

# Calidad, perfil químico y actividad biológica de propóleos antioqueños

Estudiante

Zaribey Ariana Bueno Ramírez

Director(es)

Elizabeth Cadavid Torres PhD

Codirector(es)

Erick Alejandro Meneses Ramírez PhD

Trabajo de Grado

Maestría en Ciencias Biológicas

Línea de Investigación en Biodiversidad y Conservación

Universidad CES

Medellín

octubre 2021

Contenido

-	<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>3</b>
-	<b>ARTÍCULO 1</b> .....	<b>6</b>
	<b>METHODS TO EXTRACT, QUANTIFY AND CHARACTERIZE PHENOLIC COMPOUNDS IN PROPOLIS.</b> .....	<b>6</b>
	ABSTRACT.....	6
	INTRODUCTION .....	8
	PROPOLIS .....	10
	PHENOLIC COMPOUNDS AND FLAVONOIDS .....	12
	PROPOLIS EXTRACTION .....	13
	<i>MACERATION</i> .....	15
	<i>ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION</i> .....	16
	<i>MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION</i> .....	17
	<i>SUPERCritical FLUIDS EXTRACTION (SFE)</i> .....	17
	COLORIMETRIC TESTS .....	19
	<i>PHENOLIC COMPOUNDS:</i> .....	19
	<i>PRESENCE OF ANTIOXIDANT SUBSTANCES:</i> .....	21
	SPECTROPHOTOMETRY.....	21
	PHENOLIC COMPOUNDS: .....	22
	ANTIOXIDANT ACTIVITY .....	25
	CHROMATOGRAPHY .....	28
	<i>Thin Layer Chromatography (TLC)</i> .....	30
	<i>HPLC</i> .....	32
	<i>Gas Chromatography (GC)</i> .....	32
	SPECTROMETRIC AND SPECTROSCOPIC METHODS.....	33
	ANEXOS .....	35
	CONCLUSIONS .....	37
	REFERENCES .....	37
-	<b>ARTÍCULO 2:</b> .....	<b>58</b>
	<b>PERFIL QUÍMICO, ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y CRITERIOS DE CALIDAD DE PROPÓLEO RECOLECTADOS EN CUATRO SUBREGIONES DE ANTIOQUIA-COLOMBIA PARA SU OFERTA COMO INGREDIENTE NATURAL</b> .....	<b>58</b>
	<b>RESUMEN</b> .....	<b>58</b>
	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>59</b>
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
	<i>Manipulación de las muestras</i> .....	59
	<i>Pruebas de calidad en propóleo</i> .....	60
	<i>Perfil químico de extractos etanólicos de propóleo</i> .....	60
	<i>Actividad biológica</i> .....	61
	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>61</b>
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>66</b>
	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>67</b>
-	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>69</b>
-	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>69</b>

## - Introducción general

### *Propóleo*

Propóleo es un término derivado del griego antiguo, que significa pro- en defensa y polis- ciudad. También es el nombre genérico<sup>12</sup> de una sustancia resinosa producida por las abejas con múltiples aplicaciones. Aunque para 1979 la mayoría de los estudios sobre el propóleo no eran fácilmente accesibles<sup>3</sup>, actualmente se publica con regularidad sobre este producto y sus extractos<sup>4-10</sup>. El propóleo es una mezcla compleja y resinosa de: exudados de plantas, en conjunto con la secreción cerosa de las abejas. Cuenta con extensas publicaciones sobre su perfil químico y composición<sup>11-13</sup>, procesos óptimos de extracción<sup>4,8,14-16</sup>, marcadores de origen<sup>2,5</sup> y actividades biológicas como: antioxidante<sup>4-10</sup>, antimicrobiano<sup>17-21</sup>, anti-inflamatorio<sup>11,22</sup> y anticancerígeno<sup>5,14</sup>. Dichos estudios además comprueban que, dependiendo de su geolocalización, se evidencia variación en la composición. Por ejemplo, los ensayos realizados por Costa y colaboradores<sup>10</sup> y Ribeiro y colaboradores<sup>23</sup> donde se comparan propóleos recolectados en distintas zonas del mismo país, muestran discrepancias desde su coloración, hasta contenido de flavonoides y nivel de actividad antioxidante y anticancerígena.<sup>22,24,25,25-27</sup>. Bankova y sus colaboradores sugirieron que la recolección de resinas para formar propóleos puede estar motivada por factores estacionales<sup>28</sup>, y sus propiedades con la presencia de compuestos fenólicos<sup>12,29</sup>. En estudios anteriores<sup>24,30-32</sup> se observó la utilización del propóleo en la naturaleza como sustancia de defensa. El propóleo cumple funciones que ayudan a la supervivencia de las abejas y éstas son selectivas en cuanto a la fuente de obtención. Ni todas las plantas a las que tienen acceso son utilizadas para este fin, ni todas las abejas de la colonia las recolectan<sup>3,12</sup>. La mayor parte del propóleos proviene de fuentes vegetales<sup>33,34</sup>, con una composición de aproximadamente: 50% de resina, 30% de ceras, 10% de compuestos volátiles, 5% de polen y pequeñas cantidades de sustancias inertes como la arena<sup>3,35</sup>. Esta combinación de resinas es extraordinariamente variable, lo que hace que muestras de diferente origen geográfico puedan tener composiciones químicas disímiles<sup>21,28,36</sup>.

### *Compuestos fenólicos (Flavonoides y no-flavonoides)*

Los compuestos fenólicos están presentes en el propóleo principalmente como polifenoles. Se trata de sustancias químicas con varios anillos aromáticos y uno o más grupos hidroxilos adheridos a ellos. Los grupos hidroxilos suelen aumentar la polaridad de estas moléculas<sup>37</sup>. Podemos dividir los polifenoles del propóleos en términos generales como no-flavonoides y flavonoides<sup>38,39</sup>. Estos últimos se encuentran entre los grupos más estudiados de sustancias bioactivas en las plantas, debido a sus reconocidas actividades fisiológicas<sup>12</sup>. El término flavonoide proviene del latín "flavus", que significa amarillo, que es el color de varios flavonoides purificados. Se encuentran en la fracción resinosa de los extractos de propóleos<sup>40</sup>, constituyendo un amplio grupo de sustancias que comparten una estructura base de C6-C3-C6<sup>41</sup>. Los flavonoides como la Quercetina, Kamferol e Isorhanmentina son los principales componentes de la mayoría de los propóleos y por ello se les atribuyen las actividades biológicas comprobadas contra enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias y cancerígenas<sup>42-44</sup>. Se han encontrado más de 300 compuestos naturales en el propóleo<sup>45</sup>. Sin embargo, los compuestos fenólicos no flavonoides como el ácido gálico, CAPE (éster de fenetilo del ácido cafeico) y Artepilina C han sido menos estudiados. A pesar de ello, algunos autores han realizado avances donde destacan sus actividades biológicas esenciales como anticancerígenos y antiinflamatorios<sup>14,46,47</sup>.

### *Actividad Biológica*

El término actividad biológica usualmente se refiere a la actividad farmacológica o terapéutica en un organismo vivo. La complejidad química del propóleo le otorga un amplio espectro de propiedades. Las más reportadas son las de efecto antioxidante y antimicrobiano<sup>48</sup>. En los estudios con propóleo se comprueba la presencia de antioxidantes de primera clase<sup>49</sup> y una fuerte actividad antioxidante en aquellos extractos que contienen Kamferol y éster de fenetilo del ácido cafeico<sup>50</sup>. Los ensayos sobre su actividad antimicrobiana indican que se justificaría su uso en la medicina convencional<sup>18</sup>. En cuanto a sustancias aisladas, se han destacado los estudios sobre su acción anticancerígena. El CAPE genera pérdidas del potencial de membrana mitocondrial<sup>51</sup>, inactivación de metaloproteasas de matriz<sup>52</sup> e inhibición de la proliferación celular<sup>53</sup>. La artepilina C suprime angiogénesis<sup>54</sup>, induce necrosis masiva, y supresión del crecimiento tumoral<sup>55</sup>. Por su

parte la Quercetina reduce el daño en el ADN de células no tumorales que se ven afectadas por otros quimioterapéuticos e induce a la polinucleación de las células tumorales agresivas<sup>56</sup>. Las conclusiones sobre su actividad se logran mediante ensayos biológicos in vitro, los cuales utilizan cultivos celulares humanos que crecen en monocapa y que simulan de una manera bastante precisa lo que puede estar sucediendo en un linaje celular específico y/o un tejido, respectivamente<sup>57</sup>. Xuan, Hongzhuan y colaboradores<sup>54</sup> proponen que el propóleo brasileño en altas concentraciones puede ser un agente inductor de apoptosis, por lo que debería utilizarse para la salud humana, por otro lado hay investigaciones que se centran en uno o dos principios activos aislados cromatográficamente a partir del propóleo: La artepillina C y el CAPE<sup>51,53</sup>.

### *Perfil químico*

Definir el espectro fitoquímico de una matriz biológica, no es tarea sencilla. Los métodos analíticos como la cromatografía en capa fina(TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), combinada con la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) pueden ayudar a definir mejor los perfiles de composición de los extractos de origen natural<sup>1</sup>. La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es, con mucho, la técnica más popular utilizada para cuantificar y aislar los compuestos fenólicos<sup>60,63</sup>, con esta tecnología se han separado con éxito importantes componentes del propóleos como el ácido cafeico, el ácido p-cumárico, el ácido ferúlico, el kampferol, la pinocembrina, el cafeto de fenetilo, el cafeto de isopenilo, la crisina, la galangina, el pinostrobi, el cafeto de bencilo, el ácido cafeico, el ácido abscísico, la epicatequina y la quercetina<sup>6,21,29,64-66</sup>. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protones (1H) o de carbono 13 (13C) es una técnica espectroscópica donde las señales de radiofrecuencia interactúan con momentos magnéticos de núcleos de átomos específicos. La RMN puede proporcionar información estructural detallada del átomo para prácticamente cualquier molécula orgánica<sup>67</sup>. Una caracterización completa del perfil químico del propóleos mediante técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas podría permitir responder a preguntas como las propuestas en estudios como los de Costa<sup>10</sup> y Ribeiro y otros<sup>23</sup>, donde el propóleo con un contenido menor de fenoles y flavonoides totales demostró ser más anticancerígeno.

### *Propóleos en Colombia*

La apicultura es una actividad económica del sector agrícola que se favorece por la ubicación geográfica y biodiversidad; por lo que Colombia y sus apicultores destacan en potencial<sup>68</sup>. Sin embargo, siendo una de las actividades con mayor trayectoria histórica, no ha generado avances tecnológicos ni industriales que permitan mejorar los procesos y satisfacer las demandas dentro del país<sup>69</sup>. En busca de aumentar los beneficios económicos obtenidos del propóleo, se han realizado diversos trabajos de investigación<sup>68-70</sup> donde el objetivo es impulsar de una u otra forma la capacidad de exportación del sector. Para el año 2007 se determinó la presencia de algunos flavonoides en muestras de propóleos nativos en conjunto con sus índices de oxidación<sup>71</sup>, en 2013 ya se estaba considerando la calidad microbiológica<sup>72</sup> y entre 2010 y 2018 se han reportado avances en la caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana de los propóleos antioqueños<sup>73-75</sup>. Aunque la apicultura es una práctica importante y antigua dentro del territorio, se ha identificado que muchos de los productos de colmena, incluido el propóleo, siguen siendo importados<sup>76</sup> o desechados. La incorporación en el mercado nacional e internacional del propóleo colombiano promete ser ventajosa, pero para ser competitivo debe cumplir con las exigencias de calidad establecidas por países como Brasil, El Salvador y México<sup>77</sup>, donde luego de años de investigación, se ha logrado caracterizar y elucidar los componentes contenidos en los propóleos nativos, a través de las técnicas instrumentales de separación e identificación mencionadas, comprobado la presencia de entre 5 a 70 compuestos<sup>6,25,25,78-82</sup> en sus muestras de propóleos, con actividades biológicas comprobadas.

### *Calidad del propóleo*

Teniendo en cuenta las propiedades comprobadas en los propóleos, el interés en su aplicación industrial sigue la tendencia mundial de buscar alternativas terapéuticas de origen natural<sup>1</sup>, y para asegurar calidad al consumidor, se han desarrollado normatividades de calidad para propóleos. Entre ellas, La norma brasileña (Normativa N°11, de 20 de Outubro de 2000) vigente desde el año 2000; la norma salvadoreña (NSO 67.03.01:01) que contiene iguales especificaciones a la brasileña, y la normatividad mexicana (NOM-003-SAG/GAN-2017). Todas aportan criterios de calidad válidos para evaluar los propóleos, sin embargo, carecen

de armonización y metodologías claras, lo cual vuelve compleja la comparación entre propóleos de distinto origen con normatividades diferentes.

En Colombia no se cuenta ni con una normatividad nacional ni con suficientes estudios que validen las propiedades biológicas del propóleo obtenido de las diferentes regiones biogeográficas, lo cual limita su aprovechamiento, como materia prima, además, aunque ya se cuentan con avances en caracterización, aún no se tiene un perfil químico completo de los compuestos contenidos en los propóleos, para lo que es necesario el acoplamiento de metodologías como TLC y HPLC con HRMS y NMR.

En Antioquia, región donde la apicultura es una de las cadenas productoras más pequeñas<sup>76</sup>, el grupo Colciencias realizó una convocatoria regional de cierre de brechas dentro del programa nacional de ciencia, tecnología e innovación en ciencias agropecuaria. El proyecto ganador fue el titulado “Generación de valor agregado de propóleos, en la cadena productiva antioqueña”, bajo el marco de dicho proyecto se decide realizar la presente investigación aportando al objetivo específico sobre caracterización de actividad biológica y propiedades fisicoquímicas de los propóleos. Se debe destacar que las asociaciones de apicultores seleccionadas consideran su propóleo como un material de desecho. Una de las formas de potenciar la introducción del propóleo o sus sustancias aisladas en el sector económico, es generando publicaciones sobre pruebas de calidad, que propongan desde ensayos de baja complejidad, buscando la oportunidad de ser replicados en espacios de trabajo sencillos por los mismos apicultores luego de capacitaciones específicas; hasta ensayos más sofisticados que permitan generar resultados confiables para la industria ya que requieren de laboratorios que cuenten con robustez en cuanto a reactivos, estándares, personal calificado y, equipos de análisis. Por otro lado, avanzar en la estandarización de metodologías para evaluar el perfil químico y/o actividad biológica de propóleos nativos colombianos promete ser un aporte de interés científico y comercial. Es por ello que el objetivo general de este informe es evaluar la calidad bioquímica de propóleos colombianos colectados en cuatro subregiones del departamento de Antioquia.

Para lograr dicho objetivo se describen en las metodologías, desde la revisión bibliográfica, la manipulación de las muestras, pasando por las pruebas de calidad, evaluación del perfil químico mediante cromatografía de capa fina y cromatografía líquida hasta la evaluación de la actividad antioxidante y, antibacteriana de las muestras obtenidas. El artículo de revisión de tema titulado “Methods to extract, quantify and characterize phenolic compounds in propolis” (Métodos para extraer, cuantificar y caracterizar compuestos fenólicos en propóleos), muestra cómo se concluyeron las condiciones óptimas de extracción y dirigió la elección de las metodologías de evaluación de calidad y perfil químico a realizar. En forma complementaria se presenta el artículo de investigación titulado: “Perfil químico, actividad biológica y criterios de calidad de propóleo recolectados en cuatro subregiones de antioquia-colombia para su oferta como ingrediente natural”, que permitió obtener resultados confiables y robustos para generar conclusiones sobre la calidad de los propóleos de cuatro corregimientos participantes, los cuales no habían sido fuente de estudio anteriormente, además con esta información se logró generar un plan de capacitaciones destinadas a los apicultores, generando interés en el cuidado y recolección, de este producto de colmena.

## - Artículo 1

El siguiente artículo fue preparado para la revista cuya información se indica a continuación							
Título de la revista	Revista Actualidades Biológicas						
Consulta de instrucciones a los autores	<a href="https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/about/submissions">https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/about/submissions</a>						
Sección de la revista para la cual se aplica	<b>Revisiones</b>						
Estado del artículo	No sometido	<input checked="" type="checkbox"/>	Sometido	<input type="checkbox"/>	Aceptado para pub.	<input type="checkbox"/>	Publicado
Observaciones	Para la revista se solicita el envío de las tabla e imágenes por separado, para este informe se anexan dentro del texto.						

1

### 1 Methods to extract, quantify and characterize phenolic compounds 2 in propolis.

3 *Zaribey A. Bueno, Erick A. Meneses*

4 Calle 17 #40B 320.; apto 1206. Av Pobaldo. Medellín – Colombia

5 Email: [bueno.Zaribey@uces.edu.co](mailto:bueno.Zaribey@uces.edu.co)

6 Email: [emeneses@ces.edu.co](mailto:emeneses@ces.edu.co)

7 Universidad CES, Colombia-Medellín

### 8 ABSTRACT

9 Chemical studies on propolis, especially those describing characterization and quantification  
10 of phenolic compounds and antioxidant activity, have recently gained in importance. Most  
11 of these studies look forward to finding molecules responsible for the biological activity that  
12 may add commercial or scientific value to propolis collected from a specific geographic  
13 region. However, there is not a global agreement about methodologies to extract, characterize  
14 and quantify substances in propolis. These lead to a plethora of different methods to achieve

15 this goal and to a disparity of official regulations to assess propolis quality. In this document,  
16 we will describe current methods to extract, quantify and characterize chemical substances  
17 present in propolis. Also, we will describe propolis extraction techniques that may be suitable  
18 for obtaining raw material substances.

19 We review some already standardized methods that use colorimetric and spectrophotometric  
20 assays. These techniques permit us to measure the antioxidant activity of propolis and also,  
21 to quantify some metabolites of interest such as flavonoids or phenols. Here we describe  
22 some methods extensively applied in propolis characterization and include chromatographic  
23 and spectroscopic techniques. Regarding quantification techniques, this review suggests the  
24 use of representative compounds in propolis composition as reference standards and also, to  
25 run different complementary tests to assess antioxidant properties. Concerning  
26 chromatographic methods, we suggest complementing these with spectrometric ones, in  
27 order to have a reliable chemical characterization of propolis compounds. We describe  
28 different methods, from the simplest to the most complex, used to extract or characterize  
29 propolis compounds.

30 Key Words: Chromatography, Flavonoids, Propolis Regulations ,Spectrometry, Spectroscopy,  
31 Super Critical Fluids

32

## 33 Métodos de extracción, cuantificación y caracterización de los 34 compuestos fenólicos del propóleo.

### 35 RESUMEN

36 Los estudios químicos sobre el propóleo, especialmente los que describen la  
37 caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, han  
38 cobrado importancia recientemente. La mayoría de estos estudios buscan encontrar  
39 moléculas responsables de la actividad biológica que puedan añadir valor comercial o

40 científico a los propóleos recogidos en una región geográfica específica. Sin embargo, no  
41 existe un acuerdo global sobre las metodologías para extraer, caracterizar y cuantificar las  
42 sustancias del propóleo. Esto lleva a una plétora de métodos diferentes para lograr este  
43 objetivo y a una disparidad de normativas oficiales para evaluar la calidad del propóleo. En  
44 este documento, describiremos los métodos actuales para extraer, cuantificar y caracterizar  
45 las sustancias químicas presentes en el propóleo. Asimismo, describiremos las técnicas de  
46 extracción de propóleos que pueden ser adecuadas para la obtención de sustancias de la  
47 materia prima.

