

Búsqueda de compuestos anticancerígenos en propóleos antioqueños por medio de fluidos supercríticos

Luis Forero^{a,*}, Alejandro Henao^a, Sergio Sánchez^a, Erick Meneses^a

^aFacultad de Ciencias & Biotecnología, Universidad CES, Medellín, Colombia.

Resumen. Los propóleos son mezclas compuestas principalmente de resinas con gran variedad de metabolitos secundarios de exudados de plantas y ceras que son procesados por la recolección de polen de las abejas y su agregación con metabolitos de secreción salivar de estas. Las técnicas con baja huella de carbono han sido implementadas en la extracción de compuestos como los propóleos; el uso de esta extracción con fluidos supercríticos (EFSC) consiste en un proceso donde el dióxido de carbono utilizado como solvente en unas condiciones controladas de temperatura y presión se comporta tanto líquido como gaseoso, este medio fisicoquímico complejo permite la extracción de diferentes moléculas sin contaminar con solventes como podría pasar con otros métodos de extracción. Las actividades biológicas de los propóleos se han caracterizado muy bien en países como Brasil, donde se ha atribuido su capacidad anticancerígena con algunas sustancias químicas de los propóleos. A pesar de esto, estas caracterizaciones químicas y biológicas no son muchas en Colombia, y cabe aclarar, que la composición química de cada propóleo puede variar según la región en la que se obtenga, por las diferentes especies vegetales que las abejas usan para la elaboración del compuesto. El objetivo de este proyecto consistió en obtener compuestos por EFSC con propiedades anticancerígenas de los propóleos provenientes del departamento de Antioquia, Colombia. El proyecto tiene relevancia en Colombia, ya que sería el primer estudio en determinar las propiedades que tienen los propóleos colombianos, principalmente antioqueños, obtenidos por EFSC. Cabe aclarar esto porque Colombia cuenta con una geografía muy distinta, la cual difiere entre departamentos principalmente, lo que se relaciona con la composición química variable de los propóleos.

Palabras clave: Propóleos, Fluidos Supercríticos, Actividad anticancerígena, Extracción.

1. Introducción

Los propóleos son una mezcla resinosa que las abejas recolectan de los brotes de los árboles, los flujos de savia u otras fuentes botánicas. La composición química del propóleo varía y depende del área geográfica, el tiempo de recolección, la iluminación, la altitud y la disponibilidad de alimentos durante la explotación de propóleos [1].

Hasta el año 2000, se ha trabajado mucho en la composición química de los propóleos y se han identificado más de 300 compuestos químicos. La composición del propóleo varía de colmena a colmena, de distrito a distrito, y depende de muchos factores. El color del propóleo es a menudo marrón oscuro, pero se pueden encontrar en tono verde, rojo, negro y blanco, dependiendo de las fuentes de resina que se encuentran en el área de la colmena en particular. Las abejas melíferas son oportunistas para que puedan reunir lo que necesitan de las fuentes disponibles; por lo tanto, la composición química varía considerablemente de una región a otra, junto con la vegetación, por ejemplo, en climas templados del norte, las abejas recogen resinas de árboles (por ejemplo, álamos y coníferas).

El propóleo “típico” del norte de América tiene aproximadamente 50% de resina y bálsamo (sustancia obtenida de algunos árboles que se caracterizan por su aroma), 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% polen y 5% de impurezas. Generalmente, los flavonoides, fenilpropanoides, ácidos cinámicos y sus ésteres, y glicéridos son los compuestos importantes en el propóleo. El fenetil éster del ácido cafeico (CAPE) es también un componente de algunas variedades de propóleos de Nueva Zelanda. Los propóleos también contienen algunos aceites volátiles, terpenos y sesquiterpenos, cera de abeja, naftaleno, derivados del estilbeno y otros componentes como vitaminas, proteínas, aminoácidos, β -esteroides, alcoholes y azúcar [2].

Los propóleos más extendidos son los propóleos verdes, álamo, abedul, rojo, mediterráneo, *Clusia*, pacífico, Túnez, Irán y Egipto, que son diferentes en origen geográfico y origen vegetal. El propóleo verde brasileño es el propóleo más comúnmente estudiado y del mismo modo la planta de donde las abejas de esta región obtienen los sustratos para hacer el propóleo verde, *Baccharis dracunculifolia* DC, (Asteraceae) una planta originaria de Brasil. El propóleo verde brasileño es rico en fenilpropanoides prenilados (adición de moléculas hidrofóbicas), por ejemplo, artepilina C y diterpenos, cafeoil-quinico, bacarina se han divulgado como los componentes principales del propóleo verde brasileño los cuales son responsables de efectos antioxidantes y actividad inhibitoria contra algunas enzimas [1]. A pesar de

*Dirección de correo electrónico del autor.
Tel: +57 304 461 10 96

que el propóleo rojo también es elaborado por *Apis mellifera*, muestran diferentes composiciones ya que las abejas recolectan otra planta (*Dalbergia Ecastophyllum*) para elaborarlo [2].

Los fenilpropanoides dominan el componente químico en el propóleo rojo. Los terpenos, flavonoides, ácidos aromáticos y ácidos grasos también se encuentran con frecuencia en el propóleo rojo. Además, los principales elementos inorgánicos como el cobre, el manganeso, el hierro, el calcio, el aluminio, el vanadio y el silicio se identifican en el propóleo rojo. Se ha observado que el contenido de flavonoides es mayor en el propóleo rojo que en el propóleo verde. Estos valores han sido variables en diferentes estudios y tales discrepancias pueden deberse a factores naturales, como la estacionalidad y la flora de cada región. Se ha demostrado que el perfil químico del propóleo del álamo es similar al propóleo recogido de muchos países, incluidos China, Corea, Croacia, Taiwán, Nueva Zelanda y África. El propóleo de álamo es rico en flavonoides, fenilpropanoides, terpenoides, estilbenos, lignanos, cumarinas y sus derivados prenilados. La mayoría de los compuestos presentes en los propóleos de álamo, como los ácidos aromáticos, ésteres y flavonoides, se originan a partir de exudados de álamo, metabolismo de las abejas y contaminación con miel. Los ácidos fenólicos dominan las composiciones químicas en el propóleo iraní. Además del álamo, las especies de férula son otra fuente vegetal del propóleo iraní, que es responsable de la composición de tschimgina, tschimganina, ferutinina y tefernina. En las regiones neotropicales, además de una gran variedad de árboles, las abejas también pueden recolectar resina de las flores de los géneros *Clusia* y *Dalechampia*, que son los únicos géneros vegetales conocidos que producen resinas florales para atraer a los polinizadores. Aunque hay álamos en Egipto, la composición química del propóleo egipcio también se ve afectada por el clima subtropical y tropical. La presencia de ésteres de ácidos fenólicos, cafeatos de pentenilo y las flavanonas típicas del propóleo egipcio es una explicación de que probablemente las especies de álamos sean la principal fuente de formación de propóleos [3]. En el propóleo egipcio se encuentran altas concentraciones de carbohidratos, incluyendo glucosa, fructosa y sacarosa. El propóleo mediterráneo tiene un contenido de comparación de flavonoides más bajo que el propóleo europeo. El propóleo mediterráneo es rico en ácido dihidrocinámico, ácidos p-cumáricos prenilados y algunos diterpenos. Las plantas de *Cupressus* son las principales fuentes vegetales para el propóleo mediterráneo. Popova et al. evaluaron diecisiete

