *et al.*, 2020), estos estudios demuestran también la presencia de flavonoides en los propóleos mexicanos.

### Actividad antioxidante

#### Inhibición del radical DPPH (2,2 - difenil-1-picrilhidracil).

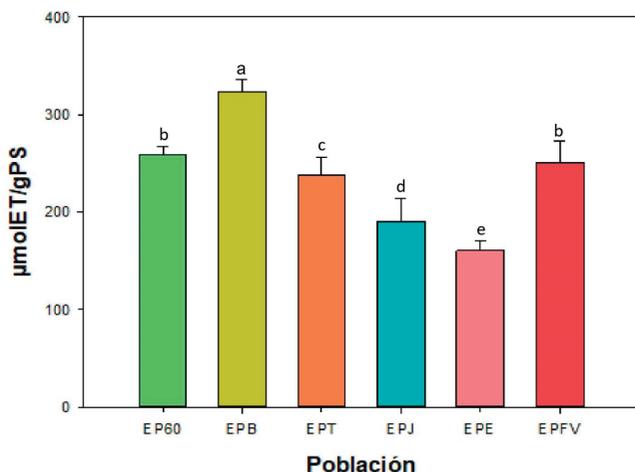
El método de DPPH está basado en la capacidad del radical para reaccionar con donantes de hidrógeno. La interacción de un antioxidante con el radical depende de su formación estructural con la presencia de grupos hidroxilo (Jiménez *et al.*, 2005).

En la Figura 3 se muestran los resultados antioxidantes de los diferentes propóleos medidos en  $\mu$ mol ET/PS en donde el EPB obtuvo la mayor actividad antioxidante con un valor de  $295.855 \pm 11.432$   $\mu$ mol ET/gPS seguido con dife-



**Figura 2.** Contenido de flavonoides totales en extractos etanólicos de propóleos de diversas poblaciones del sur de Sonora. Media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

**Figure 2.** Total flavonoid content in ethanolic extracts of propolis from different populations in southern Sonora. Mean  $\pm$  standard deviation (n=3).



**Figura 3.** Capacidad antioxidante por medio del ensayo DPPH de extractos etanólicos de propóleos del sur de Sonora. Media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

**Figure 3.** Antioxidant capacity by the DPPH assay of ethanolic extracts of propolis from southern Sonora. Mean  $\pm$  standard deviation (n=3).

rencias significativas por los extractos EP60 y EPFV quienes obtuvieron resultados de  $259.465 \pm 6.892$  y  $250.681 \pm 20.939$   $\mu\text{mol ET/gPS}$  respectivamente. El resto de los extractos también presentaron diferencias significativas entre sí en donde el menor valor lo obtuvo EPE con  $160.584 \pm 9.520$   $\mu\text{mol ET/PS}$ . Estos resultados son mayores a los encontrados en propóleos mexicanos provenientes de los estados de Nayarit quienes presentaron valores de 138  $\mu\text{g}$  equivalentes de Trolox (Ibarra *et al.*, 2020) y similares a los de Guanajuato en donde reportan valores de 54.4 mg ET/g PS (Hernández *et al.*, 2018).

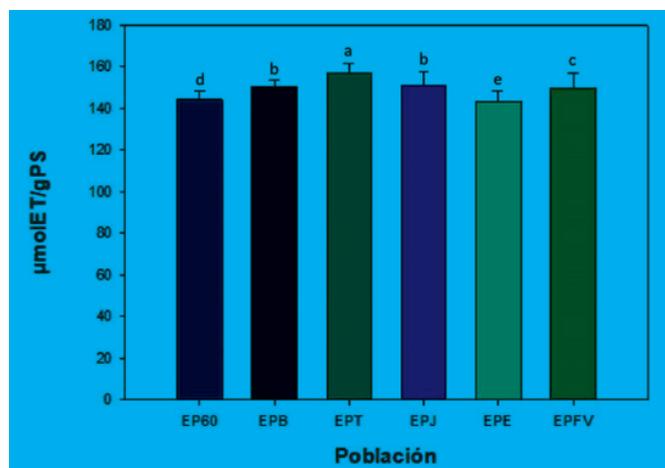
Por otro lado, se puede mencionar una posible correlación al comparar estos resultados antioxidantes con la concentración de fenoles, ya que los extractos EPB y EPFV fueron quienes obtuvieron valores superiores en éstas dos determinaciones. Socha *et al.* (2015), mostraron que hay una

correlación significativa entre la mayor actividad antirradical hacia el DPPH en extractos de propóleos de Polonia con el contenido total de fenoles y flavonoides. De igual manera, en estudios de extractos de tomate se documentó una correlación positiva entre la actividad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos utilizando el método de Pearson, en donde estas biomoléculas reducen los niveles de radicales libres (Silva-Beltrán *et al.*, 2015).