48 Revisaremos algunos métodos ya estandarizados que utilizan ensayos colorimétricos y  
49 espectrofotométricos. Estas técnicas permiten medir la actividad antioxidante del propóleo y  
50 también, cuantificar algunos metabolitos de interés como los flavonoides o los fenoles. Aquí  
51 se describen algunos métodos ampliamente aplicados en la caracterización de los propóleos  
52 e incluyen técnicas cromatográficas y espectroscópicas. En lo que respecta a las técnicas de  
53 cuantificación, esta revisión sugiere el uso de compuestos representativos en la composición  
54 del propóleo como estándares de referencia y también, la realización de diferentes pruebas  
55 complementarias para evaluar las propiedades antioxidantes. En cuanto a los métodos  
56 cromatográficos, se sugiere complementarlos con los espectrométricos, para tener una  
57 caracterización química fiable de los compuestos del propóleo. Describimos diferentes  
58 métodos, desde los más sencillos hasta los más complejos, utilizados para extraer o  
59 caracterizar los compuestos del propóleo.

60 Palabras Clave: Cromatografía, Espectrometría, Espectroscopia Flavonoides , Fluidos supercríticos,  
61 Regulación

## 62 INTRODUCTION

63 Although by 1979, most of the propolis studies were not very accessible(Ghisalberti, 1979),  
64 nowadays there are several published studies on its composition(V. S. Bankova et al., 1983;



65 Fachri, B . Rizkiana, M. Muharja, 2020; Sousa et al., 2020), extraction processes  
66 antimicrobial(Antonia et al., 2017; Moncayo Luján et al., 2018; Sosa-López et al., 2016; Tolosa, L  
67 . Cañizares, 2002; Yuan et al., 2020), anti-inflammatory(Alencar et al., 2007; Sousa et al., 2020)  
68 and anticarcinogenic(Kapare et al., 2019; Maraschin et al., 2016) activities. These studies,  
69 especially those describing propolis extracts with engaging biological activities, help to  
70 generate added value to beehive products(Céspedes, 2017; Krell, 1996). Some countries like  
71 Brazil(Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 2000), Mexico(DOF- Diario  
72 Oficial de la Federación, 2017), El Salvador(Norma salvadoreña NSO 67.03.01:01 calidad de  
73 propoleo crudo, 2003), Cuba(Ministerio de salud y acción social, 2008), Argentina(Normalización,  
74 2000), China(Propolis, 2009), Russia(Aleksandrova, 1972) and Bulgaria(Bulgaria, n.d.) have  
75 established regulations to define minimum quality standards in commercial propolis.  
76 However, defining and assessing quality in propolis is somehow complicated due to its  
77 geographical and seasonal variability(Yuan et al., 2020). Despite this, it is necessary to have a  
78 robust and reliable chemical characterization of a natural substance that is usually involved  
79 in several pharmaceutical products(V. Bankova et al., 2019). To meet these requirements, the  
80 use of chromatography(Costa et al., 2020), ecologically-friendly extraction techniques such as  
81 supercritical fluid, together with spectroscopic(Maraschin et al., 2016) tools, have been used  
82 together to improve and assess propolis quality(Biscaia & Ferreira, 2009). The use of these  
83 techniques has shown promising results on propolis quality assessment, with not so much  
84 impact, so far, in any official propolis quality regulations.

85 Propolis physicochemical characterization takes into account waxes and ash contents,  
86 humidity, organoleptic characteristics such as colour, taste, odour, and propolis texture(Peña,  
87 2008; Stan et al., 2011). However, some suggested propolis classifications and official quality

88 regulations guides give particular importance to the concentration of phenolic compounds  
89 and the presence of antioxidants in propolis(V. Bankova et al., 2000; Departamento de Inspeção  
90 de Produtos de Origem Animal, 2000; DOF- Diario Oficial de la Federación, 2017; Machado et al.,  
91 2016). For the reasons mentioned above, correct identification and quantification of phenols  
92 and flavonoids in propolis are an active research subject(Kubiliene et al., 2015; Pavlovic et al.,  
93 2020; Stan et al., 2011; Yuan et al., 2020). Nevertheless, recent studies by Costa(Costa et al.,  
94 2020) et al. and Ribeiro et al.(Ribeiro et al., 2012) did not find a direct relationship between  
95 total phenolic compounds concentration and biological activity. The identification of  
96 antioxidant compounds in propolis may help eventually to optimize their extraction. Every  
97 year there are a significant amount of articles published on the subject, presenting a vast  
98 arrange of procedures and results, sometimes apparently contradictory. This review looks  
99 forward to reporting the general characteristics of propolis and its biologically active  
100 compounds.

101 To know the usual compounds present in propolis helps to choose those extraction techniques  
102 to be used to isolate them. This review will walk through extraction and quantification  
103 methodologies already standardized for propolis, used either traditionally or for regulation  
104 purposes. We will also discuss recent modern techniques for chemical characterization of  
105 propolis compounds, its advantages and limitations, presenting options according to the  
106 scope of the desired pharmaceutical function.

## 107 REVIEW PROTOCOL

108 In order to know the methodologies currently used and accepted to evaluate methods of  
109 extraction, characterization and quality of propolis, it was decided to use the Scopus platform  
110 to know since which year more than 30 research articles are published on average, and also

111 whose years coincide with a low percentage of publications of systematic reviews, finding  
112 that a period of time between 2014 and 2020 meets this characteristic. Subsequently, the  
113 inclusion criterion for the selection of articles was established as those that had been  
114 published through reliable databases such as those accessible from the platform of the  
115 Founders Library of the CES University and whose titles used two or more words from the  
116 following list: Propolis, phenolic compounds, flavonoids, extraction, colorimetric tests,  
117 spectrophotometry, spectrophotometry, antioxidant activity, chromatography, antimicrobial  
118 activity, spectrometry, spectroscopy, Colombia, regulations.

119 Finally, texts were excluded if they presented publication date before 2014, presence of  
120 incomplete methodologies and/or inconsistencies in the references or conclusions.

## 121 PROPOLIS

122 Propolis is a term derived from ancient Greek, meaning pro- in defence and polis- city. It is  
123 also the generic name(Funari et al., 2016) of a resinous substance produced by bees. They  
124 result from the mix of resins collected from selected plants near to the beehive (Krell, 1996)  
125 with bee's secreted waxes. Bankova and collaborators suggested that propolis-resins  
126 collection may be motivated by seasonal factors(V. Bankova et al., 2000), and its properties  
127 are related to the presence of phenolic compounds(V. Bankova et al., 2019; V. S. Bankova et al.,  
128 1983). Former studies(Aleksandrova, 1972; Baier, 1969; Barre, 1942; Mobus, 1972) observed the  
129 use of propolis as a coat for the development of bees' offspring, as a defence substance against  
130 microbes and invading insects, and as a tool to seal small cracks in the beehive, in order to  
131 keep constant its temperature and also as a protection factor against external sunlight  
132 radiation. Hence, its name comes from its functions and not from the botanical origin as  
133 other beehive products(V. Bankova et al., 2000).

134 Propolis fulfills functions that help beehive success; perhaps that is the reason why bees are  
135 selective about the resin collection source(V. S. Bankova et al., 1983; Ghisalberti, 1979). Most  
136 of the propolis comes from vegetal sources(Rösch, 1927; VANSELL & BISSON, 1940), with a  
137 composition of roughly: 50% resin, 30% waxes, 10% volatile compounds, and 5% pollen  
138 and small quantities of inert substances like sand(Burdock, 1998; Ghisalberti, 1979). This  
139 combination is extraordinarily variable, causing that samples of different geographical origin  
140 may have dissimilar chemical compositions(V. Bankova et al., 2000; Margeretha et al., 2012;  
141 Yuan et al., 2020). Propolis can have different colours, which vary from green through red,  
142 yellow, to light and dark brown, coupled with a characteristic resinous smell due to the  
143 presence of essential terpenoid like substances found in propolis essential oils. Propolis  
144 usually shows a strong interaction with the oils and proteins of the skin, resulting in their  
145 adhesive properties(Burdock, 1998); this is the reason why propolis is also called bee-glue.  
146 Shows very few adverse effects in human health(Sforcin, 2007), with sporadic cases of  
147 propolis hypersensitivity after a topic or oral administration in elderly people(BasistaSoftys,  
148 2013; Cho et al., 2011).

#### 149 PHENOLIC COMPOUNDS AND FLAVONOIDS

150 Propolis phenolic compounds are mainly present as polyphenols. These are chemical  
151 substances with several aromatic rings with one or more hydroxy groups attached to them.  
152 Hydroxy groups also usually increase polarity to these molecules(Marina et al., 2008). We can  
153 coarsely divide polyphenols in propolis as non-flavonoids and flavonoids(Creus, 2004; Martín  
154 Gordo, 2018). The latest compounds are among the most studied groups of bioactive  
155 substances in plants, due to their recognized physiological activities(V. S. Bankova et al.,  
156 1983). The term flavonoid comes from the Latin "flavus," which means yellow, which is the  
157 colour of several purified flavonoids. They are found in the resinous fraction of propolis

158 extracts(Sforcin, 2007), constituting a broad group of substances that share a base structure of  
159 C6-C3-C6(Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011). Flavonoids are soluble in hot water, in low  
160 molecular weight alcohols and several polar organic solvents. They oxidize quickly, reason  
161 by which they may exhibit antioxidant activity(Tránsito López, 2002).

162 As illustrated by Hossain, M. K. et al(Hossain et al., 2016) in **Figure 1**, flavonoids can be  
163 subdivided into six groups, with a large number of compounds in each group.

164 By 1998 about 8000(Bravo, 1998) plant flavonoids were isolated and identified. Flavonoids  
165 are the major components in most of the propolis. These types of compounds also have  
166 several biological activities(Andersen & Markham, 2006; Kubiliene et al., 2015; Sumalatha et al.,  
167 2012). More than 300 natural compounds, including flavonoids, have been found in  
168 propolis(Svečnjak et al., 2020). However, phenolic non-flavonoid propolis compounds have  
169 been less studied. Despite this, some authors highlight essential biological activities of  
170 phenolic non-flavonoid compounds(Alamgir, 2018; Ribeiro et al., 2012), and specific biological  
171 activities of these compounds appear in recent studies(Kapare et al., 2019; Tolba et al., 2013;  
172 Yokoyama et al., 2014).

### 173 PROPOLIS EXTRACTION

174 The increasing commercial and scientific interest in raw propolis has led to advances in  
175 technologies to improve their properties beyond their traditional uses(Kubiliene et al., 2015).  
176 Raw propolis is not common in regular industrial or pharmaceutical use, and instead, propolis  
177 extracts are preferred. A good quality propolis extract must comply with several factors. In  
178 this review, we will put an accent on three crucial factors. Firstly, the solvent: Solvent  
179 selection will depend on the physical-chemical characteristics of the compounds that we  
180 desire to extract.

181 To a great extent, the most used solvent to extract propolis compounds is ethanol(V. Bankova  
182 et al., 2019; Costa et al., 2020; Oroian et al., 2020; Pavlovic et al., 2020; Saito et al., 2020; Yuan et  
183 al., 2020). This solvent permits the extraction of components in the resinous fraction. It is a  
184 solvent with a relatively low cost, innocuousness, that shows a good extraction efficiency.  
185 Ethanol, however, may have some disadvantages, such as a robust residual flavour and some  
186 limitations of application in cosmetics and pharmaceutical industry(Kubiliene et al., 2015).  
187 Other substances as water(Soltani et al., 2020), methanol(Saito et al., 2020), hexane(Saito et al.,  
188 2020) and even hexane and chloroform fractions of the ethanolic extracts(Alencar et al., 2007)  
189 can provide propolis extracts. In some studies, a binary solution of ethanol-water helps to  
190 obtain propolis extract. Here we have another factor to consider in propolis extraction;  
191 Secondly: ethanol-water composition of the extraction solvent. Some authors have found that  
192 the use of ethanol-water solutions may improve the isolation of phenolic compounds in  
193 propolis. Some works have reported that the extraction of flavonoids and phenols improves  
194 by using 95 and 99.5% ethanol solution(Chen et al., 2019). Other studies, supported in  
195 mathematical models(Margeretha et al., 2012), have found that a 70% ethanol-water solution  
196 the ideal solvent composition to extract flavonoids and phenols in propolis. In general,  
197 different studies reports mixed results related to propolis extraction using organic solvents.  
198 However, Bankova and Alencar, with extensive studies on the subject, suggest a 70%(V.  
199 Bankova et al., 2000, 2019; Trusheva et al., 2007) and 80%(Alencar et al., 2007; Park et al., 2007;  
200 Ribeiro et al., 2012) ethanol solution, respectively, to maximize phenol extraction from  
201 propolis. These results agree with the fact that some of the most polar components present in  
202 propolis are soluble in water and less polar ones in ethanol(Soltani et al., 2020). Using ethanol-  
203 water mixtures, Alencar et al(Alencar et al., 2007) and Biscaia & Ferreira(Biscaia & Ferreira,  
204 2009) have obtained extracts rich in phenolic compounds of different polarities, and

205 Bankova(V. Bankova et al., 2019) et al. obtained propolis extracts with lower content of waxes,  
206 therefore improving propolis extract quality. Most of the standardized quality criteria for  
207 propolis extracts allow exclusive use of ethanol(Departamento de Inspeção de Produtos de  
208 Origem Animal, 2000) or its mixture with water(Ministerio de salud y acción social, 2008;  
209 Normalización, 2000) as extracting solution. Only the Mexican regulation uses 70% ethanol-  
210 water as extraction mixture(Diario Oficial de la Federación, 2017).

211 When a particular metabolite is of interest, the solvent composition also plays an important  
212 role. Extracts at 80% ethanol show a higher presence of kaempferide, acacetin, and  
213 isorhamnetin, while extracts at 60% ethanol are richer in isosakuranetin, quercetin and  
214 kaempferol. On the other hand, extracts of 70% ethanol have an increased amount of  
215 pinocembrin and sakuranetin(Gómez-Caravaca et al., 2006). Alternative solvents help to  
216 optimize the processes, as in the case of olive oil or polyethylene glycol 400, that may  
217 improve the extraction of ferulic and caffeic acids. However, in the latter case, the  
218 concentration of total phenolic compounds does not differ significantly from those in ethanol  
219 extracts(Kubiliene et al., 2015); and Thirdly: the final factor considered here is the extraction  
220 technique and the technology used in the extraction process. The use of ecological-friendly  
221 technologies such as extraction using supercritical CO<sub>2</sub> may have a positive impact on  
222 propolis extract quality with a relatively high increase in operation costs(Jang et al., 2009).  
223 Here we will describe some extraction techniques suitable for propolis selective compound  
224 extraction.

## 225 **MACERATION**

226 Maceration is a traditional, simple, and low-cost technique used in research and industrial  
227 processes. It consists of adding a volume of solvent in a container with the propolis. Debris-  
228 Propolis, free from impurities, is ground and is further agitated continuously in the solvent

229 for a given time(Moncayo Luján et al., 2018). Agitation times reported in the literature varies  
230 from hours(Maraschin et al., 2016), days(V. Bankova et al., 2019; Chen et al., 2019; Moncayo Luján  
231 et al., 2018) to weeks(Céspedes, 2017; De Lima et al., 2016; Kubiliene et al., 2015; Margeretha et  
232 al., 2012), basically in search of the complete extraction of the desired compounds. Due to the  
233 long extraction times required in maceration, the use of other technologies such as  
234 microwave-assisted extraction(Trusheva et al., 2007), ultrasonic-assisted extraction(Trusheva  
235 et al., 2007), supercritical fluid extraction(Machado et al., 2016) can be an option. These studies  
236 show that traditional maceration provides the best yields in the amount of phenolic  
237 compounds extracted(Moncayo Luján et al., 2018). However, the relatively long extraction time  
238 in maceration, make it undesirable for specific industrial processes.

#### 239 **ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION**

240 Ultrasound-assisted extraction facilitates the breakdown of intermolecular interactions by  
241 enhancing mass transfer and increasing capillary effects. These facilitate solvent extraction  
242 without altering or destroying the substances in the extracted material(Corona-Jiménez et al.,  
243 2016). Ultrasound has been one of the most used extraction methods used in propolis,  
244 reporting in all cases acceptable yields. Sonication shows a high selectivity in periods varying  
245 between 10 min and 1h(V. Bankova et al., 2019; De Lima et al., 2016; Machado et al., 2016;  
246 Moncayo Luján et al., 2018; Oroian et al., 2020; Yuan et al., 2020), with an optimal value of 30  
247 min for the extraction of phenols and flavonoids in propolis(Oroian et al., 2020). When  
248 compared with other methods, it has shown high extraction levels of aromatic compounds(De  
249 Lima et al., 2016). Sonication of propolis samples, if done correctly, i.e., avoiding sample  
250 heating, shows a low rate of chemical degradation(Trusheva et al., 2007). Also, it is the only  
251 technique approved by some regulations to obtain propolis solvent-extracts(Diario Oficial de  
252 la Federación, 2017).



253 **MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION.**

254 Microwave radiation may improve the extraction capacity of the solvent in propolis extracts.  
255 This type of extraction makes use of microwave ovens specially designed for this  
256 purpose(Castro, 2014). This technique, after maceration, is the one that has reported the  
257 highest extraction yields of phenolic compounds, reporting no significant differences  
258 between extracts obtained with maceration. Microwave-assisted extraction provides extracts  
259 with the right concentration of phenolic compounds and antioxidant capacity(Moncayo Luján  
260 et al., 2018) comparable to maceration extracts. The microwave-assisted extraction of  
261 flavonoids and phenols in propolis is optimal at 30 minutes, as described elsewhere(Margeretha  
262 et al., 2012). It also helps to isolate antioxidants from the sample by using a minimum amount  
263 of solvent(Ballard et al., 2010). Despite this, the selectivity of the extraction is lower when  
264 increasing the radiation cycles, presenting undesired amounts of waxes and decreasing the  
265 percentage of active components due to thermal degradation(Trusheva et al., 2007). Pellati et  
266 al(Pellati et al., 2013) show that controlled and optimized conditions of temperature, solvent  
267 composition, pressure and time on microwave-assisted extractions, avoid degradation,  
268 obtaining comparable results with traditional extractions. However, in microwave-assisted  
269 extraction, there are certain conditions such as temperature and pressure, that must be kept  
270 under control to avoid unwanted consequences on the sample.