propóleos malteses, que exhibieron el perfil químico mediterráneo típico. Demostraron que el propóleo mediterráneo es rico en diterpenos, azúcar y compuestos derivados de azúcar. También indicaron que todas las muestras de propóleos eran activas contra *Staphylococcus aureus*, mientras que solo las muestras con altas concentraciones de ésteres de terpenilo podrían suprimir el crecimiento de *Candida albicans* [2].

Antecedentes de la actividad anticancerígena en propóleos.

En el propóleo se encuentran muchos compuestos, pero mayoritariamente compuestos fenólicos como ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, ácidos cafeico o flavonoides [7]. Existen tres ésteres del ácido cafeico (AC), denominados metil cafeato (MC), feniletil cafeato (PEC), y feniletil dimetil cafeato (PEDMC), estos tres compuestos han sido blanco de estudio debido su actividad frente a DMBA (carcinógeno mamario y de colon). Se encontró que se inhibía significativamente el crecimiento de células HT-29 de adenocarcinoma de colon, así como la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Por otra parte, también se estudiaron las actividades enzimáticas de ornitina descarboxilasa (ODC), enzima indicadora de la proliferación celular, que cataliza la formación de putrescina; y la proteína tirosina quinasa (TPK), enzima que fosforila restos de tirosina de las proteínas, siendo un mecanismo por el cual los factores de crecimiento indican a las células que inicien el crecimiento. En estos estudios "in vitro", AC y MC mostraban efectos inhibitorios en la formación de 12(S)-hidroxieicosatetraenoico (HETE) sólo a concentraciones de 100 µM, mientras que PEC, PEMC y PEDMC suprimían la formación de HETE de forma "dosis-dependiente" [4].

También se aisló un principio activo de propóleos procedente de Brasil y se caracterizó como un nuevo diterpenoide clerodano (PMS-1). Este compuesto a concentración de 10 µg/mL inhibe el crecimiento de carcinoma hepatocelular humano (células HuH 13), revelando por citometría de flujo que arrastra a las células tumorales a la fase S. Este componente también ejercía citotoxicidad sobre el carcinoma de pulmón humano y la línea celular HeLa, mostrando sin embargo menos efectividad sobre células renales. Cuando se estudia este mismo componente sobre cáncer de piel y el desarrollo de tumores de piel inducidos químicamente (7,12-dimetilbenzantraceno) y aplicados en ratones, resulta que PMS-1 reduce la incidencia de tumores de piel, así como el crecimiento por la inhibición de la síntesis de DNA [5].

Un estudio del efecto antitumoral de un extracto etanólico de propóleos (EEP) en carcinoma de Ehrlich en ratones, se compara la supervivencia con bleomicina, resultando que la supervivencia es mayor en ratones tratados con EEP que los tratados con bleomicina, mientras que los tratados con ambos compuestos (EEP + bleomicina) se acertaba la supervivencia con respecto al grupo control, concluyendo que mientras la actividad "in vivo" de bleomicina es reducida en presencia de inhibidores de la citocromo C-reductasa (como algunos de los componentes de EEP), la propiedad antitumoral de EEP en un modelo animal estudiado es significativa y duradera [6].

Propóleos en Colombia: Actividad biológica de los propóleos antioqueños y de la región andina.

En un estudio, se analizó el propóleos de abejas africanizadas del municipio de La Unión, Antioquia, este propóleos se recolectó en los meses de marzo y abril de 2007 en época de lluvias. La flora que predomina en los alrededores es *Eucalyptus globulus*, *Bacchari latifolia*, *Polyleps quadrijuga*, *Myconia notabilis* y *Weinmannia tomentosa*. Se evaluó la actividad antifúngica con las siguientes especies de hongos: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Colletotrichum acutatum* y *C. gloesporioides*. La fracción del propóleos inhibió el crecimiento de todos los hongos comparándolos con el control. La especie *C. acutatum* mostró más sensibilidad al propóleos, se aprecia un retraso del crecimiento micelial superior al 34 % para las concentraciones de 500 y 1000 mg/L del extracto de propóleos, luego de 4 días de incubación. También se evaluó la actividad antibacteriana, se utilizó la resina soluble en etanol de propóleos con el método de difusión en disco en agar Mueller-Hilton, evaluando así 4 tipos de bacterias, dos bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (esporulada), y dos Gram negativas: *Escherichia coli* y *Salmonella tiphy*. Los resultados obtenidos fueron que las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *S. tiphy*, no presentaron reducción del crecimiento en presencia de la fracción del propóleos, mientras que la bacteria Gram positiva *B. subtilis* (esporulada) fue sensible a las concentraciones de 1,0 y 10,0 mg/mL, observándose tanto un efecto bacteriostático como bactericida. Es importante mencionar que *B. subtilis* ha demostrado resistencia a algunos antibióticos en el pasado [7].

Las muestras de propóleos producidas por *Apis mellifera* de la región andina, de algunos departamentos como Valle del Cauca, Risaralda, Cundinamarca, Boyacá, Huila, Santander y Quindío, después de ser tratadas con solventes como el etanol para obtener extractos y la medición

de su actividad antimicrobiana ha estado asociado con su perfil fisicoquímico que está restringido a las plantas de las cuales las abejas obtienen los compuestos. Los propóleos producidos en la región de los andes colombianos presentaron una actividad significativa contra *S. aureus* y *E. Coli*, pero no se detectó ninguna actividad frente a *C. albicans*. Esto sugiere una necesidad de nuevos estudios de la composición química de propóleos y su origen botánico, y por estas características los propóleos colombianos tienen potencial para su uso en el desarrollo de nuevos productos terapéuticos [8].