### Inhibición del radical ABTS (2,2' - azinobis (3- etilbenzotiazolona-6-sulfonato).

El ensayo de ABTS se basa en la transferencia de electrones, los diferentes compuestos antioxidantes presentes en los extractos donan uno o más electrones para reducir el radical a catión. Este método puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado (López de Lerma *et al.*, 2013).

En la Figura 4 se muestra la actividad antioxidante que presentaron los diversos extractos etanólicos, donde se puede observar que el extracto EPT obtuvo el mayor valor con  $156.963 \pm 4.119$   $\mu\text{mol ET/g PS}$ . Todos los resultados obtenidos en el presente estudio oscilan entre los 140 y 160  $\mu\text{mol ET/g PS}$  con diferencias significativas entre sí con excepción de los extractos EPB y EPJ. El extracto que obtuvo el menor valor fue el EPE con  $143.280 \pm 4.636$   $\mu\text{mol ET/gPS}$ . Cabe mencionar que las extracciones etanólicas en propóleos obtienen resultados más favorables en estudios antirradicales en ensayos como ABTS incluso superiores a la extracción supercrítica, esto debido a que el etanol extrae mayores cantidades de polifenoles y flavonoides y, en consecuencia, una mayor capacidad antioxidante (Dantas *et al.*, 2017). Además, los resultados obtenidos en este estudio son menores que los que se presentaron en extractos de propóleos de Colombia, quienes tuvieron valores de 455 a 1091  $\mu\text{mol ET/g PS}$  utilizando como solvente etanol al 96 % (Palomino *et al.*, 2009). Sin embargo, son mayores a los que reportaron Narimane *et al.* (2017)  $5.28 \pm 0.16$   $\mu\text{mol ET/g PS}$  quienes documentan una



**Figura 4.** Capacidad antioxidante por medio del ensayo ABTS de extractos etanólicos de propóleos del sur de Sonora. Media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

**Figure 4.** Antioxidant capacity by the ABTS assay of ethanolic extracts of propolis from southern Sonora. Mean  $\pm$  standard deviation (n=3).

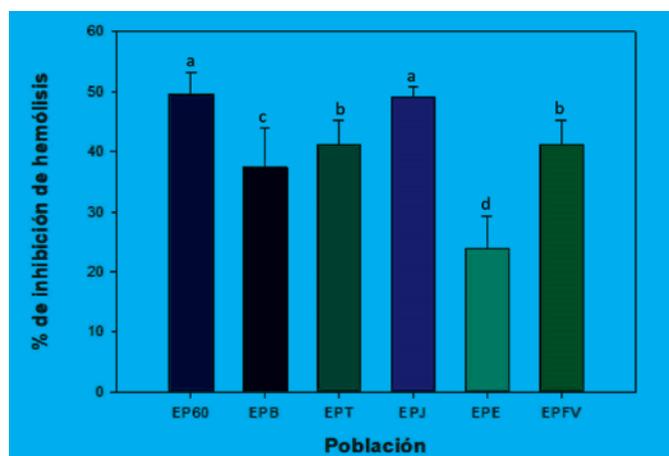
correlación con el contenido total de fenoles y flavonoides en los extractos de propóleo analizados del noroeste de Argelia, donde se menciona que la capacidad de los extractos de propóleos para eliminar estos radicales podría ser por la donación de electrones, ya que esta propiedad conduce a la conversión de radicales libres en productos más estables finalizando la reacción en cadena de éstos radicales (Apak *et al.*, 2007).

Por otro lado, Gregori y Stevanato (2010) reportaron la correlación existente entre la estructura química de algunos componentes del propóleo (ácido cafeico y sus derivados CAPE y DMAC) y su capacidad antioxidante, indicando que la mayor actividad está dada por moléculas que tienen dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo aromático.