271 **SUPERCRITICAL FLUIDS EXTRACTION (SFE)**

272 The basis of this technique consists of using a pure or a mix of compounds, at supercritical  
273 conditions, that will perform the extraction. A substance at supercritical conditions is a fluid  
274 that is as dense as a liquid, with gas-similar properties like the capacity to fill any volume.  
275 Supercritical fluids can, in a short time, permeate and diffuse into a porous solid matter. In  
276 this way, SFE can dissolve the components present in a porous sample, i.e. natural product,

277 with high selectivity. This technique shows low risk of degradation of the extracted  
278 compounds and, in most of the cases, at room conditions, manages to produce a free-solvent  
279 product with solid-pulverized texture. These are the reasons why extraction using  
280 supercritical fluids improves extract quality in most of the cases(Fachri, B . Rizkiana, M.  
281 Muharja, 2020; Sousa et al., 2020). However, this technique requires optimizing operation  
282 parameters such as temperature, pressure, solvent extraction flow rate, sample particle size  
283 and co-solvent selection. Fortunately, there are already reliable studies of extraction of  
284 propolis using supercritical fluids. Some SFE methods use small amounts of a modifier or  
285 co-solvent. This co-solvent can be 1% of ethanol in CO<sub>2</sub>, improving the performance of the  
286 extraction(Biscaia & Ferreira, 2009; Fachri, B . Rizkiana, M. Muharja, 2020; Machado et al., 2016;  
287 Monroy et al., 2018; Sousa et al., 2020).

288 An essential difference with the before mentioned methods and SFE is that SFE can be used  
289 to extract different types of molecules selectively. Extraction selectivity is a real asset when  
290 we desire to perform an efficient extraction of substances looking forward to selecting  
291 compounds with a specific biological activity(Sousa et al., 2020).

292 Propolis extraction by supercritical fluids shows a lower total yield compared with traditional  
293 extraction methods. However, there are SFE methods that are optimized to extract flavonoids  
294 selectively(Machado et al., 2016; Saito et al., 2020). According to Machado(Machado et al., 2016)  
295 et al., some SFE methods used in propolis can extract undesirable substances such as waxes.  
296 In this case, a two-step supercritical fluid extraction has been proposed(Biscaia & Ferreira,  
297 2009). In the first extraction step takes the extraction of non-polar compounds such as waxes  
298 and essential oils; and then, in a second extraction step, by modifying supercritical fluid  
299 composition, more polar substances, such as flavonoids are obtained. The use of SFE is

300 advisable when operations cost are not economically prohibitive, and there is a need to  
301 concentrate and extract specific compounds(Monroy et al., 2018).

302 Once the propolis extracts are ready, quality and characterization tests come next. Here we  
303 can go from relatively simple colorimetric quantifications of certain compounds to more  
304 sophisticated ones that may use high-performance chromatographic techniques coupled with  
305 spectroscopic measurements.

### 306 COLORIMETRIC TESTS

307 Traditional qualitative methods use simple laboratory techniques to determine substances in  
308 a short time. Some of these tests rely on colorimetric assays. Most of these assays consist of  
309 adding a reagent to the solution and monitoring solution colour changes or the formation of  
310 a coloured precipitate mediated by the presence of the molecules of interest.

311 It is not common to include colorimetric tests in propolis characterization studies or propolis  
312 quality regulations since there are more reliable quantitative or advanced techniques that  
313 regulatory agencies can use to characterize raw-propolis or propolis extracts (Departamento  
314 de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 2000; Diario Oficial de la Federación, 2017).

### 315 PHENOLIC COMPOUNDS:

316 Here we will describe some colorimetric tests used in search of phenolic compounds in  
317 propolis extracts.

318 *Ferric Chloride Test:* Add a few (2-3) drops of 5% FeCl<sub>3</sub> reagent into 1mL of the extract. If  
319 a blue, green or violet colour is present, it is considered positive for the presence of  
320 phenols(Vimalkumar et al., 2014); if the colour does not show up, some protocols recommend  
321 to add 1 to 5 drops of aqueous 0.5M sodium bicarbonate(Soloway & Wilen, 1952)

322 *Lead acetate test:* To 3mL of extract, add 3mL of 10% lead acetate solution. The formation  
323 of a white precipitate indicates the presence of phenolic compounds. The formation of a

324 yellow precipitate indicates the presence of flavonoids. The appearance of a reddish-orange  
325 colour indicates the presence of flavanones.(Vimalkumar et al., 2014)

326 *Diluted iodine solution test:* To 3 mL of extract, add a few drops of diluted iodine solution at  
327 0.025g/mL. The formation of a transient red colour indicates the presence of phenolic  
328 compounds.(Vimalkumar et al., 2014)

329 *Sodium Hydroxide Test:* To 1 mL of extract, add 1 ml of 20% sodium hydroxide. The  
330 formation of orange, green, or dark brown colour indicates the presence of phenolic  
331 compounds.(Norma salvadoreña nso 67.03.01:01 calidad de propoleo crudo, 2003)

332

333 FLAVONOIDS:

334 *Ammonia test:* 5 mL of diluted ammonia solution is added to a small sample of the propolis  
335 extract, followed by the addition of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The formation of yellow coloration  
336 in the mix indicates the presence of flavonoids.(Vimalkumar et al., 2014)

337 *Shinoda's test:* Use 5 ml of propolis extract dissolved in 95% ethanol. Then add a few  
338 fragments of magnesium ribbon and a few drops of concentrated HCl, some authors also  
339 recommend warming the sample. The test is positive for phenols if orange-yellowish tones  
340 are evident and for flavonoids if magenta colour is present. If chalcones and aurones are  
341 exclusively present in the sample, the solution may not show any colour change(Sumalatha et  
342 al., 2012).

343 *Zinc hydrochloride test:* A pinch of zinc powder is added to the extract, followed by the  
344 addition of concentrated hydrochloric acid. The appearance of the magenta colour indicates  
345 the presence of flavonoids.(Vimalkumar et al., 2014)

346 *Alkaline reagent test:* Add to the extract a few drops of 20% sodium hydroxide. The  
347 formation of a bright yellow colour, which becomes less colourful with the addition of a few  
348 drops of dilute acetic acid, indicates the presence of flavonoids.(Sumalatha et al., 2012)

349 *Ferric chloride test:* Add a few drops of a pH 7.0 ferric chloride solution to the extract, and  
350 reddish-black colour forms, indicating the presence of flavonoids(Vimalkumar et al., 2014).

#### 351 PRESENCE OF ANTIOXIDANT SUBSTANCES:

352 *Oxidation index:* add 2mL of the propolis extract to 48mL of distilled water. Take 0.5mL of  
353 the diluted extract, add 0.5mL of distilled water and 1mL of 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, shake the solution  
354 for 1min, cool it in an ice bath, then add 50 µL of 0.1N KMnO<sub>4</sub> solution. Then, measure the  
355 time that takes to lose the magenta coloration against a white background(Norma salvadoreña  
356 nso 67.03.01:01 calidad de propoleo crudo, 2003; delgado aceves et al., 2018; dof- diario oficial de  
357 la federación, 2017; grosso et al., 2007). Some regulations set a maximum of 22 seconds for the  
358 colour to disappear as a quality parameter(Diario Oficial de la Federación, 2017)

359 If only qualitative tests are selected, it is essential to select at least two different techniques  
360 or methods in order to confirm the results(Soloway & Wilen, 1952; Sumalatha et al., 2012;  
361 Vimalkumar et al., 2014).

362 Several propolis regulations suggest tests such as lead acetate and alkaline reagent  
363 tests(Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 2000; Normalización, 2000); ferric  
364 chloride and alkaline test(DOF- Diario Oficial de la Federación, 2017) supported with Shinoda's  
365 test(Norma salvadoreña nso 67.03.01:01 calidad de propoleo crudo, 2003). All the mentioned  
366 regulations include oxidation index measurement.

#### 367 SPECTROPHOTOMETRY

368 Some propolis quality extract tests can rely on UV/VIS Spectrophotometry. Quality tests  
369 here looks at the formation of stable coloured compounds of flavonoids or phenolic

370 compounds with specific reagents(Gómez-Caravaca et al., 2006). UV/VIS techniques are one  
371 of the most relevant characterization techniques due to its versatility, speed, simplicity and  
372 low cost. In this technique, we rely on absorbance measurements to quantify a particular  
373 substance(Mujahid & Dickert, 2012; Venkatachalam, 2016). Phenolic Compounds are  
374 chromophores that absorb light in the UV-VIS range; this is due thanks to the presence of the  
375 phenyl group. Hydroxy group in phenols makes is also susceptible to gain information about  
376 flavonoid oxidation state(Andersen & Markham, 2006).

#### 377 PHENOLIC COMPOUNDS:

378 Folin-Ciocalteu reagent can help to quantify total phenols in propolis samples. This method  
379 appears in some regulations(Diario Oficial de la Federación, 2017; Normalización, 2000) and in  
380 research papers(Alencar et al., 2007; Kubiliene et al., 2015; Machado et al., 2016; Martín Gordo,  
381 2018; Palomino G et al., 2009; Ribeiro et al., 2012; Saito et al., 2020; Soltani et al., 2020; Yuan et  
382 al., 2020), on some cases with small modifications. This method measures the appearance of  
383 a blue coloured substance, due to the oxidation of phenol in basic medium. As described by  
384 Singleton et al(Singleton et al., 1999), we mix the plant extract to a distilled-water diluted  
385 Folin-Ciocalteu reagent that has 75 g/l sodium carbonate. After this, we record absorbance  
386 at 760nm. Samples, blanks and standards follow the previous procedure to report total  
387 phenols in the sample as milligrams of equivalent standard per litre. A commonly used  
388 standard in the Folin-Ciocalteu method is Gallic acid (mg GAE). In papers where the main  
389 interests are phenol quantification in wine, the standard used is tannic acid. Authors like  
390 Popova, interested in propolis, used pinocembrin and galangin(Popova et al., 2004) as  
391 references. Gallic and tannic acid are usually minor compounds in propolis.

392 Some authors use the Folin-Ciocalteu method with 4%(Alencar et al., 2007; Ribeiro et al., 2012)  
393 or 7,5%(Corona-Jiménez et al., 2016; Machado et al., 2016)sodium bicarbonate solution to

394 increase test sensibility. However, this modification in the protocol requires a new selection  
395 in the wavelength absorption used in the method. After the Folin-Ciocalteu sample is  
396 prepared and heated, absorbance measurement takes place after 2h. In the literature, some  
397 methods measure absorbance at 60min(Palomino G et al., 2009), 30min(Yuan et al., 2020) or  
398 just 5min(Machado et al., 2016) after the sample is heated because the colour intensity during  
399 this time increases faster. Nonetheless, heat is not desirable because is more probability of  
400 appearance of interfering substances(Singleton et al., 1999).

401 Propolis has shown values of 150-300 mg of Gallic acid equivalent (GAE) per gram of  
402 propolis(Alencar et al., 2007; Delgado Aceves et al., 2018; Machado et al., 2016; Monroy et al.,  
403 2018; Saito et al., 2020; Soltani et al., 2020) for Brazilian, Algerian and Mexican propolis, in the  
404 case of Colombian propolis there are reports of 20-114 mg GAE per gram of  
405 propolis(Palomino G et al., 2009; Sánchez, 2018).

#### 406 FLAVONOIDS

407 One of the most cited articles (Alencar et al., 2007; Delgado Aceves et al., 2018; Gómez-Caravaca  
408 et al., 2006; Popova et al., 2004; Ribeiro et al., 2012; Saito et al., 2020; Salatino et al., 2011; Sánchez,  
409 2018; Trusheva et al., 2007) is the one of Woisky and Salatino(Woisky & Salatino, 1998), where  
410 the determination and quantification rely on the formation of a complex between the  
411 aluminum (III) ion and the carbonyl and hydroxyl groups in flavonoids. This method is  
412 known as the aluminum trichloride method and measures propolis quality in regulations from  
413 Mexico(DOF- Diario Oficial de la Federación, 2017), El Salvador(Norma salvadoreña NSO  
414 67.03.01:01 calidad de propoleo crudo, 2003) and Argentina(Normalización, 2000). Quercetin  
415 dissolved in methanol is the standard reference. In the aluminum trichloride method, we  
416 combine a solution of 5%  $AlCl_3$  with the propolis sample, and the reaction takes place for 30

417 minutes. Then, we measure absorbance at 425nm, and flavonoid concentration is measured  
418 as Quercetin mg equivalents (EQ) per gram of propolis sample.

419 Modifications to the aluminum trichloride method suggested by Popova et al(Popova et al.,  
420 2004) include using galangin as standard. This a flavonoid present in high concentration in  
421 poplar-originated propolis. Also a reduce of AlCl<sub>3</sub> concentration to 2%(Grosso et al., 2007;  
422 Machado et al., 2016; Palomino G et al., 2009; Sanches & Mata, 2013), and uses reaction times of  
423 10 min(Soltani et al., 2020) and 60 min(Palomino G et al., 2009; Sánchez, 2018) have been  
424 reported. This method also measures absorbance after the reaction takes place through a  
425 wavelength scan between 415 to 430 nm (Grosso et al., 2007; Palomino G et al., 2009; Sánchez,  
426 2018; Soltani et al., 2020).

427 Aluminum nitrate colorimetric assay is another option widely reported to measure flavonoid  
428 contents(Alencar et al., 2007; Moreno et al., 2000; Ribeiro et al., 2012; Yuan et al., 2020). This  
429 method relies on the work of Park et al.<sup>20</sup> in 1995 Aluminum nitrate colorimetric assay uses  
430 a 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and 1M potassium acetate solutions mixed with the propolis extract. The  
431 reaction takes place at room temperature for 40 min, and then we follow absorbance at 415  
432 nm. This method uses quercetin as standard. Some modifications to the Aluminum nitrate  
433 colorimetric assay test include catechin as a standard solution, using NaNO<sub>2</sub> 5%, AlCl<sub>3</sub> 10%,  
434 NaOH 1M as reagents. Here the absorbance is measured at a 510nm as is reported in recent  
435 articles that used SFE method(Monroy et al., 2018; Saito et al., 2020).

436 Flavonoid contents in propolis samples varies from 10-60mg QE/g(Alencar et al., 2007;  
437 Machado et al., 2016; Monroy et al., 2018; Ribeiro et al., 2012; Saito et al., 2020; Soltani et al., 2020;  
438 Yuan et al., 2020) for Brazilian, Algerian and Chinese propolis and from 0.5-23 mg  
439 QE/g(Grosso et al., 2007; Moreno et al., 2000; Palomino G et al., 2009; Sánchez, 2018) for



440 Argentinian and Colombian samples, values of 130mgQE/g have been reported for Mexican  
441 samples(Delgado Aceves et al., 2018).

#### 442 ANTIOXIDANT ACTIVITY

443 The antioxidant potential of phenolic compounds depends on the number and arrangement  
444 of the hydroxyl groups that are present in the molecule; and, in particular, to their ability to  
445 donate a hydrogen ion(Rice-Evans & Packer, 1996). Some studies attribute antioxidant activity  
446 to all the phenolic constituents in propolis(A. H. Banskota et al., 2001; Biscaia & Ferreira, 2009;  
447 Stan et al., 2011), but some other studies conclude that antioxidant activity is due to the  
448 formation of phenolic acids(Arjun H. Banskota et al., 2000; Gregoris & Stevanato, 2010; Machado  
449 et al., 2016) or flavonoid(Alencar et al., 2007; Kim et al., 2003) concentration. Antioxidant  
450 activity is an actively studied biological property measured by using synthetic antioxidants  
451 as a reference(Antolovich et al., 2002). We need to keep in mind that in vitro methods provide  
452 a useful indication of antioxidant activities, but those results can hardly represent antioxidant  
453 properties in biological systems. For this reason, some in vivo antioxidant tests are  
454 suggested(Antolovich et al., 2002; Fernandez-Panchon et al., 2008).

455 Oxidation in propolis compounds is a very complicated process that involves different  
456 mechanisms, and there is no single method that measures precisely total antioxidant capacity  
457 in propolis(V. Bankova et al., 2019; Sánchez, 2018; Yang et al., 2011). However, most of the  
458 studies reviewed measures the free radical scavenging capacity of propolis towards a stable  
459 free radical of  $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH)(Alencar et al., 2007; Kubiliene et al., 2015;  
460 Moncayo Luján et al., 2018; Moreno et al., 2000; Palomino G et al., 2009; Ribeiro et al., 2012; Soltani  
461 et al., 2020; Stan et al., 2011; Yuan et al., 2020). In a few cases, the substance used to provides  
462 the free radical is 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid), (ABTS)(Corona-  
463 Jiménez et al., 2016; Machado et al., 2016). DPPH and ABTS methods are straightforward and

464 popular, substrate-free spectrophotometric techniques based on quenching of stable coloured  
465 radicals DPPH or ABTS•+. However, antioxidant results obtained by these methods must be  
466 considered carefully(Antolovich et al., 2002). A study by Floegel et al(Floegel et al., 2011) found  
467 that ABTS better reflected antioxidant capacity in high-pigmented and hydrophilic  
468 antioxidants than DPPH.

469 In contrast, Roginsky et al(Roginsky & Lissi, 2005) points a low selectivity of ABTS•+ radical  
470 that allows it to react with any hydroxylated compound regardless of whether or not it has  
471 antioxidant potential. On the other hand, sterically impeded DPPH radical is also more  
472 selective. During this section, we will describe DPPH, ABTS and The Ferric Reducing  
473 Ability of Plasma FRAP assays, since they are the most common tests used to assess propolis  
474 antioxidant activity(Gülçin et al., 2010; Ozdal et al., 2018; Sánchez, 2018; Yang et al., 2011)

475 DPPH assay measures the stabilization of a purple-coloured free radical of DPPH by a  
476 substance that can donate a hydrogen atom. Stable, reduced DPPH does not absorb in the  
477 visible range, and purple-colour bleaching is then proportional to the number of protons  
478 captured. In DPPH assay, the absorbance of the reaction medium its read at 517  
479 nm(Antolovich et al., 2002). Here results report Radical Scavenging Activity (RSA) or  
480 IC<sub>50</sub>(Stan et al., 2011) compared to a negative control sample. Antioxidant IC<sub>50</sub>(Antolovich et  
481 al., 2002) is the amount of the tested substance necessary to decrease 50% of the initial DPPH  
482 concentration. Some studies also compare sample antioxidant activity to a particular positive  
483 control, i.e. a synthetic antioxidant. ABTS, also known as Trolox (a water-soluble vitamin E  
484 analogue antioxidant) equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. ABTS assay is based  
485 on the generation by oxidation of a blue/green stable radical, cationic chromophore that can  
486 be reduced by antioxidants. After a particular reaction time, the ABTS assay measures light

487 absorption at 734 nm and reports the antioxidant activity of the test sample as Trolox  
488 equivalents or also as RSA(Antolovich et al., 2002; Campos et al., 2018).

489 The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) assay is different from the previous  
490 antioxidant assays. In the FRAP method, there are no free radicals involved, and the reduction  
491 of ferric iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) to ferrous iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) is monitored(Floegel et al., 2011).  $\text{Fe}^{2+}$  ion has an  
492 intensive blue colour, and absorbance values at 593 nm(Ben Ahmed et al., 1996) are sensitive  
493 to the quantity of total antioxidant power of the sample(Szolloosi & Szolloosi Varga, 2002). FRAP  
494 assay results measures antioxidant activity as equivalents of the standard selected, among  
495 which are Trolox,  $\alpha$ -tocopherol or Gallic Acid(Benzie & Strain, 1996)

496 There are several method adaptations among the studies reviewed for measuring antioxidant  
497 activity in propolis, and propolis antioxidant capacity vary from 20% to 85% RSA(Alencar et  
498 al., 2007; Corona-Jiménez et al., 2016; Kubiliene et al., 2015; Kumazawa et al., 2004; Machado et  
499 al., 2016; Moncayo Luján et al., 2018; Moreno et al., 2000; Palomino G et al., 2009; Ribeiro et al.,  
500 2012; Soltani et al., 2020; Stan et al., 2011; Yuan et al., 2020). After comparing samples propolis  
501 for antioxidant results, under the three named methodologies, we found highly divergent  
502 values(Sánchez, 2018; Yang et al., 2011). Only the Mexican regulation proposes the  
503 measurement of antioxidant capacity by DPPH as a propolis quality criteria(Diario Oficial de  
504 la Federación, 2017).