En estudios de propóleos provenientes del municipio de Caldas, Antioquia, Colombia, se evaluó la composición química y la actividad antimicrobiana de los propóleos, colectados en un mismo apiario por los métodos: tradicional de raspado y malla matrizada. Luego de tener el material listo para recolectar se evaluaron algunos factores influyentes en los resultados que se obtendrían, como lo son: Sitio de estudio y obtención de propóleos, preparación de los extractos, propiedades fisicoquímicas, perfil cromatográfico, actividad antifúngica in vitro, actividad antibacteriana in vitro. Se presentan los resultados de las pruebas que se le han realizado al producto apícola, en algunos de ellos como en el perfil cromatográfico se pudo observar que la muestra de la malla contiene mayor número de compuestos, y en cantidades relativas superiores, en comparación con la técnica de raspado; para la actividad antifúngica se mostró que ambos extractos tuvieron actividad contra las especies *C. Acutatum* y *Penicillium sp*, para todas las concentraciones, para lo resultados obtenidos en actividad antibacteriana in vitro se mostró que la acción era dependiente de la concentración y tuvo un mayor efecto en la bacteria esporulada *B. Subtilis* [9].

2. Materiales y métodos

Extracción de compuestos de propóleos antioqueños por medio de fluidos supercríticos.

La extracción por fluidos supercríticos se realizó en convenio de la Universidad CES con la Universidad EAFIT en los laboratorios de Operaciones Unitarias del Departamento de Ingeniería de Procesos, utilizando el extractor Helix Supercritical Fluid System (Figura 1), un sistema donde solo se utilizó el CO₂ como solvente para la extracción porque es el único compatible con el equipo. Al operar el equipo se realizaron cambios de temperatura primero que los cambios de presión porque generalmente un aumento de temperatura en el sistema lleva a un aumento de presión. Dentro de

los materiales que se utilizaron para la extracción aparte del extractor se encuentra: materia prima de propóleos, tanque de CO₂, etanol 96%, raspador, bolsas de tela, recipientes porosos, vidrios de lana, embudo.

El procedimiento general de la extracción consistía en ingresar primero el material vegetal de propóleos que estaba a -20°C en una bolsa de tela que en el fondo y en la parte superior tenía vidrios de lana agregados con un embudo, esto con el fin de evitar el arrastre de partículas al extractor que podría causarse por las altas presiones durante la extracción. Luego se ajustaban las condiciones de extracción según los datos técnicos y especificaciones del equipo. Las extracciones se realizaron utilizando el dióxido de carbono como solvente y el etanol como co-solvente. Finalmente, se tomaba la materia sólida extraída cuando diferentes pesajes reportaban una masa constante. La muestra se conservaba en viales ámbar, recubiertos con papel aluminio para proteger de la luz, y refrigerando para evitar alteración de las muestras [10].

Datos técnicos y especificaciones del equipo Helix Supercritical Fluid System

- Control de temperatura hasta 180 °C; presión hasta 690 bares (10000 psi).
- Bomba: 400 mL/min de flujo para el líquido atmosférico (incompresible).
- Tamaño del recipiente de extracción: 1000 mL.
- Tamaño del recipiente separador: 300 mL.
- Controles independientes de temperatura y presión para módulos de extracción y separación
- Superficie de la unidad base de 12 "x 22" (30.48 cm x 55.88 cm).

Presiones máximas de operación:

Recipientes: 690 bares (10000 psi).

Bomba de CO₂: 10000 690 bares (10000 psi).

Temperaturas de operación máximas:

CO₂ heater: 180°C.

Heater del recipiente de extracción: 160°C.

Microválvulas: 180°C.

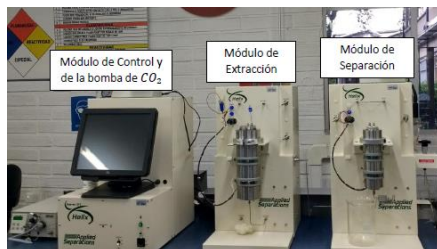


Figura 1. Módulos del sistema de Extracción por Fluidos Supercríticos (EFSC) donde se muestra el módulo de control y de

bomba de dióxido de carbono, el módulo de extracción y el módulo de operación del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad EAFIT.

Análisis de los extractos obtenidos por medio de Cromatografía en Capa Fina (TLC) y relevado de placas

Los extractos obtenidos se analizaron por medio de la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) para mirar posibles compuestos fenólicos y antioxidantes, utilizando tricloruro férrico al 1% para observar la presencia de fenoles y DPPH para observar presencia de antioxidantes. El tricloruro férrico fue preparado con una solución acuosa de metanol al 50%. El DPPH se preparó con metanol y la concentración final fue de 0,05% w/v. Para observar las tinciones en las placas, se utilizó un transiluminador UV a una longitud de onda de 366 nm. Se utilizó una cubeta para la cromatografía, placas de cromatografía en capa fina, y la fase móvil se preparó con hexano y acetato de etilo a diferentes proporciones. Para disponer la muestra de propóleos en las placas de cromatografía se utilizó un capilar con el que se agregaba una gota del propóleos suspendido en diclorometano.

3. Resultados y Discusión

Extractos y análisis en cromatografía en capa fina (TLC).

Se realizó la extracción de compuestos de propóleos por medio de fluidos supercríticos, la cual en una primera instancia fue realizada con condiciones de 50°C y 350 bares de presión. En esta extracción se presentaron errores al momento de utilizar la bomba de co-solvente, por lo tanto, se obtuvo un extracto con características resinosas e hidrófobas debido a la baja polaridad del dióxido de carbono. Las condiciones de extracción en temperatura y presión se establecieron como guía de una metodología descrita en la extracción de ácidos cinámicos en propóleos de Brasil [11]. Se utilizó una muestra de 30 g de propóleos proveniente del municipio de San Rafael en el Oriente de la ciudad, el cual se había pulverizado previamente y el cual presentaba una coloración marrón oscuro (Figura 8). Se obtuvo una cantidad final de 1g de extracto, teniendo un rendimiento de aproximadamente 3,33%. Los rendimientos en las extracciones con fluidos supercríticos, como reportan Monroy et al [12] suelen ser bajos y esto imposibilita muchas veces que se puedan obtener grandes fracciones de los compuestos deseados. Además, es importante utilizar gradientes con co-solventes como el etanol, que permiten aumentar la polaridad del dióxido de carbono en estado supercrítico y de esta forma se puedan extraer los compuestos de interés [12]. Se procedió nuevamente a realizar dicha extracción,

pero se utilizó un flujo de etanol al 96% como co-solvente y se utilizaron 10 g de propóleos marrones provenientes de Turbo, Antioquia.