### Capacidad antioxidante en el eritrocito humano

Recientes estudios, han utilizado modelos biológicos como eritrocitos humanos, con la finalidad de determinar la capacidad antioxidante de diversas sustancias bioactivas sobre la peroxidación lipídica de las células (Quihui *et al.*, 2017). Este método está basado en la inducción de hemólisis generada por el radical AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride). Este radical provoca la liberación del hierro desde la hemoglobina, actuando como pro-oxidante y generando hidroperóxidos provenientes de la reacción del oxígeno y el AAPH (Veiga *et al.*, 1997). Se detectó una protección eficaz de los extractos de propóleos analizados sobre los glóbulos rojos contra la hemólisis inducida por AAPH. La Figura 5 muestra que el extracto EP60 fue quien presentó el mayor porcentaje de inhibición de hemólisis con un 49.56 %, seguido del extracto EPJ, ambos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p < 0.05$ ). EPE fue quien presentó la menor protección al eritrocito con un 23.79 %.

Estudios realizados por Woźniak *et al.* (2019) en extractos etanólicos de propóleos de Polonia utilizando también este modelo celular, obtuvieron inhibiciones de hemólisis del



**Figura 5.** Capacidad antioxidante por medio del ensayo de % de inhibición de hemólisis inducida mediante AAPH de extractos etanólicos de propóleos del sur de Sonora. Media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

**Figure 5.** Antioxidant capacity by the AAPH-induced % hemolysis inhibition assay of ethanolic extracts of propolis from southern Sonora. Mean  $\pm$  standard deviation (n=3).

46.14 y 48.65% respectivamente, por lo que los resultados de la presente investigación son superiores a los de los extractos de Polonia. En otras investigaciones en donde se utilizó el mismo método se evaluaron extractos de ramas de *Ziziphus obtusifolia* quienes obtuvieron porcentajes de inhibición de hemólisis del 46.3% y 36.8% (Silva *et al.*, 2019), los cuáles también fueron menores que los de este estudio.

El estrés oxidativo es una causa importante de lesiones celulares durante diversas patologías como la carcinogénesis. Estudios realizados en eritrocitos demostraron que compuestos fenólicos como derivados del ácido cafeico como CAPE y otros ésteres de ácidos polifenólicos relacionados, provocan efectos inhibitorios notables sobre la peroxidación lipídica en la membrana de los eritrocitos, sobre el rompimiento de cadenas de ADN celular y la fragmentación de proteínas (Wang *et al.*, 2008). Adicionalmente, se han realizado investigaciones en propóleos de Sonora en donde se ha detectado la presencia de CAPE (Hernández *et al.*, 2007), por lo que dicho compuesto podría ser el causante de la inhibición de hemólisis inducida en los extractos de propóleos del sur de Sonora.

### Actividad antiinflamatoria por medio de la prueba de estabilidad de la membrana del eritrocito mediante las pruebas de hipotonicidad y de calor.

Durante la inflamación, hay lisis de lisosomas que liberan componentes enzimáticos, como la enzima fosfolipasa A2 que actúa sobre los fosfolípidos asociados a la membrana liberando lisolecitina. La lisolecitina actúa sobre la membrana de glóbulos rojos lo que causan una hemólisis que produce una variedad de trastornos. Esta lisis lisosomal se puede dar por sustancias nocivas como el medio hipotónico y por el calor (De *et al.*, 2017). La membrana de los glóbulos rojos humanos tiene una similitud con la membrana lisosomal. En este sentido, se trabajó con muestras de sangre, lo que permitió observar la actividad antiinflamatoria de los extractos de propóleos sobre los eritrocitos humanos mediante la inhibición hipotónica y la respuesta a la lisis inducida por calor a la membrana de los glóbulos rojos (Anosike *et al.*, 2018).

En la Tabla 2 se pueden observar los porcentajes de estabilización de los eritrocitos a causa de los diferentes extractos de propóleos analizados utilizando los ensayos por hipotonicidad y por calor. Así mismo, se observó alta variación en los resultados utilizando el medio hipotónico quienes mostraron porcentajes de estabilización de 7.74 a 1.77 % para los extractos EPT y EPJ respectivamente; sin embargo, mediante la prueba antiinflamatoria induciendo calor a los eritrocitos, se obtuvieron mejores resultados con valores del 22.01 (EP60) al 37.44 % (EPJ). Estos porcentajes demuestran que los propóleos evaluados son capaces de estabilizar la membrana de los glóbulos rojos, previniendo fugas de proteínas y fluidos séricos en los tejidos durante un periodo de mayor permeabilidad causada por mediadores inflamatorios que en este caso es el calor (Labu *et al.*, 2015).