505 Quantification of phenolic compounds and flavonoids methods are more standardized than  
506 propolis antioxidant activity tests. In several studies, the latter tests are also frequently  
507 adapted or modified. For this reason, propolis antioxidant properties from different regions  
508 are somehow hard to compare.

509 Existing regulations do not yet consider more advanced techniques to establish propolis  
510 composition. However, the World Health Organization (WHO) suggests the use of  
511 sophisticated technologies to provide a chemical fingerprint and the nature of chemicals and  
512 impurities present in plant-derived products(World Health Organization, 2002). Also, ISO  
513 standards are now establishing the international requirements for beehive products.  
514 Perhaps, shortly, the requirements for propolis might be as specialized as those  
515 established for royal jelly(ISO, 2016)

516 All the different tests previously explained look forward to supporting propolis quality  
517 evaluation by regulatory agencies and pharmaceutical industries. They also help to  
518 characterize propolis and provides scientific and commercial added value to bee-glu  
519 from different geographic origins. However, analytical methods such as Thin Layer  
520 Chromatography (TLC), High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Gas  
521 Chromatography (GC) combined with Mass Spectrometry (MS), and Nuclear Magnetic  
522 Resonance (NMR) can help to define composition profiles of herbal preparations  
523 better(Alamgir, 2018) as in the case of propolis extracts.

#### 524 [ANTIMICROBIAL ACTIVITY](#)

525 The antibacterial activity of propolis is considered one of its most important properties(Céspedes,  
526 2017; Krell, 1996). Since it is used by bees as a sealant to create a sterile environment and prevent  
527 the entry of microorganisms, it is logical to assume that it has a high antimicrobial power (V. S.  
528 Bankova et al., 1983). Numerous studies have been conducted evaluating the action against gram-  
529 positive and gram-negative bacteria(Sousa et al., 2020). The antimicrobial activity of propolis is  
530 considered in two ways: the effect propolis has on the immune system and the direct action on  
531 microorganisms (Valko et al. 2017). By boosting the immune system, propolis may have an activating  
532 effect on macrophages and NK cells, increasing their ability to kill cells. An increase in

533 antibody production has also been reported (Preventiva, Legal, and Andr 2014). The direct  
534 bactericidal action of propolis comes in different forms as it contains many active substances  
535 with different effects. Some bactericidal mechanisms observed are: inhibition or disruption  
536 of ATP synthesis in bacteria(Rivera-Yañez et al. 2017), disruption of cell membrane  
537 permeability and reduction of bacterial motility(Przybyłek and Karpiński 2019). These  
538 biological activities have been associated with flavonoids such as galangin, pinocembrin and  
539 pinostrobin, but antibacterial action has also been found in propolis with only traces of  
540 flavonoids(Siheri et al. 2017).

541 Propolis extracts have been shown to exhibit antibacterial activity at different concentrations,  
542 varying between 0.5um/mL-2.3mg/mL (Chen et al., 2019; De Lima et al., 2016; Moncayo  
543 Luján et al., 2018). However, it is important to recognize that it is actually the low  
544 concentrations that may be of pharmacological interest and that have been the least evaluated  
545 for this natural matrix.

#### 546 CHROMATOGRAPHY

547 Chromatography is an extremely sensitive and effective separation method(Coskun, 2016) to  
548 both purify and identify components in complex matrices. Chromatography separates  
549 substances by the different affinities that diverse compounds may have between a stationary  
550 and a mobile phase. Based on the mobile phase, there are two commonly used  
551 chromatographic methods: liquid chromatography and gas chromatography(Gutiérrez, 2002).  
552 Among the factors that influence this separation process are the different molecular  
553 characteristics that a substance may have, such as adsorption to a particular surface,  
554 molecular size, binding affinities to a specific target, different hydrophobic interactions and  
555 possible ion-ion interactions(Coskun, 2016)

## 556 ***Thin Layer Chromatography (TLC)***

557 In traditional thin-layer chromatography, The stationary phase is a thin layer of an evenly  
558 distributed solid substance supported on a plate. By using a capillary tube, a few microliters  
559 of the sample are spotted onto the stationary phase, near one end of the plate. TLC is run by  
560 placing the sample-spotted plate in a closed jar that contains a liquid solvent mixture (mobile  
561 phase) in equilibrium with its vapour phase. The solvent ascends through the plate by  
562 capillary action, carrying the components of the sample with it, and different compounds are  
563 separated based upon their differential interactions with the adsorbent coating in the  
564 stationary phase (usually by adsorption) and the intermolecular interactions with the  
565 substances used in the mobile phase(Cseke et al., 2006). Different compounds often show  
566 different displacement values on the plate. TLC reports these displacements as a retention  
567 factor,  $R_f = \frac{\text{Compound displacement on the plate}}{\text{solvent displacement on the plate}}$ . In some cases, for comparison purposes, a  
568 reference pure substance is also spotted on the TLC plate(Alamgir, 2018). TLC is a qualitative  
569 technique to assess extract compositions(Maciejewicz, 2001). Sometimes it can also be used  
570 as a predictor of retention times in High-Performance Liquid Chromatography(Gutiérrez,  
571 2002).

572 In the case of propolis samples, the choice of both stationary and mobile phases for normal-  
573 phase (polar stationary phase) TLC depends upon propolis composition(Gómez-Caravaca et  
574 al., 2006). Silicagel 60 F<sub>254</sub> usually is the stationary phase(Alencar et al., 2007; Campo Fernández  
575 et al., 2008; Maciejewicz, 2001; Milojković Opsenica et al., 2016; Moreno et al., 2000; Tang et al.,  
576 2014) since it is a suitable matrix for separating phenolic compounds. The fluorescent  
577 indicator (F<sub>254</sub>) helps to identify uncolored substances by exposing the plate to UV light. In  
578 some cases, reverse-phase (non-polar stationary phase) TLC can provide complementary  
579 results(Park et al., 2007). Highly methylated or acetylated phenolic compounds require non-

580 polar solvents, and in literature, we can find the use of mobile-phase solvent mixtures to  
581 optimize TLC resolution. According to the sample components, some reported mobile phases  
582 used are: toluene-chloroform-acetone(Moreno et al., 2000), hexane-ethyl acetate-acetic  
583 acid(Moreno et al., 2000; Sawaya et al., 2004), toluene-ethyl acetate-formic acid(Alencar et al.,  
584 2007; Milojković Opsenica et al., 2016; Tang et al., 2014), ethanol-water(Park et al., 2007), hexane-  
585 ethyl acetate(Campo Fernández et al., 2008; Martínez Galán, 2009) or chloroform-  
586 methanol(Piccinelli et al., 2013). After TLC finishes, the evaporation of the solvent takes place.  
587 Furthermore, in TLC with fluorescence indicator ( $F_{254}$ ), exposing the plate to short and long-  
588 wavelength UV light (254-366nm) helps to check compound separation(Alencar et al., 2007;  
589 Maciejewicz, 2001; Milojković Opsenica et al., 2016; Park et al., 2007; Tang et al., 2014). In some  
590 cases, a revealing substance may help to identify the substances separated by TLC. Here we  
591 have different revealers like iodine vapour, vainilline(Martínez Galán, 2009), cerium  
592 sulfate(Piccinelli et al., 2013). A 1%  $FeCl_3$ (Moreno et al., 2000) solution or in a mix with 1%  
593  $AlCl_3$ (Maciejewicz, 2001) in methanol may help to identify flavonoids by showing dark  
594 yellow, green, or blue fluorescence.

595 Some reports show a high presence of flavonoids in red coloured raw-propolis(Campos et al.,  
596 2018), which can be easily identified by TLC. Red-propolis extracts may have a higher  
597 amount of flavonoids by using extraction solvents with high-ethanol content(Sawaya et al.,  
598 2004). Other authors use sophisticated and automated forms of TLC, useful in quantitative  
599 analysis (QTLC) of natural products. They develop rapid identification methods through  
600 chemometric fingerprinting(Tang et al., 2014) coupled with high-performance TLC (HPTLC)  
601 and informatics tools(Milojković Opsenica et al., 2016) to identify propolis of different origins.

## 602 **HPLC**

603 High-pressure liquid chromatography (HPLC) is a rapid, high sensitivity, high turnover  
604 technique to separate volatile and stable compounds. It is by far the most popular technique  
605 used to quantify and isolate phenolic compounds(Andersen & Markham, 2006; Coskun, 2016).  
606 High pressure (up to 4,000–5,000 psi) enables to pump a liquid mobile phase together with  
607 the sample through a column packed with a small size particle stationary phase. After passing  
608 by the column, the detection of eluting compounds uses spectrophotometric techniques such  
609 as UV-VIS absorbance, Photometric Diode-Array (PDA) or Diode-Array Detectors (DAD).  
610 Diode-Array detectors enable us to measure several absorbance wavelengths at the time.  
611 Detection techniques also enable measuring compound retention times, i.e., the time that a  
612 particular compound stays in the column for a specific HPLC run. By comparing retention  
613 times with pure standard or reference substances, we can perform presumptive compound  
614 identification. Important propolis constituents like Caffeic acid, p-Coumaric acid, Ferulic  
615 acid, Kaempferol, Pinocembrin, Phenethyl caffeate, Isopentyl caffeate, Chrysin, Galangin,  
616 Pinostrobin, Benzyl caffeate, caffeic acid, Abscisic acid, Epicatechin and Quercetin have been  
617 successfully separated and detected with various HPLC systems(V. Bankova et al., 2019;  
618 Biscaia & Ferreira, 2009; Fangio et al., 2019; Ozdal et al., 2018; Pavlovic et al., 2020; Yuan et al.,  
619 2020) as shown in **Table 1**.

## 620 **Gas Chromatography (GC)**

621 Gas chromatography is, in most of the cases, more sensitive than HPLC and allows the  
622 analysis of volatile compounds in low concentrations. In GC, the sample is carried by an inert  
623 gas like nitrogen, helium or argon through a heated capillary column (50–350°C) coated with  
624 a stationary-phase bed. GC capillary columns selection must consider the desired temperature  
625 operation and the nature of the material to fractionate. Then the signal produced by  
626 compounds eluting from the column reaches the detector producing a



627 chromatogram(Alamgir, 2018; Shah & Seth, 2010) for thermo-stable compounds present in  
628 propolis; there is an option to perform initial derivatization reactions. These are somehow  
629 simple chemical modifications of the sample that will enhance both volatility and thermal  
630 resistance of the solutes in the mix(Cardinael et al., 2015; Gómez-Caravaca et al., 2006). GC  
631 is often couple with spectrometric detection methods to study propolis composition, as  
632 discussed in the next section.

633 The main disadvantage when using chromatography is the difficulty of recovering the  
634 compound after analysis(Shah & Seth, 2010). Also, the need for reference standards can lead  
635 to increasing analysis costs. Additionally, the detection of unknown compounds may  
636 jeopardize sample analysis.

637 **Table 1 shows** tested HPLC methods, from 2017 to 2020, to separate and identify between  
638 8 and 15 different compounds(Fachri, B . Rizkiana, M. Muharja, 2020; Fangio et al., 2019; Liu et  
639 al., 2018; Ozdal et al., 2018; Pavlovic et al., 2020) in propolis. Some of those methods show low  
640 separation resolution due to the presence of compounds with similar structures(Kumazawa et  
641 al., 2004). For the reasons above, some authors have additionally used spectroscopic  
642 techniques to characterize propolis compounds(Pavlovic et al., 2020; Pujirahayu et al., 2019;  
643 Yuan et al., 2020).

#### 644 SPECTROMETRIC AND SPECTROSCOPIC METHODS.

645 Spectrometry is the study of the interaction of electromagnetic radiation (light) with matter  
646 and is a powerful tool used in the structural elucidation of unknown compounds(Cseke et al.,  
647 2006). Spectrometric and chromatographic methods are powerful tools to separate and  
648 identify new compounds(Andersen & Markham, 2006). They are used to provide a chemical  
649 fingerprint for a particular substance(Alamgir, 2018)

650 Mass spectrometry (MS) techniques are useful for qualitative analysis. MS needs to obtain  
651 ions from organic molecules in the gas phase; ions are fractionated and then separated  
652 according to their mass/charge ratio. Fragments obtained are often identified by comparing  
653 the spectrum obtained with an MS spectra database. This technique is also widely used to  
654 isolate chromatographic peaks that have not been well separated by the column.

655 MS works well if the molecule of interest is stable in the gas phase. Also, MS spectra database  
656 comparison software is sometimes prone to errors in structure assignments. In these cases,  
657 we suggest the use of more powerful techniques for chemical structure analysis, such as  
658 Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

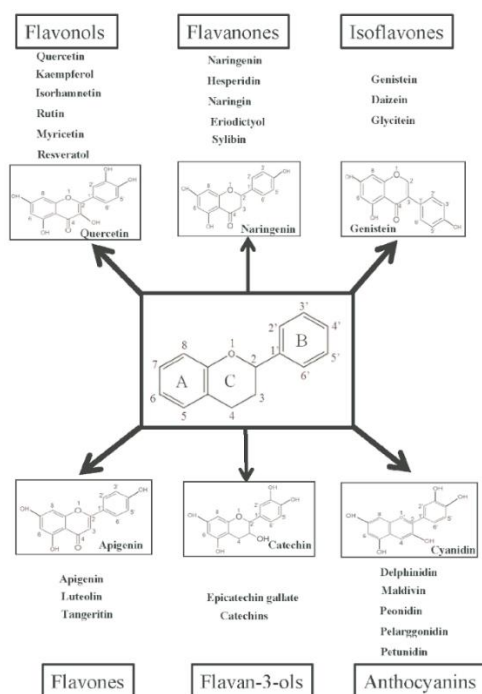
659 Proton ( $^1\text{H}$ ) or carbon 13 ( $^{13}\text{C}$ ) Nuclear Magnetic Resonance(NMR) are spectroscopic  
660 techniques. In NMR, radio frequency signals interact with magnetic moments of specific  
661 atoms nuclei. NMR can provide atom-detailed structural information for virtually any  
662 organic molecule(Pelantová et al., 2014). NMR's main limitation is its low sensitivity that leads  
663 to considerable sample amounts to obtain good-quality spectra(Duus et al., 2000).

664 For propolis samples, some chromatographic-spectrometric-spectroscopic methods appear in  
665 **Table 1**. The use of those methods enabled the authors to identify between 5-70  
666 compound(Al-Ghamdi et al., 2017, 2017; Kasiotis et al., 2017; Pavlovic et al., 2020; Pujirahayu et  
667 al., 2019; Seyhan et al., 2019; Silva et al., 2019; Zaccaria et al., 2019) that were separated by HPLC.  
668 Validation of these methods must be straightforward for propolis quality analysis(Seyhan et  
669 al., 2019), given its high reproducibility and sensitivity(Pelantová et al., 2014).

670 A complete propolis characterization by using spectroscopic and spectrometric techniques  
671 could allow answering questions such as those proposed by Kumazawa et al(Kumazawa et al.,

2004) who did not find an apparent connection between RSA and HPLC profiles, as in Costa(Costa et al., 2020) and Ribeiro et al(Ribeiro et al., 2012) study where propolis with a minor content of phenols and flavonoids showed better anticarcinogenic. NMR HPLC and MS are essential techniques to characterize propolis. They are also useful in evaluating biological activity (Costa et al., 2020).