Una vez finalizada extracción de ambas muestras se procedió a realizar un análisis del primer extracto mediante cromatografía en capa fina (TLC) para determinar compuestos fenólicos (polifenoles, antocianinas, flavonoides, etc.) y compuestos con posible actividad antioxidante. Se plantearon 6 ensayos de TLC con una fase móvil de Hexano-Acetato de Etilo en diversas proporciones para realizar una caracterización de la polaridad de los compuestos presentes en los extractos obtenidos (Ver Tabla 1). Se realizaron dos sistemas cromatográficos de Hexano: Acetato de Etilo 8:2 y 6:4 respectivamente (Figuras 2, 3 y 5). Se comparó la muestra extraída por medio de EFSC con dos muestras de propóleos puras que estaban resuspendidas en diclorometano. Una muestra era de Salgar vereda La Lindaja y la otra era de Salgar de la Finca La Máquina. Se sometió la placa de TLC a un revelado con tricloruro férrico al 1% en una mezcla Agua-Metanol (50:50) para determinar la presencia de compuestos fenólicos en la muestra, donde hubo ausencia de manchas rojizas probablemente por la predominancia de compuestos con características apolares (Figura 7). Se realizó un análisis por DPPH para evaluar si dichos compuestos presentan actividad antioxidante en donde no se obtuvieron coloraciones amarillas que serían características de compuestos con dicha actividad (Figura 4 y 6).

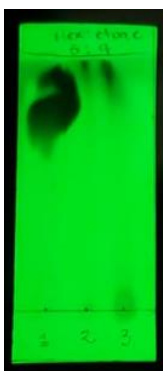


Figura 2. Resultados de cromatografía en capa fina (TLC) obtenidos con la muestra extraída de propóleos (1) en comparación con dos muestras de propóleos sin extracción previa (2) y (3). Fase Móvil= Hexano: Acetato de Etilo (6:4). Placa observada a través de transiluminador UV, $\lambda=366$ nm.

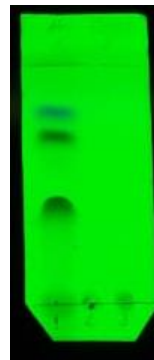


Figura 3. Resultados de cromatografía en capa fina (TLC) obtenidos con la muestra extraída de propóleos (1) en comparación con dos muestras de propóleos sin extracción previa (2) y (3). Fase Móvil= Hexano: Acetato de Etilo (8:2). Placa observada a través de transiluminador UV, $\lambda=366$ nm.



Figura 4. Resultados del revelado de la cromatografía en capa fina (TLC) (placa de la Figura 10) obtenidos con la muestra extraída de propóleos (1) en comparación con dos muestras de propóleos sin extracción previa (2) y (3). Revelado con DPPH para determinar la presencia de antioxidantes. Se observa la ausencia de sustancias antioxidantes.



Figura 5. Resultados de cromatografía en capa fina (TLC) obtenidos con la muestra extraída de propóleos (1) en comparación con dos muestras de propóleos sin extracción previa (2) y (3). Fase Móvil= Hexano: Acetato de Etilo (6:4). Placa observada a través de transiluminador UV, $\lambda=366$ nm.



Figura 6. Resultados del revelado de la cromatografía en capa fina (TLC) (placa de la Figura 12) obtenidos con la muestra extraída de propóleos (1) en comparación con dos muestras de propóleos sin extracción previa (2) y (3). Revelado con DPPH para determinar la presencia de antioxidantes. Se observa la ausencia de sustancias antioxidantes.



Figura 7. Resultados del revelado de la cromatografía en capa fina (TLC) (placa de la Figura 12) obtenidos con la muestra extraída de propóleos (1) en comparación con dos muestras de propóleos sin extracción previa (2) y (3). Revelado con tricloruro férrico para determinar la presencia de fenoles. Se observa la ausencia de fenoles en la placa, ya que se agregó el revelador en exceso (puntos rojos en la placa).



Figura 8. En la figura se puede observar la muestra de propóleos (1) antes de la extracción como un polvo fino (A) y también se puede apreciar una sustancia resinosa sólida luego de la extracción (B).

Tabla 1. Sistemas Cromatográficos TLC Extracto (1).

CROMATO-GRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)	PROPORCIÓN HEXANO: ACETATO DE ETILO (mL)	Rf	POLARIDAD
1	8:2	0.9	+
2		0.9	+
3		0.9	+
4	6:4	0.7	++
5		0.7	++
6		0.7	++

+ Baja Polaridad.
 ++ Mediana Polaridad.
 +++ Alta Polaridad.

En la segunda muestra extraída se realizaron modificaciones en el sistema cromatográfico para optimizar la extracción de propóleos, se planteó un sistema con condiciones de 50°C y 300 bar con flujo de co-solvente mediante el uso de etanol para modificar la polaridad del dióxido de carbono (CO₂) a un flujo de 1,23 mL/min y se implementó como muestra 10 g de propóleos proveniente de Turbo, Antioquia, al final de la realización de este ensayo se obtuvo un extracto re-suspendido en etanol. Para la segunda extracción de propóleos se realizó un único análisis por TLC, usando como fase móvil Hexano: Acetato de Etilo en una proporción 6:4 (ver Figura 9). El Rf obtenido de la muestra fue de 0,72 lo que podría indicar que el extracto obtenido con uso de co-solvente pudo extraer compuestos de mayor polaridad y características hidrofílicas. Al igual que en la extracción anterior se sometió la placa de TLC a un revelado con tricloruro férrico al 1% en una mezcla Agua-Metanol (50:50) para determinar la presencia de compuestos fenólicos en la muestra, presentándose una coloración rojiza en el spot en donde se presentó la separación de algunos componentes de la muestra (ver Figura 10). Se realizó un análisis por DPPH para evaluar si dichos compuestos presentan actividad antioxidante en donde se obtuvieron coloraciones amarillas características de compuestos con dicha actividad (ver Figura 11), sin embargo, es necesario realizar TLC con diferentes fases móvil para determinar dichos supuestos, además de comparar la actividad antioxidante de dichos compuestos por medio de otras técnicas analíticas de barrido de radicales libres. En la Figura 12 se puede observar en las paredes del recipiente de recolección fragmentos sólidos extraídos de la muestra dos de propóleos juntos con el co-solvente etanol.