La actividad antiinflamatoria presentadas en los propóleos se atribuye al alto contenido de compuestos fenólicos, esto debido a que existe un efecto sinérgico de más de

**Tabla 2.** Porcentajes de estabilización de la membrana del eritrocito utilizando calor y un medio hipotónico.

**Table 2.** Erythrocyte membrane stabilization rates using heat and hypotonic medium.

Extracto	Porcentaje de estabilización (%)	
	Calor	Hipotonicidad
EP60	37.19 ± 1.614 a	7.16 ± 2.416 a
EPB	27.72 ± 0.576 b	6.79 ± 1.740 a
EPT	24.75 ± 0.724 b	7.67 ± 0.413 a
EPJ	21.98 ± 0.445 c	1.74 ± 1.087 c
EPE	37.11 ± 0.623 a	7.719 ± 0.349 a
EPFV	34.35 ± 1.725 a	3.10 ± 1.181 b

Media ± desviación estándar (n=3)

Mean ± standard deviation (n=3)

un solo componente (Chandra *et al.*, 2012). Así mismo se ha reportado en muestras de propóleo la presencia de diversos compuestos como el ácido cafeico, CAPE, ácido ferúlico, galangina, genisteína, kaempferol, pinocembrina, quercetina y vainillina, entre otros (Castro *et al.*, 2014) confirmando la actividad antiinflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro* (Valenzuela-Barra *et al.*, 2015). Se puede observar que los propóleos son más efectivos estabilizando a los eritrocitos en medios con temperaturas elevadas que en medios hipotónicos. Anosike *et al.* (2018) indican que el efecto hemolítico que se produce en una solución hipotónica está relacionado con la acumulación excesiva de líquido dentro de la célula, lo que resulta en la ruptura de su membrana, por lo que la lesión de la membrana de los glóbulos rojos hará que la célula sea más susceptible a algún daño secundario a través de la peroxidación lipídica como la que es inducida por radicales libres.

### Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana fue medida por los métodos de susceptibilidad bacteriana mediante la medición de halos de inhibición y por el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) donde se realizaron diluciones de los extractos para determinar el porcentaje de inhibición

bacteriana. En la Tabla 3 se pueden observar los diferentes extractos evaluados con las diversas bacterias, en donde se muestra que todos los extractos presentaron actividad antibacteriana ante las diversas cepas confrontadas. Los extractos presentaron halos de inhibición con valores de 8 hasta 11.3 mm, siendo efectivas las diluciones de 1 y 2 mg de extracto/mL en la CMI. Así mismo, se observó que la bacteria Gram (+) *S. aureus* fue más sensible a los propóleos evaluados y los extractos EPB y EPE fueron quienes mostraron los mayores halos de inhibición con valores de 10.6 mm para las diluciones de 1 mg de extracto/mL. Estos resultados coinciden con Torlak y Sert (2013), en donde se evidenció efecto inhibitorio en bacterias Gram positivas al utilizar concentraciones de extractos de propóleos de 2 mg/mL. Otros estudios realizados en propóleos colombianos han comprobado la efectividad para reducir la contaminación por *S. aureus* con halos de inhibición de hasta 13 mm (Gómez *et al.*, 2014). En ese sentido, se observa que la actividad antibacteriana del propóleo es mayor contra las bacterias Gram positivas, y esto posiblemente se deba a la presencia de flavonoides, ácidos y ésteres aromáticos en la resina. Se ha comprobado que estos compuestos tienen efectos sobre las paredes celulares de estos microorganismos (Bankova *et al.*, 1999).

Por otro lado, las bacterias Gram negativas *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* presentaron mayor resistencia ante estos extractos ya que en su mayoría se obtuvieron valores de inhibición de menor diámetro (entre 8 y 9.3 mm) y se necesitó la dilución mayor (2 mg/mL) para inhibir su desarrollo. Además, al igual que en el presente estudio se ha evidenciado la actividad contra *S. typhimurium* utilizando concentraciones de extractos etanólicos de propóleos de 1 mg/mL (Choi *et al.*, 2006). Dado que las bacterias Gram (-) tienen dos membranas plasmáticas, la exterior que cubre la pared celular, podemos suponer que los ácidos fenólicos no podrían penetrar tan fácilmente la membrana exterior. En cambio, las bacterias Gram (+) no tienen esta membrana externa por lo que puede actuar de manera directa en las paredes celulares (Brown *et al.*, 2015). La mayor inhibición fue registrada por EPB quién a su vez presentó las mayores concentraciones de fenoles y flavonoides. Se observó una correlación de las actividades antibacterianas del propóleo