ANEXOS



678

679 **Figure 1.** Flavonoids subdivision and chemical structures

**Table 1.** Separation of phenolic compounds by using HPLC or GC methods coupled with different detectors

Method	Stationary Phase	Mobile Phase	Temperature (°C)	Sample preparation	analysis time (min)	Detection	identified compounds	Validation Method	Observation	Reference
HPLC	WondaSil™ C18 column (5 mm, 250 mm x 4.6 mm, Shimadzu)	Gradient with water 0.1% formic acid (v/v) and acetonitrile 0.1% formic acid (v/v)	40	methanol ultrasonic assisted extraction 10-fold dilution with 80% methanol	15,5	DAD (288 nm)	Chlorogenic acid, epicatechin, caffeic acid, taxifolin, p-coumaric acid, hesperetin, naringenin, chrysin, apigenin, kaempferol, luteolin, quercetin, myricetin, rutin, catechin, ferulic acid and isorhamnetin	YES	Simultaneously measuring of seventeen polyphenols in six Chinese raw propolis samples	113
HPLC	Water Alliance, column C18	gradient with methanol and 1% acetic acid	-	supercritical extraction and separated from residue by centrifuging	68	UV(280nm)	gallic acid, ferulic acid, caffeic acid, cinnamic acid, CAPE, galangin, quercetin, and p-coumaric	NOT	Detection of main components of Indonesian propolis extracted by super critical fluids	4
HPLC	Zorbax 3.5 μm XDB-C18 (4.6x75mm)	gradient of 1% acetic acid in water and methanol.	30	70% ethanolic maceration extraction concentrated and dissolved in ethanol	15	DAD (210 to 310 nm)	Abscisic acid, Catechin, p-Coumaric acid, Epicatechin, Indoleacetic acid Quercetin	NOT	Chemical characterization of propolis from Buenos Aires	110
HPLC	C-18 column (2574.6 mm, 5 μm)	Gradient of (Milli-Q water with 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) and (acetonitrile with 0.1% (v/v) TFA).	-	70% Ethanol ultrasonic assisted and An aliquot was diluted with methanol	60	PDA( 210 to 530 nm)	picocembrin, galangin, pinobanksin, pinostrobin, chrysin, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, t-cinnamic acid	NOT	Determination of phenolic profile of Turkish propolis	92
HPLC	Phenomenex Lichrospher C18, 4.6 x 250 mm, 5 μm	0.05% formic acid; and acetonitrile	20	70% ethanol extraction and evaporated to dryness and dilute in ethanol	35	UV (295, 325 and 375nm)	caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, m-coumaric acid, trans-cinnamic acid, pinocembrin, chrysin	YES	Analysis of phenols, flavones and flavonols in Italian propolis by different analytical methods	12
HPLC	Zorbax Eclipse Plus, 3.5 μm, 150 x 2.6 mm i.d.	0.1% formic acid in water and pure acetonitrile	-	80% ethanolic maceration extraction concentrated and dissolved in ethanol	108	PDA-MS(ESI)	Syringic acid, Kaempferide, Acacetin, Rutin, Protocatechuic acid, ethyl ester, Diosmin, Vanillin, Chrysoeriol, Gallic acid Protocatechuic acid, Pinocembrin, Kaempferol, Apigenin, Chrysin Galangin, Chlorogenic acid, Daidzein Ellagic acid, Ferulic acid Resveratrol, Tectochrysin, Caffeic acid, Sakuraneti, Rhamnetin, Luteolin, p-Coumaric acid, Pinobanksin, Quercetin, Hesperetin, Hydroxytyrosol, Kaempferide Acacetin Rutin Protocatechuic acid ethyl ester Resveratrol	yes	complementary analysis to unveiling eight additional newly reported compounds of propolis from Greece	120
HPLC	RP-18 column (150x4.6 mm Sum)	acidified water with 0.1% formic acid and methanol	33	70% Ethanol ultrasonic assisted and diluted	110	PDA-MS(ESI)	Quercetin, Pinobaskin, Apigenin, Chrysin, Pinocembrin, Galangin	NOT	Polyphenol chemical composition of European Propolis by innovative method of obtaining	121
HPLC	C18 column (250 x 2mm. d., 5 μm)	water (0.1% formic acid) and methanol (0.1% formic acid)	30	60% ethanol direct extraction	23	PDA-MS(ESI)	Kaempferol, Fumaric acid, Pyrogallol, p-OH benzoic acid, vanillin, p-coumaric acid, Caffeic acid, t-ferulic acid, quercetin, ellagic, acif, isorhamnetin, quercetagenin-3,6-dimethyl ether, Chlorogenic acid, Rosmarinic acid, Kaempferol-3-O-Rutinoside, Rutin Hydrate, Gallic acid, Salvigenin, Penduletin, Galangin, Chrysin, Pinobanksin, Pinocembrin, Apigenin, Luteolin, t-cinnamic acid, Quercetin dihydrate	YES	phenolic/ flavonoid constituents of Turkish propolis	118
HPLC	C18 RP Luna Phenomenex reverse phase (4.6 x 250 mm i.d., 5 μm)	0.1% aqueous acetic acid and methanol	40	concentrated extraction in Soxhlet re-suspended in chloroform or methanol	50	DAD-MS (ESI)	Caffeic acid p-coumaric acid, quercetin, naringenin, isorhamnetin, Quercetin, gossypetin-3,3',4',7'-tetramethyl ether, asmyricetin-3,3',7'-trimethyl ether, 5-hydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone	NOT	Chemical characterization of brazilian propolis	117
GC	DB-5HT (30 m x 0.32 mm, 0.25 μm)	helium as a carrier gas	100 to 310	concentrated extraction in Soxhlet re-suspended in chloroform or methanol	-	MS(ESI)	Lupenone, Lupeol, Octanoic acid tetraacyl ester and Octanoic acid hexacyl ester	NOT	Chemical characterization of brazilian propolis	117
GC	fused silica capillary column (30 mx0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness)	helium as a carrier gas	65-310	sample was dissolved in n-hexane and derivatizing with trimethylsilyl [(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Si], i.e. TMS	63	MS(ESI)	Hexacosene Eicosanoic acid Heptacosene Octacosene Hexadecanoic acid Octadecanoic acid Tetracosanoic acid Octadecanol Eicosanol Docosanol Tetraacosanol Hexacosanol Octacosanol Triacontanol Dotriacontanol Methyl dodecanoate Methyl tetradecanoate Methyl hexadecanoate Methyl octadecanoate Methyl octadecanoate Methyl eicosanoate Methyl docosanoate Methyl tetraacosanoate Methyl hexacosanoate Methyl Octacosanoate Methyl Triacontanoate Methyl Dotriacontanoate Nonacosene Triacotene Hentriacontene Dotriacontene Trtriacontene Tetracontene Pentatriacontene Eicosane Heneicosane Docosane Tricosane Tetraacosane Pentacosane Hexacosane Heptacosane Octacosane Nonacosane Triacotene Hentriacontene	NOT	Chemical compositions and characteristics of organic compounds in propolis from Yemen	119
GC	Rtx-Wax column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness)	helium as a carrier gas	230	raw propolis was weighed and put into vials with IS (4-nonylphenol, 2000 μg/mL in 2-propanol)	>36	MS-NMR	methyl-acetate 2,4-dimethyl-1-heptene methyl-propanoate α-pinene, 2-butenic acid, sesquiterpene_2, benzyl-acetate, polycyclic aromatic compound, δ-cadinene, pentanoic acid, 4-methyl, calamenene, α-methyl crotonic acid, benzyl-alcohol, phenethyl-alcohol, cinnamaldehyde, α-copaen-11-ol, octanoic acid, guaiol, acetocinnamone, α-eudesmol, β-eudesmol, α-Copaen-11-ol, cinnamyl alcohol 3-buten-2-ol, 2-methyl- camphene esanal 2-butenal, 2-methyl- unknown_1 2-butenal, 3-methyl- unknown_2 unknown_3 unknown_4 unknown_5 nonanal benzene, 1-methoxy-2-methyl- tetradecane 2-octenal acetic acid terpene_1 trans-linalool oxide α-copaene (+)-camphor benzaldehyde propanoic acid β-linalool 2-methyl-propanoic acid sesquiterpene_1 β-cyclocitral unknown_6 2-methyl-butanoic acid	NOT	Analysis of phenols, flavones and flavonols in Italian propolis by different analytical methods	12
GC	680 Intercap 5MS fused silica capillary column (30 mm x 0.25 mm i.d. and 0.25 μm film thickness)	helium as a carrier gas	100 to 310	silylation with QP2010, the sample were mixed with 50 μL of dry pyridine and 75 μL of bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide. The mixture was heated at 80 °C for 20 min	-	MS(ESI)-NMR	Cycloartenol, Ambonic acid, Mangiferonic acid, Mangiferolic acid, Ambolic acid	not	investigate the botanical origin of Indonesian propolis.	114

681 CONCLUSIONS

682 Knowing the chemistry of phenolic compounds helps us to justify a conscious selection of  
683 both extraction methods and the different techniques to study their properties. We illustrated  
684 several options for solvents and extraction methods to extract phenolic compounds in  
685 propolis. The choice of the extraction protocol must focus on the final use of the extract, its  
686 application, and how this method could impact product quality. Also, it is essential to  
687 consider if we desire to obtain a particular molecule or the set of them, and finally, an not  
688 less importantly, the economic investment that is related to the extraction and quality  
689 assessment techniques used.

690 The most accepted methodology for quantification of phenol compounds is  
691 spectrophotometry; however, it is not yet fully harmonized, the results tend to be quite varied,  
692 and the select standards references are not the main constituents of each sample. In  
693 quantification of phenol compounds in propolis, we recommended using more than one  
694 method to measure the most complex properties, such as antioxidant capacity.

695 Chromatography spectrometry and spectroscopy are scientific tools used to study propolis.  
696 However, these techniques do not have any application in today's propolis normativity nor  
697 are applied to industry, even though they have shown to give the most complete and reliable  
698 results.

699 A full characterization of propolis properties must consider the simplest to the most complex  
700 methodologies. However, up today, there is no clear correlation between the concentration  
701 of phenolic compounds and their biological activity.

702 REFERENCES

703 Al-Ghamdi, A. A., Bayaqaob, N. I. M., Rushdi, A. I., Alattal, Y., Simoneit, B. R. T., El-  
704 Mubarak, A. H., & Al-Mutlaq, K. F. (2017). Chemical compositions and

705 characteristics of organic compounds in propolis from Yemen. *Saudi Journal of*  
706 *Biological Sciences*, 24(5), 1094–1103. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.012>

707 Alamgir, A. N. . (2018). *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts* (K. .  
708 Rainsford (ed.); Vol. 1). Springer.  
709 [https://books.google.com.my/books?hl=en&lr=&id=2LZhDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=](https://books.google.com.my/books?hl=en&lr=&id=2LZhDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=phytochemical+from+plants+gives+therapeutics+effects&ots=aX8_A-o1Ov&sig=zI63_bb2LYKPVuKyEL1-JhZ-mv0#v=onepage&q=phytochemical+from+plants+gives+therapeutics+effects&f=false)  
710 [PR9&dq=phytochemical+from+plants+gives+therapeutics+effects&ots=aX8\\_A-](https://books.google.com.my/books?hl=en&lr=&id=2LZhDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=phytochemical+from+plants+gives+therapeutics+effects&ots=aX8_A-o1Ov&sig=zI63_bb2LYKPVuKyEL1-JhZ-mv0#v=onepage&q=phytochemical+from+plants+gives+therapeutics+effects&f=false)  
711 [o1Ov&sig=zI63\\_bb2LYKPVuKyEL1-JhZ-mv0#v=onepage&q=phytochemical from](https://books.google.com.my/books?hl=en&lr=&id=2LZhDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=phytochemical+from+plants+gives+therapeutics+effects&ots=aX8_A-o1Ov&sig=zI63_bb2LYKPVuKyEL1-JhZ-mv0#v=onepage&q=phytochemical+from+plants+gives+therapeutics+effects&f=false)  
712 [plants gives therapeutics effects&f=false](https://books.google.com.my/books?hl=en&lr=&id=2LZhDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=phytochemical+from+plants+gives+therapeutics+effects&ots=aX8_A-o1Ov&sig=zI63_bb2LYKPVuKyEL1-JhZ-mv0#v=onepage&q=phytochemical+from+plants+gives+therapeutics+effects&f=false)

713 Aleksandrova, L. (1972). *Rosin and beeswax composition* (Patent No. 329 813).

714 Alencar, S. M., Oldoni, T. L. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J.  
715 A., Rosalen, P. L., & Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological  
716 activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of*  
717 *Ethnopharmacology*, 113(2), 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>

718 Andensen, O., & Markham, K. (Eds.). (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and*  
719 *Applications*. Taylor & Francis.

720 Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002).  
721 Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198.  
722 <https://doi.org/10.1039/b009171p>

723 Antonia, S. Á., Graciela, C. M., & Yanet, Á. M. (2017). Parámetros físicos y características  
724 organolépticas de propóleos provenientes de la Provincia de Misiones , Argentina  
725 Physical parameters and organoleptic characteristics of propolis from the province of

726 Misiones , Introducción. *Journal of the Selva Andina Biosph*, 51–58.  
727 [http://www.scielo.org.bo/pdf/jsab/v5n1/v5n1\\_a06.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/jsab/v5n1/v5n1_a06.pdf)

728 Baier, K. (1969). Die Wasserdampfsperre in der Beute. *Bienenpflege, Weinsberg*.

729 Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., & O’Keefe, S. (2010). Microwave-assisted  
730 extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*,  
731 *120*(4), 1185–1192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.063>

732 Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., Eberlin,  
733 M. N., I Falcão, S., Isla, M. I., Moreno, M. I. N., Papotti, G., Popova, M., Santiago, K.  
734 B., Salas, A., Sawaya, A. C. H. F., Schwab, N. V., Sforcin, J. M., Simone-Finstrom,  
735 M., Spivak, M., ... Zampini, C. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* propolis  
736 research. *Journal of Apicultural Research*, *58*(2), 1–49.  
737 <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>

738 Bankova, V., De Castro, S., & Marcucci, M. (2000). Propolis: recent advances in chemistry  
739 and plant origin. *European Journal of Political Research*, *22*(3), 329–345.  
740 <https://doi.org/10.1111/j.1475-6765.1992.tb00316.x>

741 Bankova, V. S., Popov, S. S., & Marekov, N. L. (1983). A study on flavonoids of propolis.  
742 *Journal of Natural Products*, *46*(4), 471–474. <https://doi.org/10.1021/np50028a007>

743 Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., &  
744 Kadota, S. (2001). Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of  
745 constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, *8*(1), 16–23.  
746 <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00004>

747 Banskota, Arjun H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message,  
748 D., Huertas, A. A. G., & Kadota, S. (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free  
749 radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China.  
750 *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1–2), 239–246. <https://doi.org/10.1016/S0378->  
751 8741(00)00252-X

752 Barre, R. (1942). Identification of the colouring matter of beeswax. *Revue Can. Biol*, 1.

753 BasistaSołtys, K. (2013). Allergy to Propolis in Beekeepers-A Literature Review.  
754 *Occupational Medicine & Health Affairs*, 01(01), 8–11. <https://doi.org/10.4172/2329->  
755 6879.1000105

756 Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., &  
757 Heyden, Y. Vander. (1996). Determination of optimal extraction conditions for  
758 phenolic compounds from Pistacia atlantica leaves using the response surface  
759 methodology. *Analytical Methods*, 8(31), 6107–6114.  
760 <https://doi.org/10.1039/C6AY01739H>

761 Benzie, I., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as  
762 aMeasure of ““Antioxidant Power””: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 236.

763 Biscaia, D., & Ferreira, S. R. S. (2009). Propolis extracts obtained by low pressure methods  
764 and supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 51(1), 17–23.  
765 <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.07.011>

766 Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional  
767 significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317–333.



768 Bulgaria. (n.d.). 25 72483-84 *ON*.

769 Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis  
770 (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347–363.  
771 [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00145-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00145-2)

772 Campo Fernández, M., Cuesta Rubio, O., Márquez Hernández, I., Rosado Pérez, A., &  
773 Montes de Oca Porto, R. (2008). Análisis cualitativo de propóleos Cubanos por  
774 cromatografía en capa delgada. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(3), 380–386.

775 Campos, D., Chirinos, R., Gálvez Ranilla, L., & Pedreschi, R. (2018). *Bioactive Potential*  
776 *of Andean Fruits, Seeds, and Tubers* (pp. 287–343).  
777 <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.12.005>

778 Cardinael, P., Casabianca, H., Peulon-Agasse, V., & Berthod, A. (2015). Sample  
779 Derivatization in Separation Science. In *Analytical Separation Science* (Issue  
780 November). <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep063>

781 Castro, M. D. L. De. (2014). Microwave-Assisted Extraction. In *Chemistry, Molecular*  
782 *Sciences and Chemical Engineering* (Issue May 2019). Elsevier Inc.  
783 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11172-2>

784 Céspedes, J. (2017). *Innovación para el aprovechamiento y transformación de propóleo en*  
785 *el municipio de mizque*.

786 Chen, C. T., Chien, Y. H., Yu, Y. H., & Chen, Y. W. (2019). Extraction and analysis of  
787 taiwanese green propolis. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(143), 1–5.  
788 <https://doi.org/10.3791/58743>

789 Cho, E., Lee, J. D., & Cho, S. H. (2011). Systemic contact dermatitis from propolis  
790 ingestion. *Annals of Dermatology*, 23(1), 85–88.  
791 <https://doi.org/10.5021/ad.2011.23.1.85>

792 Norma salvadoreña NSO 67.03.01:01 CALIDAD DE PROPOLEO CRUDO, Ministerio de  
793 Economía 11 (2003). [https://www.oirsa.org/contenido/2017/El\\_Salvador\\_inocuidad/8.  
794 nso\\_65\\_19\\_02\\_03\\_-\\_calidad\\_de\\_propoleo\\_crudo.pdf](https://www.oirsa.org/contenido/2017/El_Salvador_inocuidad/8.nso_65_19_02_03_-_calidad_de_propoleo_crudo.pdf)

795 Corona-Jiménez, E., Martínez-Navarrete, N., Ruiz-Espinosa, H., & Carranza-Concha, J.  
796 (2016). EXTRACCIÓN asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas  
797 de chia (*Salvia hispanica* L.) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*, 50(4), 403–412.

798 Coskun, O. (2016). Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of*  
799 *Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>

800 Costa, Alberto G., Yoshida, N. C., Garcez, W. S., Perdomo, R. T., Matos, M. de F. C., &  
801 Garcez, F. R. (2020). Metabolomics Approach Expands the Classification of Propolis  
802 Samples from Midwest Brazil. *Journal of Natural Products*.  
803 <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00783>

804 Creus, E. V. A. G. (2004). Compuestos fenólicos Un análisis de sus beneficios para la  
805 salud. *Offarm*, 23, 80–84.

806 Cseke, L., Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J., & Birelmann, H. (2006).  
807 *Natural Products from Plants* (CRC PRESS (Ed.)). Taylor & Francis.

808 De Lima, G. G., De Souza, R. O., Bozzi, A. D., Poplawska, M. A., Devine, D. M., &  
809 Nugent, M. J. D. (2016). Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial

810 Activity of Propolis-Loaded Hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(3),  
811 1248–1257. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.12.027>

812 Delgado Aceves, M. D. L., Andrade Ortega, J. Á., & Ramírez Barragán, C. A. (2018).  
813 Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera  
814 Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 74–87.  
815 <https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i28.270>

816 Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. (2000). *Instrução Normativa N°*  
817 *11, de 20 de Outubro de 2000.*

818 DOF- Diario Oficial de la Federación. (2017). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-*  
819 *SAG/GAN-2017, PROPÓLEOS, PRODUCCIÓN Y ESPECIFICACIONES PARA SU*  
820 *PROCESAMIENTO* (p. 8).