La técnica de cromatografía en capa fina ha sido empleada por diversos autores y ha permitido tipificar diferentes propóleos, además de determinar su origen botánico [13]. El uso de

marcadores biológicos como flavonoides podría servir para correlacionar la composición química de los propóleos con la flora de la zona [14]. Los flavonoides y compuestos antioxidantes han sido aislados de muestras de propóleos de diferentes zonas geográficas del mundo, siendo parte de la composición genérica de los propóleos [15]. En esta prueba se necesitaría el uso de indicadores o estándares que permitieran asegurar la presencia de un compuesto específico. Los resultados obtenidos de las cromatografías realizadas fueron los esperados, porque en la muestra extraída sin uso de co-solvente la composición mayoritaria podrían ser resinas, mientras que en extractos con variación de la polaridad del fluido supercrítico, se puede obtener compuestos no resinosos [13].



Figura 9. Resultados de cromatografía en capa fina (TLC) obtenidos con la muestra extraída de propóleos dos (extracción con co-solvente etanol). Fase Móvil= Hexano: Acetato de Etilo (6:4). Placa observada a través de transiluminador UV, $\lambda=366$ nm.



Figura 10. Resultados del revelado de la cromatografía en capa fina (TLC) (placa de la Figura 9) obtenidos con la muestra extraída de propóleos dos (extracción con co-solvente etanol). Revelado con tricloruro férrico para determinar la presencia de fenoles. Se observan unas manchas claras que pueden indicar la presencia de fenoles.

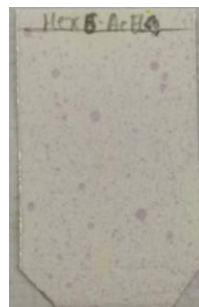


Figura 11. Resultados del revelado de la cromatografía en capa fina (TLC) (placa de la Figura 9) obtenidos con la muestra extraída de propóleos dos (extracción con co-solvente etanol). Revelado con DPPH para determinar la presencia de antioxidantes. Las manchas amarillas claras que aparecen en la placa podrían sugerir la presencia de compuestos antioxidantes.



Figura 12. Extracción de la muestra de propóleos del municipio de Turbo, Antioquia.

Actividad anticancerígena de compuestos provenientes de propóleos.

Dada la amplia actividad farmacológica, incluidos los posibles efectos anticancerígenos y la composición compleja que se encuentra en los extractos totales de los propóleos, estudios recientes han centrado su trabajo en métodos de fraccionamiento con el objetivo de producir fracciones enriquecidas, con menor diversidad química y mejores efectos biológicos. Estudios han indicado que el propóleos rojo brasileño, especialmente después del fraccionamiento, puede producir varias actividades citotóxicas contra las células cancerígenas [16]. Los extractos de propóleos exhiben una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento celular y la inducción de apoptosis, lo que se sugirió que se debía a la activación de caspasa 8, 9 y 6 [17] y también se entiende que de acuerdo al origen y al método de extracción en el perfil químico, los propóleos rojos pueden actuar de manera selectiva contra las células tumorales [18]. Otros estudios con propóleos rojos brasileños mostraron actividad antioxidante y en mayor concentración mostró un alto potencial citotóxico en las líneas celulares tumorales humanas SF-295, HCT-116 y OVCAR-8 [19].

En Brasil, también se reportan estudios con propóleos verdes donde su componente principal es la Artepilina C y en los ensayos este compuesto ha logrado disminuir el crecimiento de células de fibrosarcoma (HT1080) [20]. Con compuestos como ácido cafeico y el fenetil éster del ácido cafeico (polifenoles), presentes en propóleos brasileños se ha encontrado actividad anticancerígena en células de carcinoma de mama (MDA-MB-231) [21] y otros estudios donde se utilizan estos polifenoles han mostrado que puede producir citotoxicidad e inducción de la apoptosis en células de carcinoma escamoso de cuello y cabeza (Detroit 562) [22]. Con propóleos verdes brasileños también se han probado los efectos citotóxicos y apoptóticos de TRAIL en células de cáncer de próstata. Se muestra que el propóleo verde brasileño aumenta notablemente la apoptosis mediada por TRAIL en las células de cáncer de próstata LNCaP. Se estudio la participación del potencial de membrana mitocondrial en el proceso apoptótico inducido por TRAIL en combinación con propóleo verde brasileño [23]; también se reporta la inhibición del crecimiento celular de carcinoma de próstata humano derivado de metástasis (Células DU145 y PC-3) y tumor primario derivado de humanos células de cáncer de próstata (telomerasa inmortalizada RC-58T) con propóleos verdes brasileños en etanol demostrando inhibición del ciclo celular [24]. Aparte de que los compuestos de propóleos brasileños en estado sólido o líquido poseen propiedades anticancerígenas, han demostrado una cantidad considerable de compuestos volátiles provenientes de propóleos y poseen actividades protectoras ante los productos finales avanzados de glicación, antidiabéticas, antioxidantes, especies reactivas de oxígeno, entre otras actividades [25].

En Colombia, solo se reporta un estudio donde se demostró la actividad citotóxica de propóleos provenientes de: San Carlos, Antioquia; Usme, Bogotá DC; Rivera, Huila; Puerto López, Meta; Fusagasugá, Cundinamarca; Silvia, Cauca; Cajibío, Cauca; Sevilla, Valle del Cauca y Zetaquirá, Boyacá en células caninas de osteosarcomas, encontrando además alteraciones en la membrana mitocondrial de estas células y supresión celular [26].