**Tabla 3.** Actividad antibacteriana de extractos de propóleos del sur de Sonora.

**Table 3.** Antibacterial activity of propolis extracts from southern Sonora.

Muestra	<i>E. coli</i> O157 : H7		<i>E. coli</i> O157		<i>S. aureus</i>		<i>S. typhimurium</i>	
	Diámetro de inhibición (mm)	CMI	Diámetro de inhibición (mm)	CMI	Diámetro de inhibición (mm)	CMI	Diámetro de inhibición (mm)	MIC
EP60	n.d.	2a	n.d.	1 a	n.d.	1 a	n.d.	1 a
EPB	9 ± 1.15 a	2a	8 ± 1.15 a	2 a	10.6 ± 1.57 a	1 a	9 ± 2.98 a	2 a
EPT	9 ± 3.46 a	2a	9 ± 0.57 a	2 a	9.3 ± 0.57 a	2 a	8 ± 1.23 a	1 a
EPE	8 ± 2.68 a	2a	9 ± 0.57 a	2 a	10.6 ± 2.23 a	1 a	9.3 ± 3.34 a	2 a
EPJ	8 ± 0.57 a	1a	8 ± 2.05 a	2 a	11.3 ± 0.23 b	2 a	8 ± 0.57 a	2 a

Medias de tres repeticiones; n.d.: no determinado; CMI: Concentración mínima inhibitoria (mg de extracto/mL);

Means of three replicates; n.d.: not determined; CMI: Minimum inhibitory concentration (mg extract/mL)

con las concentraciones de fenoles y flavonoides, los cuales eran dependientes del origen de la muestra (Hamasaka *et al.*, 2004). Algunos de los mecanismos antimicrobianos que pueden presentar los flavonoides (compuestos detectados en los propóleos del presente estudio) son la inhibición de la motilidad, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de las funciones de la membrana citoplasmática, inhibición del metabolismo energético, inhibición de la unión y formación de biopelículas, inhibición de las porinas y atenuación de la patogenicidad (Xie *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONES

La actividad biológica de los extractos etanólicos de los propóleos del sur de Sonora fue dependiente de la zona de origen. Las mejores actividades antioxidantes, anti hemolíticas y antibacterianas fueron dadas por los extractos EPFV y EPB quienes a su vez mostraron la mayor concentración de fenoles y flavonoides totales. La actividad antiinflamatoria de los propóleos fue expresada por la protección térmica que mostraron los diferentes extractos a los eritrocitos para evitar la hemólisis, siendo el EP60 el que presentó el mayor porcentaje de inhibición. Este resultado respalda la base para las formulaciones del propóleo del sur de Sonora y su uso como terapia natural alternativo.