821 Duus, J., Gotfredsen, C. H., & Bock, K. (2000). Carbohydrate structural determination by  
822 NMR spectroscopy: modern methods and limitations. *Chemical Reviews*, 100(12),  
823 4589–4614. <https://doi.org/10.1021/cr990302n>

824 Fachri, B . Rizkiana, M. Muharja, M. (2020). *A Kinetic Study on Supercritical Carbon-*  
825 *dioxide Extraction of Indonesian Trigona sp . Propolis.* [https://doi.org/10.1088/1757-](https://doi.org/10.1088/1757-899X/742/1/012001)  
826 [899X/742/1/012001](https://doi.org/10.1088/1757-899X/742/1/012001)

827 Fangio, M. F., Orallo, D. E., Gende, L. B., & Churio, M. S. (2019). Chemical  
828 characterization and antimicrobial activity against *Paenibacillus* larvae of propolis  
829 from Buenos Aires province, Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 58(4), 626–  
830 638. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1601318>

- 831 Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008).  
832 Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence.  
833 *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(7), 649–671.  
834 <https://doi.org/10.1080/10408390701761845>
- 835 Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of  
836 ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US  
837 foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048.  
838 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- 839 Funari, C. S., Carneiro, R. L., Creese, M. E., Leme, G. M., Cavalheiro, A. J., & Hilder, E.  
840 F. (2016). On Track for a Truly Green Propolis-Fingerprinting Propolis Samples from  
841 Seven Countries by Means of a Fully Green Approach. *ACS Sustainable Chemistry*  
842 *and Engineering*, 4(12), 7110–7117. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02005>
- 843 Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and  
844 biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plant Research*, 5(31),  
845 6697–6703. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1404>
- 846 Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: A Review. *Bee World*, 60(2), 59–84.  
847 <https://doi.org/10.1080/0005772x.1979.11097738>
- 848 Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., &  
849 Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in  
850 products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,  
851 41(4), 1220–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.002>

- 852 Gregoris, E., & Stevanato, R. (2010). Correlations between polyphenolic composition and  
853 antioxidant activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 76–  
854 82. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.018>
- 855 Grosso, G. S., Carvajal, I. L. C., & Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índices de  
856 oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, 25(2).
- 857 Gülçin, I., Bursal, E., Şehitoğlu, M. H., Bilsel, M., & Gören, A. C. (2010). Polyphenol  
858 contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from  
859 Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2227–2238.  
860 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.053>
- 861 Gutiérrez, M. C. (2002). La cromatografía líquida: Aplicación de la TLC a la separación de  
862 colorantes. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigacion Textil y de Cooperacion*  
863 *Industrial*, 122, 29–34.
- 864 Hossain, M. K., Dayem, A. A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi,  
865 H. Y., & Cho, S. G. (2016). Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-  
866 diabetic properties of flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4).  
867 <https://doi.org/10.3390/ijms17040569>
- 868 ISO. (2016). *ISO 12824:2016 Royal jelly — Specifications*.
- 869 Jang, M., Sheu, S., Wang, C., Yeh, Y., & Sung, K. (2009). Optimization Analysis of the  
870 Experimental Parameters on the Extraction Process of Propolis. *Lecture Notes in*  
871 *Engineering and Computer Science*, 2175(1), 1295–1299.
- 872 Kapare, H., Lohidasan, S., Sinnathambi, A., & Mahadik, K. (2019). Standardization, anti-

873 carcinogenic potential and biosafety of Indian propolis. *Journal of Ayurveda and*  
874 *Integrative Medicine*, 10(2), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.06.003>

875 Kasiotis, K. M., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A., & Machera, K. (2017). Revisiting  
876 Greek propolis: Chromatographic analysis and antioxidant activity study. *PLoS ONE*,  
877 12(1), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170077>

878 Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic  
879 phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321–326.  
880 [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5)

881 Krell, R. (1996). Value-added products from beekeeping. *Fao Agriculture Services*  
882 *Bulletin*, 16.

883 Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barcauskaite, K.,  
884 Kubilius, R., Kasparaviciene, G., & Savickas, A. (2015). Alternative preparation of  
885 propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities. *BMC*  
886 *Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1–7. [https://doi.org/10.1186/s12906-](https://doi.org/10.1186/s12906-015-0677-5)  
887 [015-0677-5](https://doi.org/10.1186/s12906-015-0677-5)

888 Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of  
889 various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), 329–339.  
890 [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)

891 Liu, Q., Wu, H. L., Liu, Z., Xiao, R., Wang, T., Hu, Y., Ding, Y. J., & Yu, R. Q. (2018).  
892 Chemometrics-assisted HPLC-DAD as a rapid and interference-free strategy for  
893 simultaneous determination of 17 polyphenols in raw propolis. *Analytical Methods*,

894 10(46), 5577–5588. <https://doi.org/10.1039/c8ay01986j>

895 Machado, B. A. S., Silva, R. P. D., Barreto, G. D. A., Costa, S. S., Da Silva, D. F.,  
896 Brandão, H. N., Da Rocha, J. L. C., Dellagostin, O. A., Henriques, J. A. P., Umsza-  
897 Guez, M. A., & Padilha, F. F. (2016). Chemical composition and biological activity of  
898 extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green  
899 and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS ONE*,  
900 11(1), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145954>

901 Maciejewicz, W. (2001). Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column  
902 chromatography method and their identification by GC-MC and TLC methods.  
903 *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 24(8), 1171–1179.  
904 <https://doi.org/10.1081/JLC-100103439>

905 Maraschin, M., Somensi-Zeggio, A., Oliveira, S. K., Kuhnen, S., Tomazzoli, M. M.,  
906 Raguzzoni, J. C., Zeri, A. C. M., Carreira, R., Correia, S., Costa, C., & Rocha, M.  
907 (2016). Metabolic Profiling and Classification of Propolis Samples from Southern  
908 Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with Machine Learning. *Journal of Natural*  
909 *Products*, 79(1), 13–23. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00315>

910 Margeretha, I., Suniarti, D. F., Herda, E., & Alim, Z. (2012). Optimization and comparative  
911 study of different extraction methods of biologically active components of Indonesian  
912 propolis *Trigona* spp. *Journal Of Natural Products*, 5, 233–242.

913 Marina, D., Avella, G., Alberto, C., García, O., & Cisneros, A. M. (2008). Medición de  
914 Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal.

915 *Simposio de Metrologia*, 1–5.

916 [http://cenam.mx/simposio2008/sm\\_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf](http://cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf)

917 Martín Gordo, D. A. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su  
918 Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y*  
919 *Ambiental*, 9(1), 81–104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>

920 Martínez Galán, J. P. (2009). Caracterización fisico-química y evaluación de la actividad  
921 antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. *Universidad*  
922 *Nacional De Colombia Sede Medellín Facultad De Ciencias Agropecuarias*, 102.

923 Milojković Opsenica, D., Ristivojević, P., Trifković, J., Vovk, I., Lušić, D., & Tešić, Ž.  
924 (2016). TLC Fingerprinting and Pattern Recognition Methods in the Assessment of  
925 Authenticity of Poplar-Type Propolis. *Journal of Chromatographic Science*, 54(7),  
926 1077–1083. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw024>

927 Ministerio de salud y acción social. (2008). Resolución Conjunta SPRI N° 94/2008 y  
928 SAGPA N° 357/2008. In *Secretaria de agricultura, ganaderia, pesca y alimentos* (pp.  
929 5–6).

930 Mobus, B. (1972). The importance of propolis to the honey bee. *Brit. Bee J*, 19.

931 Moncayo Luján, M. del R., Moreno Reséndez, A., Galván Barrón, G. S., Reyes Carrillo, J.  
932 L., & Carrillo Inungaray, M. L. (2018). Antibacterial activity and phenolic content of  
933 propolis extracts obtained by different extraction methods. *Nova Scientia*, 10(20),  
934 397–412. <https://doi.org/10.21640/ns.v10i20.1392>

935 Monroy, Y. M., Rodrigues, R. A. F., Rodrigues, M. V. N., & Cabral, F. A. (2018).



936 Fractionation of ethanolic and hydroalcoholic extracts of green propolis using  
937 supercritical carbon dioxide as an anti-solvent to obtain artemillin rich-extract. *Journal*  
938 *of Supercritical Fluids*, 138, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.04.016>

939 Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. (2000). Comparison of  
940 the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina.  
941 *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1–2), 109–114. <https://doi.org/10.1016/S0378->  
942 8741(99)00189-0

943 Mujahid, A., & Dickert, F. L. (2012). Molecularly Imprinted Polymers for Sensors. In  
944 *Molecularly Imprinted Sensors* (pp. 125–159). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978->  
945 0-444-56331-6.00006-2

946 Normalización, I. A. de. (2000). *Normas IRAM sobre propóleos*.  
947 <https://www.oocities.org/sitioapicola/notas/propoleos-iram.htm>

948 Oroian, M., Ursachi, F., & Dranca, F. (2020). Influence of ultrasonic amplitude,  
949 temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from  
950 propolis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105021.  
951 <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105021>

952 Ozdal, T., Sari-Kaplan, G., Mutlu-Altundag, E., Boyacioglu, D., & Capanoglu, E. (2018).  
953 Evaluation of Turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity,  
954 anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative  
955 effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line. *Journal of Apicultural*  
956 *Research*, 57(5), 627–638. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494888>

957 Palomino G, L. R., García P, C. M., Gil G, J. H., Rojano, B. A., & Durango R, D. L.  
958 (2009). DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES Y EVALUACIÓN  
959 DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS RECOLECTADOS EN  
960 EL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA (Colombia). *Vitae*, 16(3), 388–395.

961 Park, Y., Alencar, S., & Aguilar, C. (2007). Botanical Origin and Chemical Composition of  
962 Brazilian Propolis. *Agricultural and Food Chemisry*, 2502–2506.

963 Pavlovic, R., Borgonovo, G., Leoni, V., Giupponi, L., Ceciliani, G., Sala, S., Bassoli, A., &  
964 Giorgi, A. (2020). Effectiveness of different analytical methods for the  
965 characterization of propolis: A case of study in northern Italy. *Molecules*, 25(3), 1–25.  
966 <https://doi.org/10.3390/molecules25030504>

967 Pelantová, H., Bártová, S., & Kuzma, M. (2014). Natural Products Analysis. In V. Havlíček  
968 & J. Spížek (Eds.), *Natural Products Analysis* (p. 239). John Wiley & Sons.  
969 <https://doi.org/10.1002/9781118876015>

970 Pellati, F., Prencipe, F. P., Bertelli, D., & Benvenuti, S. (2013). An efficient chemical  
971 analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted  
972 extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-  
973 core technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 81–82, 126–  
974 132. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.003>

975 Peña, R. (2008). Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos.  
976 *Ciencia e Investigación Agraria: Revista Latinoamericana de Ciencias de La*  
977 *Agricultura*, 35(1), 17–26. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202008000100002>

978 Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P.,  
979 & Rastrelli, L. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of Algerian  
980 propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(21), 5080–5088.  
981 <https://doi.org/10.1021/jf400779w>

982 Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.  
983 G., Marcazzan, G. L., & Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the  
984 quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis.  
985 *Phytochemical Analysis*, *15*(4), 235–240. <https://doi.org/10.1002/pca.777>

986 Propolis. (2009). NATIONAL STANDARD OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA.  
987 In *GB/T 24283-2009*.

988 Pujirahayu, N., Suzuki, T., & Katayama, T. (2019). Cycloartane-type triterpenes and  
989 botanical origin of propolis of stingless Indonesian bee *tetragonula sapiens*. *Plants*,  
990 *8*(3). <https://doi.org/10.3390/plants8030057>

991 Ribeiro, I., Cadorin, T., De Alencar, S., Rosalen, P. L., & Ikegaki, M. (2012). The  
992 correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties  
993 of Brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*,  
994 *48*(3), 557–564. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502012000300023>

995 Rice-Evans, C., & Packer, L. (Eds.). (1996). *Flavonoids in health and disease* (second edi).

996 Rodríguez Rodríguez, L. E., Góngora Amores, W., Escalona Arias, A., Miranda Bazán, M.  
997 B., Batista Suárez, S., & Bermúdez Cisnero, Y. (2015). Optimización de la extracción  
998 alcohólica para la obtención de soluciones concentradas de propóleos. *Revista*

- 999 *Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 44(1), 47–57.  
1000 <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v44n1.54237>
- 1001 Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking  
1002 antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235–254.  
1003 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>
- 1004 Rösch, G. A. (1927). Observations on propolis – collecting bees. *BIOLOGISCHES*  
1005 *ZENTRALBLATT*, 47.
- 1006 Saito, É., Sacoda, P., Paviani, L. C., Paula, J. T., & Cabral, F. A. (2020). Conventional and  
1007 supercritical extraction of phenolic compounds from Brazilian red and green propolis.  
1008 *Separation Science and Technology*, 00(00), 1–8.  
1009 <https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1731755>
- 1010 Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., & Salatino, M. L. F. (2011). Propolis  
1011 research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, 28(5), 925–  
1012 936. <https://doi.org/10.1039/c0np00072h>
- 1013 Sanches, J., & Mata, G. (2013). Pigmentos Antimicrobianos de *Pycnoporus sanguineus*.  
1014 *ResearchGate*, September, 339–347.
- 1015 Sánchez, F. (2018). *PERFIL QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD*  
1016 *ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS RECOLECTADOS EN LA REGIÓN DEL BAJO*  
1017 *CAUCA ANTIOQUEÑO*. Universidad Nacional de Colombia.
- 1018 Sawaya, A. C. H. F., Souza, K., Marcucci, M. C., Cunha, I. B. S., & Shimizu, M. T. (2004).  
1019 Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and

1020 evaluation of their In vitro activity against gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of*  
1021 *Microbiology*, 35(1–2), 104–109. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000100017>

1022 Seyhan, M. F., Yılmaz, E., Timirci-Kahraman, Ö., Saygılı, N., Kısakesen, H. İ., Gazioğlu,  
1023 S., Gören, A. C., Eronat, A. P., Begüm Ceviz, A., Öztürk, T., Yılmaz-Aydoğan, H., &  
1024 Öztürk, O. (2019). Different propolis samples, phenolic content, and breast cancer cell  
1025 lines: Variable cytotoxicity ranging from ineffective to potent. *IUBMB Life*, 71(5),  
1026 619–631. <https://doi.org/10.1002/iub.1996>

1027 Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of*  
1028 *Ethnopharmacology*, 113(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>

1029 Shah, B., & Seth, A. . (2010). TEXTBOOK OF PHARMACOGNOSY AND  
1030 PHYTOCHEMISTRY. In *ELSEVIER*.  
1031 <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

1032 Silva, C. C. F. da, Salatino, A., Motta, L. B. da, Negri, G., & Salatino, M. L. F. (2019).  
1033 Chemical characterization, antioxidant and anti-HIV activities of a Brazilian propolis  
1034 from Ceará state. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 29(3), 309–318.  
1035 <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.001>

1036 Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of Total Phenols and  
1037 Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent.  
1038 *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 299, 152. <https://doi.org/10.1007/BF02530903>

1039 Soloway, S., & Wilen, S. (1952). Improved Ferric Chloride Test for Phenols. *ANALYTICAL*  
1040 *CHEMISTRY*, 6(24), 979.

- 1041 Soltani, E.-K., Mokhnache, K., & Charef, N. (2020). Polyphenol Contents and Antioxidant  
1042 Activity of Ethanolic and Aqueous Algerian Propolis Extracts (Region of Serdj el  
1043 ghoul). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(1), 1–4.  
1044 <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i1.3797>
- 1045 Sosa-López, Á. A., Cabrera, M. G., & Álvarez, M. Y. (2016). Vegetación de origen como  
1046 parámetro de caracterización microbiana de los propóleos Origin vegetation as a  
1047 parameter for characterization antimicrobial of propolis. *Selva Andina Biosphere*.  
1048 [http://www.scielo.org.bo/pdf/jsab/v4n1/v4n1\\_a02.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/jsab/v4n1/v4n1_a02.pdf)
- 1049 Sousa, B., De Oliveira, J., Barbosa, A. L., Druzian, J. I., & Pellegrini, F. (2020). Extraction  
1050 of propolis using supercritical carbon dioxide. In *Green Sustainable Process for*  
1051 *Chemical and Environmental Engineering and Science*. Elsevier Inc.  
1052 <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817388-6.00009-x>
- 1053 Stan, L., Al, L., & Dezmirean, D. (2011). Quality criteria for propolis standardization.  
1054 *Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 2–5.
- 1055 Sumalatha, B. V., Devprakash, Senthil Kumar, G. P., & Mani, T. (2012). Isolation of  
1056 flavonol of Tephrosia purpurea. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and*  
1057 *Chemical Sciences*, 3(3), 105–110.
- 1058 Svečnjak, L., Marijanović, Z., Okińczyc, P., Marek Kuś, P., & Jerković, I. (2020).  
1059 Mediterranean Propolis from the Adriatic Sea Islands as a Source of Natural  
1060 Antioxidants: Comprehensive Chemical Biodiversity Determined by GC-MS, FTIR-  
1061 ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MS, DPPH and FRAP Assay. *Antioxidants*, 9(4), 337.

- 1062 <https://doi.org/10.3390/antiox9040337>
- 1063 Szollosi, R., & Szollosi Varga, I. (2002). Total antioxidant power in some species of  
1064 Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biologica Szegediensis*, 46(3–4), 125–  
1065 127.
- 1066 Tang, T. X., Guo, W. Y., Xu, Y., Zhang, S. M., Xu, X. J., Wang, D. M., Zhao, Z. M., Zhu,  
1067 L. P., & Yang, D. P. (2014). Thin-layer chromatographic identification of chinese  
1068 propolis using chemometric fingerprinting. *Phytochemical Analysis*, 25(3), 266–272.  
1069 <https://doi.org/10.1002/pca.2502>
- 1070 Tolba, M. F., Azab, S. S., Khalifa, A. E., Abdel-Rahman, S. Z., & Abdel-Naim, A. B.  
1071 (2013). Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a  
1072 plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective,  
1073 hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life*, 65(8), 699–709.  
1074 <https://doi.org/10.1002/iub.1189>
- 1075 Tolosa, L . Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad  
1076 antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *ARS Pharmaceutical*, 187–  
1077 204.
- 1078 TRÁNSITO LÓPEZ, M. (2002). Flavonoides. *Offarm*, 21(4), 1689–1699.  
1079 <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- 1080 Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of  
1081 biologically active components from propolis; a preliminary study. *Chemistry Central*  
1082 *Journal*, 1(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-1-13>

1083 VANSELL, G. H., & BISSON, C. S. (1940). The characteristics, contaminants, processing  
1084 and uses of beeswax. *US Bureau of Entomology*.

1085 Venkatachalam, S. (2016). Ultraviolet and visible spectroscopy studies of nanofillers and  
1086 their polymer nanocomposites. In *Spectroscopy of Polymer Nanocomposites* (pp. 130–  
1087 157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40183-8.00006-9>

1088 Vimalkumar, C. S., Vilash, V., & & Krishnakumar, N. M. (2014). Comparative  
1089 Preliminary Phytochemical Analysis of Ethanolic Extracts of Leaves of *Olea Dioica*  
1090 *Roxb*, Infected with The Rust Fungus *Zaghouania oleo Cummins* and Non Infected  
1091 Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(4), 69–72.

1092 Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: Some parameters and  
1093 procedures for chemical quality control. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 37,  
1094 Issue 2, pp. 99–105). <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

1095 World Health Organization. (2002). General guidelines for methodologies on research and  
1096 evaluation of traditional medicine. *WHO*.

1097 Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., & Li, X. (2011). Antioxidant compounds  
1098 from propolis collected in Anhui, China. *Molecules*, 16(4), 3444–3455.  
1099 <https://doi.org/10.3390/molecules16043444>

1100 Yokoyama, T., Kosaka, Y., & Mizuguchi, M. (2014). Inhibitory activities of propolis and  
1101 its promising component, caffeic acid phenethyl ester, against amyloidogenesis of  
1102 human transthyretin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(21), 8928–8935.  
1103 <https://doi.org/10.1021/jm500997m>



1104 Yuan, M., Yuan, X.-J., Pineda, M., Liang, Z., He, J., Sun, S., Pan, T., & Li, K.-P. (2020).  
1105 Comparative study between Chinese propolis and Brazilian green propolis: metabolite  
1106 profile and bioactivity. *Food & Function*, 0–24. <https://doi.org/10.1039/c9fo02051a>

1107 Zaccaria, V., Garzarella, E. U., Giovanni, C. Di, Galeotti, F., Gisone, L., Campoccia, D.,  
1108 Volpi, N., Arciola, C. R., & Daglia, M. (2019). Multi dynamic extraction: An  
1109 innovative method to obtain a standardized chemically and biologically reproducible  
1110 polyphenol extract from poplar-type propolis to be used for its anti-infective properties.  
1111 *Materials*, 12(22). <https://doi.org/10.3390/ma12223746>

## - Artículo 2:

El siguiente artículo fue preparado para la revista cuya información se indica a continuación							
Título de la revista	Información Tecnológica						
Consulta de instrucciones a los autores	<a href="https://www.citrevistas.cl/documentos/CIT_Normas_Formato_2020-2022.pdf">https://www.citrevistas.cl/documentos/CIT_Normas_Formato_2020-2022.pdf</a>						
Sección de la revista para la cual se aplica	<b>Investigación</b>						
Estado del artículo	No sometido	X	Sometido		Aceptado para pub.		Publicado

### **PERFIL QUÍMICO, ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y CRITERIOS DE CALIDAD DE PROPÓLEO RECOLECTADOS EN CUATRO SUBREGIONES DE ANTIOQUIA-COLOMBIA PARA SU OFERTA COMO INGREDIENTE NATURAL.**

Zaribey A. Bueno R.1; Elizabeth Cadavid.2

- (1) Facultad de Ciencias y biotecnología, Programa de biología, Univ. CES, Cl. 10a #22 - 04, Medellín, Antioquia- Colombia

(correo-e: [bueno.zaribey@uces.edu.co](mailto:bueno.zaribey@uces.edu.co))

- (2) Facultad de Ciencias y biotecnología, Programa de Química Farmacéutica, Univ. CES, Cl. 10a #22 - 04, Medellín, Antioquia- Colombia

(correo-e: [ecadavidt@ces.edu.co](mailto:ecadavidt@ces.edu.co))

#### **RESUMEN**

El objetivo fue evaluar propóleos de cuatro subregiones de Antioquia-Colombia (Oriente; Sur-este, Bajo Cauca, Urabá) bajo especificaciones de materia prima, mediante pruebas de control calidad y metodologías cromatográficas para la detección de seis compuestos fenólicos esperados. Se determinó la calidad tomando como referencia lo establecido en las distintas normatividades disponibles, las cuales exigen pruebas rutinarias de caracterización, evaluación cualitativa y cuantitativa. La detección de compuestos fenólicos se realizó por técnicas previamente estandarizadas de TLC y HPLC UV-DAD. Resultando que ninguna de las muestras recolectadas de propóleos aprueba todos los estándares calidad, aunque se presentan detención de los tres flavonoides evaluados por HPLC; se desestiman los resultados por baja coincidencia en el match factor. Se concluye que dos de las cuatro subregiones de Antioquia, recolectan propóleo con la calidad más cercana a las especificaciones de materia prima de interés para las industrias.