En estudios con propóleos de Nueva Zelanda, se inhibió la proliferación de 4 líneas celulares de cáncer gastrointestinal humano, y el grado de inhibición aumentó al aumentar el tiempo de exposición [27]. Estudios *in vitro* con flavonoides aislados de propóleos del suroeste de Serbia demostraron actividad anticancerígena en líneas

celulares de cáncer de colon humano (HCT-116) y de cáncer de mama (MDA-MB-231) [28]. En la India se ha encontrado actividad anticancerígena de propóleos de coloración amarillo-marrón en líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7) y cáncer de colon (HT-9) [29]. Efectos apoptóticos y antiproliferativos han sido estudiados en líneas celulares de cáncer de pulmón (A549) con propóleos provenientes de Turquía [30]. En Cuba se realizó un estudio de la actividad citotóxica y antiproliferativa por ensayos con MTT y lactato deshidrogenasa de propóleos cubanos de color rojo sobre células de cáncer de mama (MDA-MB-231), encontrando una inhibición de la proliferación celular de forma dosis-dependiente [31]. El propóleo café de Cuba (BCP) es el tipo principal de propóleos en Cuba; su composición química es exclusiva y el componente principal es la nemorosona. Se ha estudiado la actividad anti proliferativa del extracto etanólico de propóleo cubano marrón en líneas celulares humanas de cáncer de mama: MCF-7 (estrógeno receptor positivo ER+) y MDA-MB 231 (ER-), el resultado fue una actividad anti proliferativa dependiente de la concentración (1-25 µg/mL) y tiempo (24-48 h) de ($P < 0.005$) en las líneas celulares. También los datos mostraron que la administración de BCP a MCF-7 causó una inhibición significativa ($P > 0.01$) del crecimiento celular en la fase G1 del ciclo celular [32]. En México se ha encontrado citotoxicidad *in vitro* de flavonoides aislados de propóleos frente a una línea celular pancreática humana (PANC-1) [33].

Las caracterizaciones químicas de los propóleos demuestran que cada fracción presenta compuestos que actúan de manera distinta en el metabolismo celular, lo cual genera diferentes respuestas de señalización celular, esto indica que se deben aislar y probar compuestos individualmente [34]. También se han buscado y usado los propóleos en conjunto de otras alternativas como la TC-HT (Termo-ciclo-Hipertermia) porque el método fue capaz de mejorar la citotoxicidad del propóleos en más de 10 veces, sin dañar a las células normales y es eficiente como terapia combinada [35]; en la radioterapia para pacientes con cáncer de mama se han usado como suplemento, ya que, estas sustancias podrían ofrecer una protección frente al daño del DNA causado por la radiación ionizante en los leucocitos de estos pacientes. De esta forma se podría evitar el daño causado por el estrés oxidativo [36].

En las propiedades anticancerígenas en productos de propóleos no solo se debe buscar la inhibición si no también la migración y esto se ha demostrado

con la inhibición de una línea celular cancerígena TLR4 positiva, por medio de la activación de la apoptosis, la autofagia, y la inhibición de la vía de señalización de TLR4 [37].

Tabla 2. Compuestos extraídos de propóleos de diferentes orígenes con actividades anticancerígenas estudiadas en diversas líneas celulares.

Compuestos extraídos	Líneas celulares	Origen de los propóleos	Métodos de extracción/identificación	Referencias
Medicarpina, Biocanina A, 7-O Metilvestitol(3S), Violanona.	HT-29, HCT-116, Vero.	Alagoas (región noreste de Brasil).	Cromatografía de columna. HPLC. ESI/MS micro TOF-QII.	[16]
Galangina, Ácido cafeico, Apignina, Quercetina.	MCF -7, SK-BR-3, MDA-MB-231.	Argentina. Turquía. China.	HPLC. LS/MS-MS.	[17]
Compuestos fenólicos y flavonoides (Formononetina, Kaempferol, Ácido gálico, etc.)	HCT-116. HL-60. PC-3. SNB-19.	Brasil (Alagoas, Bahía, Rio grande do Norte y Sergipe)	HPLC/DAD	[18]
Contenido de flavonoides extraídos: 22.68%, fenetil éster del ácido cafeico (componente principal).	MDA-MB-231.	China (provincia de Shandong del norte).	HPLC - PAD	[37]
Compuestos fenólicos y flavonoides sin identificar por parte del estudio.	PC-3. MCF-7. A549.	Corea del Sur (Anseong, Icheon, Yangpyeong, Goyang, Wonju, Goesan, Chungju, Daejoen, Dangjin, Goryeong, Uljin, Jinju, Changnyeong, Geochang, Imsil, Buan, Jeonju, Gunsan, Gwangju, Jeju).	Método colorimétrico Folin-Ciocalteu (polifenoles). Lector de microplacas VersaMax. Método colorimétrico AlCl ₃ .	[38]
Ácido cafeico, Ácido cumárico, Ácido ferúlico, Ácido clorogénico, Ácido gálico, Quercetina. Algunos compuestos volátiles.	SF295. HTC-116. OVCAR-8. MDA-MB435. MX-1. MCF-7. HL-60. JURKAT. MOLT-4. K562. PC-3. DU145.	Brasil (Ribeira do Pombal y Tucano) (Coloraciones verdes - cafés).	UHPLC - ESI - MS/MS.	[25]
Liquiritigenina, Formononetina, Medicarpina, Vestitol o isovestitol, Ferreirina.	Hep-2.	Alagoas (Región noreste de Brasil) (Coloración roja)	HPLC-UV ESI (+) - MS (micro TOF-QII).	[34]
Flavonoides: pinocembrina, naringenina, galangina,	Cáncer de colon humano	Suroeste de Serbia	Espectroscopia de Resonancia Magnética	[28]

tectocrisina, apigenina, kaempferol, heperetina, isorhamnetina, luteolina y miricetina.	(HCT-116) Cáncer de mama (MDA-MB-231).		Nuclear (NMR) de ¹ H y ¹³ C	
CAPE (Fenetil Éster del Ácido Cafeico), Pinobanksina, Pinobanksina-3-acetato, Pinoembrina, Crisina, Galagina.	DLD-1 HCT-116 KYSE-30 NCI-N87	Complejos de propóleos-γCD (gamma ciclodextrina sintetizada naturalmente) de Nueva Zelanda CD1 y CD2 fueron fabricados por CycloChem Bio (Japón) mezclando una tintura de propóleos que contenía 25% de sólidos de propóleos	HPLC Detector de matriz de fotodiodos.	[27]
Compuestos fenólicos como: artepilina C, quercetina, kaempferol y ácido p-cumárico.	Células de cáncer de próstata LNCaP	Brasil	La muestra se extrajo en alcohol etílico al 95% v/v, en un recipiente de vidrio sellado herméticamente durante 4 días a 37 ° C, bajo agitación ocasional. El extracto luego se filtró a través del papel de filtro Whatman N° 4 y se evaporó en un evaporador rotativo, a presión reducida a 60 ° C. El extracto se disolvió en dimetilsulfóxido (50 mg / mL), y la concentración final de DMSO en el medio de cultivo se controló al 0,1% (v/v).	[23]
Nemorosona	Células de cáncer de mama: MCF-7 y MDA-MB 231	Cuba	La muestra de propóleos se molió antes de la extracción. Se extrajeron 20 g de propóleos café de Cuba con etanol al 80% (100 mL) mediante extracción asistida por ultrasonido durante 2 h a 20 ° C.	[32]
Crisina, Quercetina, fenetil éster del ácido cafeico, Diterpeno clerodano, Artepilina C.	Células de cáncer de próstata: DU145, PC-3 y RC-58T	Brasil	La muestra de propóleos se extrajo con 600 mL de etanol al 80% (v/v) a 60 ° C durante 30 min. Después de la extracción, la mezcla se centrifugó y el sobrenadante se evaporó individualmente para completar el secado a 40 ° C y obtener polvo.	[24]