## AGRADECIMIENTOS

La universidad de Sonora proyecto de colaboración (USO313007158), Instituto Tecnológico de Sonora por las facilidades brindadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Ayala, F. J., Rejón-Peraza, M. E., Cauich-Rodríguez, J. V., Borges-Argáez, R., Pinzón-Te, A. L., González-Alam, C. J. y Aguilar-Perez, F. J. 2019. Biophysicochemical study of propolis and its clinical and radiographic assessment in dental pulpectomy. *Drug Invention Today*, 12, 2928-2933.
- Anosike, C.A., Igboegwu, O.N. y Nwodo, O.F.C. 2018. Antioxidant properties and membrane stabilization effects of methanol extract of *Mucuna pruriens* leaves on normal and sickle erythrocytes. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2017.08.002>
- Andrews, M.J. 2001. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48 (Suppl 31), 5-16.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Esin-Celik, S., Bertasoglu, B., Berker I. y Özyrt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I. y Kujumgiev A. 1999. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales del propóleo brasileño. *Fitoterapia*. 70, 190-193.
- Bankova, V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y. y Kadota, S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15(7), 561-571.
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R. y Casadevall, A. 2015. A través de la pared: vesículas extracelulares en bacterias Gram-positivas, micobacterias y hongos. *Nature Review Microbiology*. 13, 620-630. pmid: 26324094.
- Bucio-Villalobos, C. M. y Martínez-Jaime, O. A. 2017. Antibacterial activity of aqueous extract of propolis from Irapuato, Guanajuato, Mexico. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 223-227.
- Carrillo, M.L., Castillo, L.N. y Mauricio, R. 2011. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información Tecnológica*, 22, 21-28.
- Castro, C., Mura, F., Valenzuela, G., Figueroa, C., Salinas, R., Zúñiga, M. C., Torres, J.L., Fuguet, E. y Delporte, C. 2014. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. *Food Research International*, 64, 873-879.
- Chandra, S., Dey, P., Bhattacharya, S., Division, P. y Bengal, W. 2012. Preliminary in vitro assessment of anti-inflammatory property of *Mikania scandens* flower extract. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 2(1), 25-31.
- Chen, L., X. Xin., Q. Yuan., D. Su. y W. Liu. 2014. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (2), 180-188.
- Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M. y Kim, J.M. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Science and Technology*, 39(7), 756-761.
- Dantas Silva, R.P., Machado, B.A.S., Barreto, G.D.A., Costa, S.S., Andrade, L.N., Amaral, R.G. y Umsza-Guez, M.A. 2017. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *Plos One*, 12(3), e0172585.
- De, P., Sarkar, S. y Mukhophadhyay, M.J. 2017. Study the antioxidant and In vitro Anti-inflammatory activity by membrane stabilization method of *Amaranthus gangeticus* leaf extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 103-105.
- 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), 74-87.
- Gil, M., Reyes, D., Rojas, T. y Flores, M. 2008. Actividad bacteriostática y bactericida de una tintura de propóleos proveniente del Estado Cojedes sobre bacterias de interés clínico. *Boletín Venezolano de Infectología*, 19(2), 124.
- Gómez, J., Peña, N., Pérez, C., Gutiérrez, C. y Suarez, H. 2014. Evaluación por dos métodos in vitro de actividad antimicrobiana de propóleos frente a algunos microorganismos de interés alimentario. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, 67(2), 131-134.
- Gregori, E. y Stevanato, R. 2010. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology*, (48), 76-82.
- Hamasaka, T., Kumazawa, S., Fujimoto, T. y Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. *Food Science and Technology Research*, 10(1), 86-92.