Palabras clave: HPLC-DAD, TLC, actividad antibacteriana, actividad antioxidante, flavonoides

#### **CHEMICAL PROFILE, BIOLOGICAL ACTIVITY AND QUALITY CRITERIA OF PROPOLIS COLLECTED IN FOUR SUBREGIONS OF ANTIOQUIA-COLOMBIA TO BE OFFERED AS A NATURAL INGREDIENT.**

#### **Abstract**

The objective was to evaluate propolis from four subregions of Antioquia-Colombia (Oriente; Sur-este, Bajo Cauca, Urabá) under raw material specifications, by means of quality control tests and chromatographic methodologies for the detection of six expected phenolic compounds. The quality was determined taking as a reference what is established in the different regulations available, which require routine characterization tests, qualitative and quantitative evaluation. The detection of phenolic compounds was carried out by previously standardized TLC and HPLC UV-DAD techniques.

As a result, none of the propolis samples collected passed all the quality standards, although the three flavonoids evaluated by HPLC were stopped; the results were discarded due to low coincidence in the match factor. It is concluded that two of the four subregions of Antioquia collect propolis with the quality closest to the specifications of raw material of interest for the industries.

Key words: HPLC-DAD, TLC, antibacterial activity, antioxidant activity, flavonoids.

## **INTRODUCCIÓN**

Las características físico-químicas y actividades biológicas de los productos naturales, varían por diversos factores (Ávalos, A. y Pérez, 2009). Las abejas elaboran productos naturales de origen animal como miel, cera, polen, jalea real y propóleo, utilizados desde la antigüedad con aplicaciones medicinales, cosméticas y alimenticias (Toledo, 2011). El propóleo es una mezcla compleja y resinosa de: exudados de plantas con la secreción cerosa de las abejas. Cuenta con extensas publicaciones sobre su composición (Bankova et al., 1983), procesos óptimos de extracción (Kapare et al., 2019), marcadores de origen (Maraschin et al., 2016) y actividades biológicas como: antioxidante (Jang et al., 2009), antimicrobiano (Tolosa, L. Cañizares, 2002), anti-inflamatorio (Sousa et al., 2020) y anticancerígeno (Kapare et al., 2019). Dichos estudios además comprueban que, dependiendo de su geolocalización, se generan variaciones entre las propiedades físicas, perfiles químicos y la principal actividad biológica. Por ejemplo, los ensayos realizados por Costa y colaboradores (Costa et al., 2020) y Ribeiro y colaboradores (Ribeiro et al., 2012) donde se comparan propóleos recolectados en distintas zonas del mismo país, muestran diferencias desde su coloración, hasta contenido de flavonoides y nivel de actividad antioxidante y anticancerígena. Esto se explica por la variación entre la composición de las resinas vegetales a las que tienen acceso las abejas para la elaboración del mismo (Alencar et al., 2007). Los usos medicinales a nivel mundial incluyen formulaciones contra el resfriado común, quemaduras, acné, herpes, neurodermatitis y para favorecer la cicatrización de heridas, pero sin lograr aún incorporarse dentro otras formulaciones con usos terapéuticos más complejos a pesar de los resultados demostrados como anticancerígenos, antivirales, o antibióticos. El interés en los propóleos sigue la tendencia mundial de buscar alternativas terapéuticas de origen natural (Alamgir, 2018). Hay países, como China y Brasil, donde luego de años de investigación, se ha logrado caracterizar y elucidar los componentes contenidos en los propóleos nativos, a través de técnicas instrumentales de separación e identificación, como cromatografía líquida (HPLC-DAD) (Liu et al., 2018), espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) (Yuan et al., 2020) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) (Correa et al., 2019), las cuales han comprobado la presencia de entre 5 a 70 compuestos (Pavlovic et al., 2020) en muestras de propóleos con presencia de diversas actividades biológicas de interés común. Una caracterización completa de los compuestos contenidos en propóleos no elucidados, como los de varias regiones colombianas, debe considerar desde las metodologías más rutinarias como HPLC hasta las más complejas, como su acoplamiento a HRMS y NMR. Dentro de las sustancias encontradas de forma aislada con dichas técnicas instrumentales, resaltan el Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) y la Aterpilina C con alto poder anticancerígeno (Sforcin, 2007) y; Quercetina y Kaempferol como coadyuvantes efectivos en los tratamientos contra el cáncer (Staedler et al., 2011). En Colombia desde el año 2007 se empezaron a realizar publicaciones sobre caracterización de propóleos antioqueños (Martínez G et al., 2012; Martínez Galán, 2009; Palomino G et al., 2009). Con la intención de proponer aplicaciones industriales como materia prima, se debe cumplir con las especificaciones exigidas en las normas internacionales de calidad vigentes, a pesar de que no estén conformes a las particularidades de los propóleos colombianos. Para proponer el desarrollo de una normatividad nacional específica, se debe contar con una evaluación de las normas actuales, además de una caracterización robusta y sofisticada de los propóleos nativos, que permita especificar criterios de calidad ajustados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Manipulación de las muestras**

Se emplearon cuatro mezclas de propóleos recolectados por asociaciones oficiales de apicultores en Antioquia, localizados en cuatro de sus municipios (Sur-este; Bajo Cauca; Urabá; Oriente). Se entiende por mezclas a la unión y homogeneización de los propóleos recolectados en el mismo

municipio, pero en diferentes apiarios. Cada una de las mezclas fue renombrada según su zona de recolección, como: P-Zona1, P-Zona2, P-Zona3, P-Zona4.

#### *Recolección*

Las muestras fueron recolectadas por los apicultores a partir de trampas plásticas para propóleos, evitando su contaminación con otras sustancias y la exposición directa y prolongada a la radiación solar. Luego se llevaron a refrigeradores industriales con temperaturas entre -20°C y -30°C por una hora, pasado el tiempo se retiró el propóleo solidificado de las trampas, y se volvió a almacenar entre -20°C y -30°C hasta el momento del acondicionamiento.

#### *Acondicionamiento y preparación de mezclas*

El acondicionamiento se realizó de acuerdo a la norma NOM-003-SAG/GAN-2017 según el ítem 6.1. Posteriormente se procedió a pesar igual cantidad de cada una de las muestras diferenciadas por zona y se almacenaron a -40°C en un ultra congelador Bio-Medical en bolsas de poliestireno.

#### *Extracto etanólico de propóleo*

Se pesaron 30 gramos de P-Zona1, P-Zona2, P-Zona3, y P-Zona4 por separado, se le añadió etanol HoneyWell al 70% en proporciones 1:3 (DER) a cada muestra y se apoyó la extracción con sonicador LabScient por 30 min con potencia alta a temperatura ambiente. Se filtró por filtros cualitativos Whatman y el filtrado se concentró en un rotaevaporador-R Buch a 50°C y 6.6 mbar. Cada uno de los cuatro concentrados se conservó en refrigeración, protegido de la luz hasta el momento de realizar los análisis.

#### **Pruebas de calidad en propóleo**

De acuerdo a las normatividades revisadas<sup>1-3</sup> se realizan los siguientes ensayos en el propóleo crudo luego de ser acondicionado: 1) Determinación del color, 2) Determinación de aroma, 3) Consistencia a temperatura ambiente, 4) pérdida por secado, 5) porcentaje de ceras, 6) Determinación cualitativa flavonoides, 7) Determinación cualitativa fenoles totales, 8) cuantificación de plomo, 9) Solubilidad en etanol, y 10) cenizas orgánicas. Mientras que para evaluar la calidad de los extractos etanólicos de propóleos se realiza: 1) Determinación cualitativa flavonoides, 2) Determinación cualitativa fenoles totales, 3) Determinación cualitativa de índice de oxidación, 5) Determinación cuantitativa compuestos fenólicos, 6) Determinación cuantitativa flavonoides, y 7) actividad antioxidante.

Las pruebas de determinación del color, aroma, consistencia; determinación cualitativa flavonoides, fenoles totales e índice de oxidación; determinación cuantitativa de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante; se realizaron de acuerdo a la norma mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 según los ítems 6.2.1, 6.2.2, 6.2.3, 6.3.2, 6.3.3, 6.3.4, 6.3.5, y 6.3.6 respectivamente. La prueba de porcentaje de humedad se realizó siguiendo la metodología propuesta en la norma AOAC 930.15 y los ensayos de solubilidad en etanol e impurezas mecánicas siguiendo la metodología de la Normatividad Salvadoreña NSO 65.19.02:03. El porcentaje de ceras se calculó por diferencia de peso partiendo de 2 g de la mezcla de propóleos crudos y utilizando un equipo SOXTEC 2043 FOSS a condiciones estandarizadas de 105°C durante seis horas con éter de petróleo como disolvente.

La ausencia de plomo se determinó mediante absorción atómica de llama en un espectrómetro AA240 Varian, con 3 g de propóleos crudos, llevándolos previamente a mufla Terrigeno a 600°C por cuatro horas, posterior a este tiempo se dejó temperar en un desecador, luego se le agregó 5mL de ácido clorhídrico concentrado, más 15mL de agua tipo I; se filtró y el contenido se llevó a un balón volumétrico de 25mL aforando con agua tipo I; la solución madre del estándar de plomo se preparó a 100 ppm y se realizaron diluciones seriadas hasta conseguir concentraciones de 5ppm, 4ppm, 3ppm y 2ppm en HCl 0,1N. En todos los casos los solventes grado reactivo fueron obtenidos de la casa productora Scharlau, mientras que los reactivos de reacciones colorimétricas y estándares empleados fueron marca PanReac.

#### **Perfil químico de extractos etanólicos de propóleo**

Se evaluó el perfil químico de los extractos etanólicos de propóleos mediante dos técnicas cromatográficas estandarizadas: Cromatografía en capa fina y cromatografía líquida.

### *Cromatografía en capa fina TLC*

La fase móvil seleccionada fue la comprendida por una mezcla de diclorometano y metanol en proporciones 10:1, ambos de la casa Sacharlaw, y homogenizados por sonicación. Se sembraron 5 uL de muestra en la base de la placa y se continuó con la elución. Una vez eluida la muestra se llevó la cromatoplaque a una cámara de revelado con lámpara de luz ultravioleta de onda corta de 254nm y de onda larga de 365nm. Como estándares de referencia se usaron tres estándares de flavonoides USP (Quercetina- CAS117-39-5, Kamferol-CAS 520-18-3, Isorhamnetina-CAS 480-19-3); un estándar de ácido fenólico Sigma Aldrich (Ácido Gálico- CAS 149-91-7); dos estándares de derivados de ácidos fenólicos Sigma Aldrich y MuseChem (CAPE- CAS 104594-70-9 y ArtepilinaC- CAS 72944-19-5); todos a concentraciones de 1.0 mg/mL, 0.10 mg/mL y 0.05 mg/mL en metanol. Al mismo tiempo se obtuvo un sistema resuelto de los extractos etanólicos provenientes de cada subregión diluidos en 0.5mL de metanol obteniendo una concentración final de 15mg/mL.

### *Cromatografía Líquida HPLC*

Se empleó un cromatógrafo Thermo Ultimate 3000 con detector UV/VIS-DAD, columna C18 Kinetex 2.6um, 4.6x150mm. Se inyectaron 50 uL de la solución de extracto etanólico seco de propóleo a 3 mg/mL en metanol, como estándares externos se usaron los mismos que el procedimiento anterior a una concentración de 1 mg/mL, todas las muestras se filtraron a través de una membrana de nylon de 0.22 um. La fase móvil consistió en 100% de una mezcla de metanol, agua y ácido fosfórico en proporciones 100:100:1, la cual fue filtrada bajo la misma especificación. La corrida se realizó a 30°C con un flujo de 1,5 mL/min durante 70 min leyendo a longitudes de onda de 278nm y 370nm.

### **Actividad biológica**

La capacidad antimicrobiana de los extractos etanólicos del propóleo, se evaluó sobre las cepas *S. aureus* y *E. coli* siguiendo la metodología para la determinación de la concentración mínima inhibitoria en medio líquido según se indica en la CLSI y NTC 2455. La evaluación de la capacidad antimicrobiana se hizo para cada una de las subregiones de las cuales se obtuvo el propóleo y preparado a concentraciones entre 50ug/mL-0.39ug/mL.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se encontraron reportadas diversas metodologías para la ejecución de los ensayos de caracterización físico-química, criterios de calidad y actividad antibacteriana<sup>4-11</sup>. Luego de revisar las normatividades, se encontró falta de armonización entre los ensayos de calidad escogidos para evaluar propóleos. La norma brasileña (Normativa N°11, de 20 de Octubre de 2000) vigente desde el año 2000 exige especificaciones sin aclarar metodologías, la norma salvadoreña (NSO 67.03.01:01) contiene iguales especificaciones, presentando metodologías más completas, sin embargo, propone dos ensayos para parámetros de identificación de compuestos fenólicos y flavonoides, sin aclarar si se deben realizar en conjunto o se puede escoger a conveniencia cual emplear. Por su parte, la normatividad mexicana (NOM-003-SAG/GAN-2017) excluye las pruebas de contenido de humedad, ceras e impurezas; e incluye pruebas adicionales como la actividad antioxidante y antibacteriana. Se considera la normatividad mexicana como la más clara en cuanto a sus metodologías, no obstante, los ítems de identificación de compuestos fenólicos e índice de oxidación; proponen tomar 200mg de muestra, ya sea propóleo crudo o extracto seco, y considerar intercambiables los resultados obtenidos bajo las mismas condiciones, en las cuales se exponen a reacciones colorimétricas con igual cantidad de reactivos, situación que puede llevar a deducciones erróneas sobre la muestra, debido a que el extracto siempre contendrá los compuestos fenólicos en mayor concentración con respecto al propóleo crudo.

Los resultados de calidad obtenidos para las muestras de propóleo crudo de cada una de las subregiones, se resumen en la Tabla 1, y los resultados para sus extractos etanólicos en la Tabla 2. En ambas se encuentran tanto las especificaciones como los resultados arrojados por cada muestra.

Tabla 1: Resultados pruebas de calidad en propóleos crudos y su especificación según las normatividades

Sub- Región / Prueba de calidad	Especificación	P-Zona1	P-Zona2	P-Zona3	P-Zona4
% Solubilidad en etanol al 70 <sup>a,c</sup>	>35% <sup>a</sup>	35	42	52	68
Color <sup>a,b,c</sup>	Variable según origen botánico. <sup>a,b,c</sup>	Beige	Café oscuro	Café medio	Rojizo
Consistencia <sup>a,b,c</sup>	maleable o rígido <sup>a,b,c</sup>	arenoso y maleable	muy maleable y pegajoso	medianament e maleable y pegajoso	poco maleable
Aroma <sup>a,b,c</sup>	Resinoso o balsámico <sup>a,b,c</sup>	Balsámico	Resinoso madoroso	Resinoso frutal	Resinoso frutal
Presencia compuestos fenólicos <sup>a,b,c</sup>	Positiva <sup>a,b,c</sup>	negativa	positiva	Positiva	Positiva
Presencia flavonoides <sup>a,b,c</sup>	Positiva <sup>a,b,c</sup>	negativa	positiva	Positiva	Positiva
Contenido de Cenizas <sup>a,c</sup>	Máximo 5 % <sup>a,c</sup>	1 %	2 %	2 %	1 %
Pérdida por secado <sup>a,c</sup>	máximo 8 % <sup>a,c</sup>	23 %	6 %	4 %	5 %
% Cera <sup>a,c</sup>	máximo 30% <sup>c</sup>	70	56	52	45
Contenido de Plomo (ppm) <sup>a,c</sup>	< 0,5 <sup>c</sup>	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2

<sup>a</sup> Prueba o especificación reportada en normatividad brasileña (Normativa N°11, de 20 de Outubro de 2000)

<sup>b</sup> Prueba o especificación reportada en normatividad mexicana (NOM-003-SAG/GAN-2017)

<sup>c</sup> Prueba o especificación reportada en normatividad salvadoreña (NSO 67.03.01:01)

En la tabla 1 donde se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de calidad para propóleo crudo se evidencia que, para las especificaciones no organolépticas, las muestras P-Zona4, P-Zona3, y P-Zona2 presentan seis (presencia de compuestos fenólicos, presencia de flavonoides, contenido de cenizas, porcentaje de humedad, contenido de plomo, solubilidad en etanol) de los siete ítems dentro de las especificaciones, mientras que P-Zona1 presenta dos (contenido de cenizas, contenido de plomo). Por el momento las características organolépticas, no son relacionables con algún parámetro químico, sin embargo, es indicio de la variabilidad que puede presentarse según el origen. El porcentaje de solubilidad de las cuatro muestras es superior al 30%, siendo P-Zona4 y P-Zona3 las que muestran los valores más altos, de 68% y 52% respectivamente, y por tanto se espera que presenten mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos finales. Las pruebas colorimétricas de presencia de compuestos fenólicos y flavonoides indican que P-Zona4, P-Zona3, y P-Zona2 tienen presencia tanto de fenoles totales como de flavonoides mientras que el P-Zona1 las carece. Los flavonoides se encuentran entre los grupos de sustancias bioactivas más estudiados en las plantas, debido a sus reconocidas actividades fisiológicas, como antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos<sup>12</sup> las cuales han sido comprobadas en diferentes estudios<sup>13-15</sup>, además su presencia es reportada en alto porcentaje en las resinas constituyentes de propóleos<sup>16</sup>, en conjunto con la presencia de compuestos fenólicos no

flavonoides, contemplados dentro de los compuestos fenólicos totales, los cuales aunque han sido menos estudiados, algunos autores destacan actividades biológicas esenciales como anticancerígenos<sup>17-19</sup>.

El contenido de cenizas se relaciona con el porcentaje de impurezas inorgánicas, tales como metales pesados o minerales<sup>20</sup>; todas las muestras están por debajo de la especificación indicando que no se espera presencia de estos, traduciéndose en la seguridad del producto para su consumo y desde el punto de vista nutricional, esta matriz carece de minerales de posible interés nutricional. El contenido de plomo es una prueba de interés para conocer si las pinturas con las que acondicionan las colmenas no están desprendiendo el metal tóxico para el consumo humano, en todos los casos no pudo ser cuantificado ni detectado por debajo de 0.2ppm, resultado que se encuentra en concordancia con el porcentaje de impurezas inorgánicas.