Flobafeno, catequinas, flavonas, flavonoles, chalcona, isoflavonas, pterocarpanos, isoflavonoides, biflavonoides, triterpenoides pentacíclicos y xantonas	SF-295, HCT-116 y OVCAR-8	Brasil	El propóleo crudo se colocó en un matraz con 600 mL de etanol al 80%, que se puso en un agitador. Durante 48 h. Luego, el macerado (la porción líquida) se eliminó usando una pipeta, y la porción sólida (cera) se desechó.	[19]
Flavonoides	Línea celular pancreática humana PANC-1	México	Extracto metanólico	[33]
Propolina G	Células de glioma C6 de rata y DBTRG-05MG (glioblastoma humano)	Taiwán	El propóleo se extrajo con alcohol etílico al 95%, se sometió a ondas sonoras y se dejó reposar durante 21 ha 25 ° C. El extracto de etanol filtrado se evaporó a presión reducida para producir una goma marrón, que se mantuvo a -20 ° C hasta su uso.	[39]
Flavonoides, ácidos orgánicos, fenoles	Células normales (MRC-5) y Células cancerígenas (HT-29, A549, Hep-2)	Túnez	La muestra se congeló, se molió en un molino y se extrajeron pequeñas cantidades de propóleos en bruto con agitación, en un volumen de 10 veces de solución de etanol al 95% en botellas herméticamente cerradas, durante 3 días a temperatura ambiente en la oscuridad.	[40]
Ácido cafeico, quercetina, apigenina, fenetil éster del ácido cafeico	Cáncer de mama humano (MCF-7) y Cáncer de colon (HT-9)	India	RP-HPLC.	[29]
Azúcares, ácidos grasos, diterpenos, flavonoides, benzofenonas, triterpenos, alquilresorcinoles.	Células de osteosarcoma (OSA) caninas	Colombia	GC-MS	[26]
Vestitol, neovestitol, liquiritigenina, isoliquiritigenina, isosativan, y medicarpina.	Cáncer de mama (MDA-MB-231)	La Habana, Cuba (coloración roja)	Concentraciones: 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL a partir de una solución madre que contenida 100 mg (en base seca) de propóleos y añadiendo 1 mL de etanol al 70%, el cual fue también evaluado en los ensayos realizados.	[31]

4. Conclusiones

Esta investigación es un indicio promisorio de que la extracción con fluidos supercríticos es una técnica que permite la obtención de compuestos fitoquímicos de propóleos, siendo amigable con el ambiente y que se utilizará para aislar compuestos con actividad anticancerígena para poder desarrollar formulaciones de productos naturales con los componentes bioactivos de este producto de las abejas, lo cual puede ser promisorio para tratamiento más selectivos y menos citotóxicos que los que se tienen actualmente. Es necesario realizar análisis fisicoquímico de identificación más específico para conocer los componentes presentes en los propóleos de Antioquia por medio de técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear, cromatografías de alta eficiencia, espectrometrías de masas entre otras. También es necesario realizar diferentes estudios en líneas celulares de cáncer que permitan evaluar la bioactividad de los propóleos de Antioquia. Toda esta información sería indispensable para generar guías y metodologías en Colombia, donde se establezcan las indicaciones técnicas del uso adecuado de los propóleos y poder comercializar productos con componentes activos conocidos y bajo la debida aprobación del ente regulatorio, todo esto dará valor al trabajo de los apicultores, botánicos y otros profesionales relacionados con los propóleos.

5. Referencias

- [1] Syed Ishtiaq Anjum, Amjad Ullah, Khalid Ali Khan, Mohammad Attaullah, Hikmatullah Khan, Hussain Ali, Muhammad Amjad Bashir, Muhammad Tahir, Mohammad Javed Ansari, Hamed A.Ghramh, Nuru Adgaba, Chandra Kanta Dash. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. 17 August (2018).
- [2] Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomed Pharmacother.* 1 February (2018) ;98:469-83.
- [3] Popova M, Trusheva B, Antonova D, Cutajar S, Mifsud D, Farrugia C, et al. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chem.* 1 June (2011); 126(3):1431-5.
- [4] Rao CV, Desai D, Kaul B, Amin S, Reddy BS. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem Biol Interact.* November (1992); 84(3):277-90.
- [5] Matsuno Tetsuya. A New Clerodane Diterpenoid Isolated from Propolis. *Z Für Naturforschung C.* June (2014); 50(1-2):93.
- [6] Scheller S, Krol W, Swiacik J, Owczarek S, Gabrys J, Shani J. Antitumoral property of ethanolic extract of propolis in mice-bearing Ehrlich carcinoma, as compared to bleomycin. *Z Naturforschung C J Biosci.* October (1989);44(11-12):1063 – 1065.
- [7] Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). | Palomino García | Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Septiembre (2018).
- [8] Bastos E, Guzman D, Figueroa J, Tello J, Scoaris DO. Caracterización Antimicrobiana Y Físico-Química De Muestras De Propoleo Proveniente De La Región Andina Colombiana. *Acta Biológica Colomb.* Enero (2011) ;16(1):175-84.
- [9] Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. Septiembre (2018).
- [10] Chen C-R, Lee Y-N, Lee M-R, Chang C-MJ. Supercritical fluids extraction of cinnamic acid derivatives from Brazilian propolis and the effect on growth inhibition of colon cancer cells. *J Taiwan Inst Chem Eng.* March (2009); 40(2):130-5
- [11] Machado BAS, Barreto G de A, Costa AS, Costa SS, Silva RPD, da Silva DF, et al. Determination of Parameters for the Supercritical Extraction of Antioxidant Compounds from Green Propolis Using Carbon Dioxide and Ethanol as Co-Solvent. *PloS One.* (2015); 10(8):e0134489.
- [12] Monroy YM, Rodrigues RAF, Rodrigues MVN, Sant'Ana AS, Silva BS, Cabral FA. Brazilian green propolis extracts obtained by conventional processes and by processes at high pressure with supercritical carbon dioxide, ethanol and water. *J Supercrit Fluids.* diciembre de (2017);130:189-97.
- [13] LADY ROSSANA PALOMINO GARCÍA. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS DE ANTIOQUIA [Tesis de Maestría]. [FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE QUÍMICA]; UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN; (2009).