- Hernández, M.S., Abraham M.R., Cerón A., Ozuna C., Gutiérrez J.A., Segoviano J.J.N. y Avila, F. 2018. Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Science and Technology Campinas*. 38(2), 210-215.
- Hernández, J., Goycoolea, F.M., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Dominguez, Z. y Lugo, E. 2007. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Medica*, 73(14), 1469-1474.
- Ibarra-Espain, J. I., Carmona-Gasca, C. A., Escalera-Valente, F. y Avila-Ramos, F. 2020. Efecto del propóleo y aceite de orégano adicionados en la dieta sobre parámetros productivos, leucocitos, metabolitos en sangre y estabilidad oxidativa de la pechuga de pollo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(1), 153-166.
- Jiménez, N., Londoño, J. y Arango, G. J. 2005. Actividad captadora de radicales libres y citotoxicidad de plantas colombianas de la familia Annonaceae. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24(3), 337.
- Labu, Z. K., Laboni, F. R., Al Mamun, M. M. A. y Howlader, M. S. I. 2015. Antidiarrhoeal activity and total tannin content of ethanolic leaf extract of *Codiaeum variegatum*. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 87-90.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Esumi, H. y Kadota, S. 2010. Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Journal of Natural Products*, 73(4), 623-627.
- Londono, A., Avila-Acebedo, J.G., Canales-Marinez M., Hernandez, C.T., Serrano R.P., *et al*. 2010. Antibacterial comparative study between extracts of mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9, 1250-1254.
- López de Lerma, N., Peinado, J. y Peinado, R. 2013. In vitro and in vivo antioxidant activity of musts and skin extracts from off-vine dried *Vitis vinifera* cv. "T empranillo" grapes. *Journal of Functional Food*. 5(2), 914-922.
- Mello, B. C. y Hubinger, M. D. 2012. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different p H values. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(12), 2510-2518.
- Moein, S. y Moein, M.R. 2010. Relationship between antioxidant properties and phenolics in *Zhumeria majdae*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(7), 517-521.
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A. y Salah, R. 2017. Correlación entre la actividad antioxidante y el perfil de ácidos fenólicos y el contenido de propóleos argelinos: influencia del disolvente. *Revista de Ciencias Farmacéuticas de Pakistán*, 30(4), 1417-1423.
- Niraimathi, V., Suresh, A. J. y Latha, T. 2011. Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of azomethines of aryl oxazoles. *E-Journal of Chemistry*, 8(51), S392-S394.
- Palomino, L.R., García, C.M., Gil, J.H., Rojano, B.A. y Durango, D.L. 2009. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from antioquia (colombia). *Vitae*, 16(3), 388-395.
- Palomino García, L. R., Martínez Galán, J.P., García Pajón, C.M., Gil González, J.H. y Durango Restrepo, D. L. 2010. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of propolis from municipality of La Union (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(1), 5373-5383.
- Quihui-Cota, L., Morales-Figueroa, G.G., Valbuena-Gregorio, E., Campos-García, J.C., Silva-Beltrán, N.P. y López-Mata, M.A. 2017. Membrana de Quitosano con Aceites Esenciales de Romero y Árbol de Té: Potencial como Biomaterial. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38(1), 255-264.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rivero-Cruz, B. y Martínez-Chávez, A. 2015. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous quantification of flavonoids markers in Mexican propolis. *Food Analytical Methods*, 8(2), 413-419.
- Rodríguez-Pérez, B., Canales-Martínez, M. M., Penieres-Carrillo, J.G. y Cruz-Sánchez, T.A. 2020. Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, 30.
- Rodríguez, Y., Catalán, F.S., Rojano, B., Durango, D., Gil, J. y Loaiza, J.M. 2012. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), 303-311.
- SAGARPA. 2017. NOM-003-SAG/GAN-2017, propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento, Diario Oficial de la Federación. Tomo DCCLXIX No. 6 :27-35.
- Sakat, S.S., Juvekar, A.R. y Gambhire, M.N. 2010. In vitro antioxidant and antiinflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2(1):146-155
- Silva, J.C., Rodrigues, S., Feás, X. y Estevinho, L.M. 2012. Actividad antimicrobiana, perfil fenólico y papel en la inflamación del propóleos. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (5), 1790-1795.
- Silva-Beltrán, N. P., Ruiz-Cruz, S., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Ornelas-Paz, J. D. J., López-Mata, M. A., ... y Márquez-Ríos, E. 2015. Total phenolic, flavonoid, tomatine, and tomatidine contents and antioxidant and antimicrobial activities of extracts of tomato plant. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015:284071.
- Silva-Beltrán, N.P., Balderrama-Carmona, A.P., López-Cuevas, O., Portela-Márquez, M.A., Guez, U., & López-Mata, M. A. 2019. Actividad antioxidante y antimicrobiana de Barchata (*Zizhipus obtusifolia*). *Revista Bio ciencias*, 6.
- Singleton, V.L. y Rossi, A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Journal of Viticulture and Enology*. 16(48), 44-58
- Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W. y Sanguandeeikul, R. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of T hai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science & Technology*. 48(1), 22-27.
- Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M. y Juszczak L. 2015. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Products Research*. 29:416-422.
- Son, Y.R., Choi, E.H., Kim, G.T., Park, T.S. y Shim, S.M. 2016. Bioefficacy of Graviola leaf extracts in scavenging free radicals and upregulating antioxidant genes. *Food and Function*. 7, 861-871, doi:10.1039/c5fo01258a.
- Sulaeman, A., Marliyati, S.A. y Fahrudin, M. 2019. Actividad antioxidante y contenido fenólico total del propóleo de abeja sin aguijón de Indonesia. *Revista de Ciencia Apícola*, 63(1), 139-147.
- Sultana, B., Anwar, F. y Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167-2180.

- Torlak, E. y Sert D. 2013. Antibacterial effectiveness of chitosanpropolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 52-55.
- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J. C., Salas-Reyes, M., ... y Velazquez, C. 2012. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131(2), 645-651.
- Valenzuela-Barra, G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., de las Heras, B., Hortelano, S. y Delporte, C. 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 37-44
- Veiga, E., Aguilar J.A., Clavo B., y Llanes L. 1997. Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos*, (22), 201-216
- Wang, T., Chen, I., Wu, w., Long, Y. y Wang, R. 2008. Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86, 279-287.
- Woźniak, M., Mrówczyńska, L., Waśkiewicz, A., Rogoziński, T., y Ratajczak, I. 2019. Perfil fenólico y actividad antioxidante de los extractos de propóleos de Polonia. *Comunicaciones de Productos Naturales*, 14(5), 1934578X19849777.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., y Ren, L. 2015. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132-149.