- [14] Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian Red Propolis –Chemical Composition and Botanical Origin. *Alternant Medicine*. (2008).
- [15] Funakoshi-Tago M, Ohsawa K, Ishikawa T, Nakamura F, Ueda F, Narukawa Y, et al. Inhibitory effects of flavonoids extracted from Nepalese propolis on the LPS signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. November (2016) ;40:550-60.
- [16] Santos, D. A. dos, Munari, F. M., Frozza, C. O. da S., Moura, S., Barcellos, T., Henriques, J. A. P., & Roesch-Ely, M. (2019). Brazilian red propolis extracts: Study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1), 120–130 (2019).
- [17] Seyhan, M. F., Yılmaz, E., Timirci-Kahraman, Ö., Saygılı, N., Kısakesen, H. İ., Gazioğlu, S., Gören, A. C., Eronat, A. P., Begüm Ceviz, A., Öztürk, T., Yılmaz-Aydoğan, H., & Öztürk, O. (2019). Different propolis samples, phenolic content, and breast cancer cell lines: Variable cytotoxicity ranging from ineffective to potent. *IUBMB Life*, 71(5), 619–631. (2019).
- [18] Reis, J. H. de O., Barreto, G. de A., Cerqueira, J. C., Anjos, J. P. dos, Andrade, L. N., Padilha, F. F., Druzian, J. I., & Machado, B. A. S. (2019). Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLOS ONE*, 14(7), e0219063. (2019)
- [19] Mendonça, I. C. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. (2015)
- [20] Bhargava P, Grover A, Nigam N, Kaul A, Doi M, Ishida Y, et al. Anticancer activity of the supercritical extract of Brazilian green propolis and its active component, artepillin C: Bioinformatics and experimental analyses of its mechanisms of action. *Int J Oncol*. March (2018);52(3):925-32.
- [21] Kabała-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R, Jastrzębska-Stojko Ż, Stojko R, Wojtyczka RD, et al. Comparison of Two Components of Propolis: Caffeic Acid (CA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells MDA-MB-231. *Mol Basel Switz*. September (2017); 22(9).
- [22] Arkadiusz Dzedzic, Robert Kubina, Agata Kabała-Dzik, Marta Tanasiewicz. Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptotic Response of Head and Neck Squamous Carcinoma Cells (Detroit 562) by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester Derivative. (2017)
- [23] Szliszka, E. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, 941-953. (2011).
- [24] LI, H. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, 601-606. (2007).
- [25] Xavier, J. de A., Valentim, I. B., Camatari, F. O. S., de Almeida, A. M. M., Goulart, H. F., Ferro, J. N. de S., Barreto, E. de O., Cavalcanti, B. C., Bottoli, C. B. G., & Goulart, M. O. F. (2017). Polyphenol profile by UHPLC-MS/MS, anti-glycation, antioxidant and cytotoxic activities of several samples of propolis from the northeastern semi-arid region of Brazil. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1884–1893. (2017)
- [26] Mora DPP, Santiago KB, Conti BJ, de Oliveira Cardoso E, Conte FL, Oliveira LPG, et al. The chemical composition and events related to the cytotoxic effects of propolis on osteosarcoma cells: A comparative assessment of Colombian samples. *Phytother Res PTR*. March 2019;33(3):591-601.
- [27] Catchpole O, Mitchell K, Bloor S, Davis P, Suddes A. Anti-gastrointestinal cancer activity of cyclodextrin-encapsulated propolis. *J Funct Foods*. February (2018);41:1-8.
- [28] Vukovic NL, Obradovic AD, Vukic MD, Jovanovic D, Djurdjevic PM. Cytotoxic, proapoptotic and antioxidative potential of flavonoids isolated from propolis against colon (HCT-116) and breast (MDA-MB-231) cancer cell lines. *Food Res Int Ott Ont*. (2018);106:71-80.
- [29] Kapare H, Lohidasan S, Sinnathambi A, Mahadik K. Standardization, anti-carcinogenic potential and biosafety of Indian propolis. *J Ayurveda Integr Med*. June (2019);10(2):81-7.
- [30] Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Yaman SO, Akbulut K, Kilinc K, Deger O. Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell Nutr Cancer. (2015)

- [31] Fríon-Herrera Y, Díaz-García A, Ruiz-Fuentes J, Rodríguez-Sánchez H, Sforcin JM. The cytotoxic effects of propolis on breast cancer cells involve PI3K/Akt and ERK1/2 pathways, mitochondrial membrane potential, and reactive oxygen species generation. *Inflammopharmacology*. October (2019);27(5):1081-9.
- [32] Popolo, A. Antiproliferative Activity of Brown Cuban Propolis. *Natural Product Communications*, 1711 - 1716. (2009).
- [33] Li, F. Study on the Constituents of Mexican Propolis and Their Cytotoxic Activity against PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells. *J. Nat. Prod*, 623–627. (2010).
- [34] Frozza CO da S, Santos DA, Rufatto LC, Minetto L, Scariot FJ, Echeverrigaray S, et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. *Biomed Pharmacother*. July (2017);91:951-63.
- [35] Chen W, Sun Y, Lu C, Chao C. Thermal cycling as a novel thermal therapy to synergistically enhance the anticancer effect of propolis on PANC-1 cells. *Int J Oncol*. (2019).
- [36] Ebeid SA, Abd El Moneim NA, El-Benhawy SA, Hussain NG, Hussain MI. Assessment of the radioprotective effect of propolis in breast cancer patients. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. (2016).
- [37] Chang H, Wang Y, Yin X, Liu X, Xuan H. Ethanol extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy. *BMC Complement Altern Med*. December (2017);17(1):471.
- [38] Wang X, Sankarapandian K, Cheng Y, Woo SO, Kwon HW, Perumalsamy H, et al. Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complement Altern Med*. December (2016);16(1):65.
- [39] HUANG, W.-J. Propolin G, a Prenylflavanone, Isolated from Taiwanese Propolis, Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Brain. *J. Agric. Food Chem*, 7366-7376. (2007).
- [40] Kouidhi, B. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *ELSEVIER - Anaerobe*, 566-571. (2010).