La pérdida por secado indica el porcentaje de agua libre presente en las muestras<sup>21,22</sup>, este es un parámetro que habla de la salud de las colmenas ya que un ambiente con baja humedad asegura condiciones de temperatura óptimas para el nacimiento y desarrollo de nuevas abejas, baja exposición a contaminantes externos y presencia de propóleos que ejercen correctamente su función<sup>23,24</sup>; en consecuencia expone si la calidad de las resinas para la producción de los propóleos a las que tienen acceso las abejas por su ubicación geográfica, es adecuada, únicamente la muestra P-Zona1 se encuentra por fuera de la especificación de máximo 8%, por 15 unidades (23%). El alto contenido de ceras, por fuera de la especificación de máximo 30%, en las cuatro subregiones P-Zona1, P-Zona2, P-Zona3, P-Zona4 se puede deber a la mezcla de resinas con ceras endógenas y exógenas a las abejas, cuando las resinas no se encuentran en suficiente cantidad o calidad<sup>8</sup>, también se ha reportado un aumento en el porcentaje de ceras como resultado de la época del año en que se recolecta el propóleo o de una mala manipulación del producto por parte del apicultor, afectando la calidad ya que disminuye el contenido de resinas ricas en flavonoides solubles en etanol<sup>25</sup>.

Tabla 2: Resultados pruebas de calidad para extractos etanólicos de propóleos y su especificación según las normatividades

Prueba / Sub-Región	P-Zona4	P-Zona3	P-Zona2	P-Zona1	Especificación
Densidad (g/mL)	0,84	0,83	0,83	0,84	Solvente 0.85
pH	4,43	4,02	4,33	5,26	Solvente 5.50
Solubilidad Agua	muy soluble	muy soluble	muy soluble	muy soluble	Solvente Muy soluble
Solubilidad Hexano	Poco soluble	Poco soluble	Poco soluble	Poco soluble	Solvente Poco soluble
Capacidad antioxidante (segundos) <sup>a,b,c</sup>	< 22	< 22	>22	negativa	≤22 <sup>a,b,c</sup>
Fenoles totales <sup>a,b,c</sup>	Positiva	Positiva	positiva	positiva	Positiva <sup>a,b,c</sup>
Flavonoides totales <sup>a,b,c</sup>	Positiva	Positiva	positiva	negativa	Positiva <sup>a,b,c</sup>
Fenoles totales (%m / v Eq Ácido Gálico) <sup>a,b,c</sup>	37%	14 %	6 %	5 %	> 5% (m/m) <sup>b</sup>
Flavonoides totales (% m / v Eq Quercetina) <sup>a,b,c</sup>	5,1%	4%	3,6%	0,4%	> 0.5 % (m/m) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Prueba o especificación reportada en normatividad brasileña (Normativa N°11, de 20 de Outubro de 2000)

<sup>b</sup> Prueba o especificación reportada en normatividad mexicana (NOM-003-SAG/GAN-2017)

<sup>c</sup> Prueba o especificación reportada en normatividad salvadoreña (NSO 67.03.01:01)

En la tabla 2, se muestran los resultados para las pruebas de calidad del extracto etanólico de propóleo, donde los ensayos de densidad, pH y solubilidades que son informativos, debido a que ninguna de las normatividades los considera dentro de sus requerimientos. La densidad de los extractos se mantiene cercana a la del solvente (0.85), indicando que las soluciones están insaturadas. El pH del solvente (5.5) disminuyó en todos los casos entre 0.24 y 1.48 unidades, indicando que las sustancias disueltas aportan acidez a la solución, es decir que contiene disueltos grupos funcionales con hidrógenos disponibles para reaccionar, esperados en los compuestos fenólicos. Se encontró que el extracto etanólico es muy miscible en agua, menos de una parte de disolvente requeridas para 1 parte de soluto, y poco miscible en hexano, 200 partes de disolvente requeridas para 1 parte de soluto.



De las cinco pruebas exigidas en las normatividades, P-Zona1 cumplió con una (presencia de fenoles totales), mientras P-Zona2 con cuatro (presencia de fenoles totales, presencia de flavonoides, porcentajes mínimos para la cuantificación de fenoles totales y flavonoides), tanto P-Zona3 como P-Zona4 cumplieron con las cinco especificaciones. La presencia de fenoles totales arrojó resultados positivos en las cuatro muestras. Para la cuantificación de fenoles totales se obtuvo un porcentaje en P-Zona1 de 5%, P-Zona2 de 6%, P-Zona3 de 14% y, P-Zona4 de 37%. La presencia de flavonoides totales arrojó resultados positivos en P-Zona2, P-Zona3 y, P-Zona4, luego se cuantificó encontrando a P-Zona1 con 0.4%, P-Zona2 con 3.6%, P-Zona3 con 4% y, P-Zona4 con 5.1%, encontrando que P-Zona1 se encuentra por debajo de la especificación, lo cual corresponde con el resultado de la prueba colorimétrica de ausencia de flavonoides. En el caso de la capacidad antioxidante, P-Zona3 y P-Zona4 lograron resultados en un tiempo igual o inferior a los 22 segundos en la prueba de Índice de oxidación con permanganato de potasio. Los antioxidantes desempeñan un importante papel en la reducción del riesgo de un amplio espectro de enfermedades crónicas; y la identificación y el aislamiento de antioxidantes a partir de fuentes naturales se ha convertido en un área activa de investigación, ya que varios productos naturales, como los propóleos, han mostrado una potente actividad antioxidante<sup>6,7,26-31</sup>

Con los ensayos por cromatografía de capa fina se encontró que los estándares evaluados son detectables hasta concentraciones de 0.1mg/mL bajo el sistema propuesto, a ambas longitudes de ondas, lo que indica la sensibilidad del método. P-Zona1 mostró presencia de una señal observable a longitud de onda larga (360nm) a un Rf de 0.93 mientras que para el caso del P-Zona2 se evidenciaron tres señales a longitud de onda corta(265 nm) a unos Rf de 0.92, 0.84, 0.43; tanto en el caso de, P-Zona3 con Rf de 0.93, 0.82, 0.42, 0.38, 0.34, 0.25, 0.12, 0.07, y P-Zona4 con nueve señales a Rf de 0.93, 0.86, 0.82, 0.44, 0.38, 0.34, 0.27, 0.20, 0.13, 0.06, fueron visibles las señales entre las dos longitudes de onda de 265nm y 360nm. De esta señales descritas, se encontró coincidencia por RF de Quercetina(0.38), CAPE(0.25), Isohrentina(0.20) y Kamferol(0.13) en la muestra P-Zona4; de Quercetina en el extracto de P-Zona3 y sin coincidencias en las muestras de P-Zona1 y P-Zona2.

Por cromatografía líquida, a longitud de onda de 278nm, seleccionada por su capacidad para detectar compuestos aromáticos con posible actividad antioxidante<sup>32-34</sup>, se observó presencia de tres señales, para la muestra P-Zona1, seis para la muestra P-Zona2, diez para P-Zona3 y treinta y tres para P-Zona4. Se tuvo coincidencia de tiempos de retención al minuto 7.06, en todas las muestras con el estándar de Kamferol, pero al comprobar el espectro UV se evidenció un match factor inferior a 600 en todos los casos, es decir que al evaluar similitud entre los espectros obtenidos en las muestras contra el del estándar, no se obtuvo un valor de coincidencia mayor a 900, que es lo esperado para confirmar la identidad del compuesto. En la muestra del P-Zona4 hubo además coincidencia por tiempo de retención con Quercetina, Isohrentina, y ácido gálico, en los minutos 3.57 y 8.11 respectivamente, sin embargo, al comparar los perfiles de absorción del espectro UV se desestimó la presencia de dichas moléculas por la falta de coincidencias con el estándar. Bajo la condición de una longitud de onda 370nm, seleccionada por su selectividad para detectar flavonoides, solo se evidenciaron señales en la muestra P-Zona4. Se encontró que, aunque la técnica por TLC puede ser más sencilla de replicar con fines de aplicabilidad en la normatividad, presenta menor sensibilidad y carece de tecnologías que permitan comparaciones más específicas que permitan evitar falsos positivos por coincidencias de RF's o tiempos de retención.

La actividad antioxidante se calculó por espectrofotometría con DPPH A 0.04mg/mL vs. Las muestras a 1mg/mL, según la norma NOM-003-SAG/GAN-201, arrojando los siguientes resultados: 2% P-Zona1; 86% P-Zona2; 92% P-Zona3; 42% P-Zona4, resultados que se relacionan con los obtenidos con la prueba de permanganato, ya que en ambas ocurre la cesión de electrones de las especies antioxidantes, sin embargo en el extracto a 0.02mg/mL preparado para la prueba con DPPH, se observa que la muestra P-Zona4 presenta mejor resultado que la muestra del P-Zona2, probablemente como se señala en algunos artículos, al comparar diferentes metodologías cambia la selectividad, en el caso del ensayo con permanganato de potasio se ha reportado menor selectividad lo que le permite reaccionar con cualquier compuesto hidroxilado presenta en la muestra, independientemente de que tenga o no potencial antioxidante mientras que el radical DPPH, con

impedimento estérico, logra ser más selectivo. En el caso de P-Zona4 donde la cuantificación de fenoles totales y flavonoides presentó los valores más altos (37%-5.1%) a su vez presentó el contenido de ceras de valor más bajo(45%), situación replicable en las otras tres subregiones, relacionando de forma inversamente proporcional estos dos criterios como se había expuesto anteriormente. La prueba de actividad antimicrobiana con el extracto etanólico del propóleo a concentraciones entre 0.39ug/ml - 50ug/mL, concentraciones más bajas a las propuestas en la normatividad mexicana con la finalidad de obtener resultados asociables un alto efecto biológico y no a un fenómeno osmótico en dos cepas causantes de variadas infecciones en el cuerpo humano, no presentó efecto inhibitorio del crecimiento sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, lo que indica que, aunque tiene actividad antioxidante, no presenta efecto antimicrobiano suficiente para ser detectado por la prueba.

Con estos resultados se confirma alta variabilidad según el origen botánico, incluso dentro del mismo departamento, como ha sido reportado en otros estudios<sup>35-37</sup>, por lo que se considera importante el estudio de las variables geográficas de la zona de recolección de propóleo con los mejores resultados, para proponer su simulación en otros apiarios. Ninguna de las muestras de los cuatro subregiones cumpliría con todos los criterios de calidad, siendo el parámetro de porcentaje de ceras el único que se encuentra fuera de la especificación para las muestras de P-Zona3 y P-Zona4. La muestra obtenida del P-Zona3, demostró valores intermedios al compararse con el resto de las subregiones, para la mayoría de sus resultados, exceptuando la actividad antioxidante en la que presentó el resultado más alto. Por último, la muestra recolectada en P-Zona4, fue la que presentó los resultados de mayor valor en cuanto a cuantificación e identificación de compuestos, esto es de interés debido a que fue el único en presentar una coloración rojiza, relacionada en otros artículos con alto contenido de compuestos fenólicos<sup>38</sup>; sin embargo, esto no se relacionó directamente con la actividad antioxidante, ya que presentó el segundo resultado más bajo entre las cuatro muestras.

Se encuentra que los propóleos P-Zona1, son los que cumplieron en menor proporción con los parámetros de calidad, además de la concientización en la importancia de la biodiversidad circundante a las colmenas, así mismo, estos resultados se correlacionan con una menor cantidad de señales bajo las dos técnicas cromatográficas, HPLC y TLC, y en últimas, con una menor actividad antioxidante.

En el caso de los propóleos P-Zona2 se encuentra que aunque aprueba la misma cantidad de criterios de calidad que el restante de muestras recolectados en subregiones diferentes, estos son los propóleos que presentan los valores más cercanos a los límites inferiores de aceptación, con tres señales detectadas bajo TLC y el doble por HPLC, sin embargo, es la que presenta el segundo mejor resultado para la actividad antioxidante, permitiendo pensar que esta actividad dependen en mayor proporción del tipo y concentración de compuesto fenólicos presente y en menor proporción de la cantidad de ellos.

En este punto, se propone que una mayor concentración de compuestos fenólicos en el propóleo, no siempre se correlaciona con su actividad biológica. Aunque diferentes países han establecido reglamentos para definir las normas mínimas de calidad de los propóleos comerciales, definir y evaluar la calidad del propóleo es algo complicado debido a su variabilidad geográfica y estacional. A pesar de ello, es necesario disponer de una caracterización química robusta y fiable de una sustancia natural que suele intervenir en varios procesos industriales

## **CONCLUSIONES**

La falta de armonización en las normatividades, en conjunto con inconsistencias en las metodologías resulta en una necesidad de proponer una normatividad nacional completa y detalladas para evaluar este producto de colmena, y así potenciar su inclusión en el mercado.

Se concluye que ninguna de las muestras consigue cumplir con el total de las especificaciones propuestas en conjunto, por las normatividades internacionales seleccionadas. Sin embargo, P-Zona2, P-Zona3 y P-Zona4 presentan resultados de criterios de calidad suficientes dentro de las especificaciones de la norma mexicana para ser propuestos como materia prima en distintas

industrias; ya que presentan cuantificaciones de los compuestos de interés superiores a lo solicitado, además de una alta actividad antioxidante por la metodología más selectiva, con DPPH; demostrando que un cambio en la especificación de contenido de ceras para una norma nacional sería necesario. Se encontró además que una mayor concentración de compuestos fenólicos en el propóleo antioqueño, no se correlaciona con mayor actividad biológica antioxidante o antibacteriana.

Aunque la metodología más aceptada para la cuantificación de los compuestos fenólicos es la espectrofotometría; se encontró que, por la complejidad de la matriz biológica, se generan resultados erróneos, por lo que se recomienda acompañar la identificación de los compuestos con la evaluación del parámetro del match factor por HPLC-DAD. La evaluación del perfil químico por TLC y HPLC confirma la variabilidad en tipos y cantidad de compuestos presentes en cada muestra, por lo que se propone seguir avanzando en las evaluaciones, acoplando los resultados con los obtenidos por tecnologías de MS y NMR, hasta disponer de una caracterización química estandarizada, robusta y fiable que permita proponer cuáles compuestos y en qué cantidad están presentes, en los propóleos Colombianos de Antioquia, que permitan justificar sus aplicaciones industriales.

## REFERENCIAS

- Al-Ghamdi, A. A., Bayaqoob, N. I. M., Rushdi, A. I., Alattal, Y., Simoneit, B. R. T., El-Mubarak, A. H., & Al-Mutlaq, K. F. (2017). Chemical compositions and characteristics of organic compounds in propolis from Yemen. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5), 1094–1103. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.012>
- Alencar, S. M., Oldoni, T. L. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A., Rosalen, P. L., & Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología)*. *REDUCA (Biología)*, 2(3), 119–145. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>
- Bankova, V. S., Popov, S. S., & Marekov, N. L. (1983). A study on flavonoids of propolis. *Journal of Natural Products*, 46(4), 471–474. <https://doi.org/10.1021/np50028a007>
- Norma salvadoreña NSO 67.03.01:01 CALIDAD DE PROPOLEO CRUDO, Ministerio de Economía 11 (2003). [https://www.oirsa.org/contenido/2017/EI\\_Salvador\\_INOCUIDAD/8\\_NS0\\_65\\_19\\_02\\_03\\_-\\_CALIDAD\\_DE\\_PROPOLEO\\_CRUDO.pdf](https://www.oirsa.org/contenido/2017/EI_Salvador_INOCUIDAD/8_NS0_65_19_02_03_-_CALIDAD_DE_PROPOLEO_CRUDO.pdf)
- Correa, Y. X., Valenzuela, A. L., Ardila, Á. M., Rojas, M. A., & Mora, C. E. (2019). Colombian propolis as starting material for the preparation of nanostructured lipid carriers. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 29(3), 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.03.001>
- Costa, Alberto G., Yoshida, N. C., Garcez, W. S., Perdomo, R. T., Matos, M. de F. C., & Garcez, F. R. (2020). Metabolomics Approach Expands the Classification of Propolis Samples from Midwest Brazil. *Journal of Natural Products*. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00783>
- Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. (2000). *Instrução Normativa Nº 11, de 20 de Outubro de 2000*.
- DOF- Diario Oficial de la Federación. (2017). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SAG/GAN-2017, PROPÓLEOS, PRODUCCIÓN Y ESPECIFICACIONES PARA SU PROCESAMIENTO* (p. 8).
- Giorgi, M., Ye, G., Sgorbini, M., & Corazza, M. (2011). Validation of an HPLC-FL method for the determination of tepoxalin and its major metabolite in horse plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 49(1), 79–83. <https://doi.org/10.1093/chrscl/49.1.79>
- Jang, M., Sheu, S., Wang, C., Yeh, Y., & Sung, K. (2009). Optimization Analysis of the Experimental Parameters on the Extraction Process of Propolis. *Lecture Notes in Engineering and Computer Science*, 2175(1), 1295–1299.
- Kapare, H., Lohidasan, S., Sinnathambi, A., & Mahadik, K. (2019). Standardization, anti-carcinogenic potential and biosafety of Indian propolis. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 10(2), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.06.003>
- Liu, Q., Wu, H. L., Liu, Z., Xiao, R., Wang, T., Hu, Y., Ding, Y. J., & Yu, R. Q. (2018). Chemometrics-assisted HPLC-DAD as a rapid and interference-free strategy for simultaneous

- determination of 17 polyphenols in raw propolis. *Analytical Methods*, 10(46), 5577–5588. <https://doi.org/10.1039/c8ay01986j>
- Maraschin, M., Somensi-Zeggio, A., Oliveira, S. K., Kuhnen, S., Tomazzoli, M. M., Raguzzoni, J. C., Zeri, A. C. M., Carreira, R., Correia, S., Costa, C., & Rocha, M. (2016). Metabolic Profiling and Classification of Propolis Samples from Southern Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with Machine Learning. *Journal of Natural Products*, 79(1), 13–23. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00315>
- Martínez G, J., García P, C., Durango R, D., & Gil G, J. (2012). Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Revista MVZ Cordoba*, 17(1), 2861–2869. <https://doi.org/10.21897/rmvz.254>
- Martínez Galán, J. P. (2009). Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. *Universidad Nacional De Colombia Sede Medellín Facultad De Ciencias Agropecuarias*, 102.
- Palomino G, L. R., García P, C. M., Gil G, J. H., Rojano, B. A., & Durango R, D. L. (2009). Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3), 388–395.
- Pavlovic, R., Borgonovo, G., Leoni, V., Giupponi, L., Ceciliani, G., Sala, S., Bassoli, A., & Giorgi, A. (2020). Effectiveness of different analytical methods for the characterization of propolis: A case of study in northern Italy. *Molecules*, 25(3), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules25030504>
- Ribeiro, I., Cadorin, T., De Alencar, S., Rosalen, P. L., & Ikegaki, M. (2012). The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(3), 557–564. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502012000300023>
- Sánchez, F. (2018). *PERFIL QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS RECOLECTADOS EN LA REGIÓN DEL BAJO CAUCA ANTIOQUEÑO*. Universidad Nacional de Colombia.
- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>
- Sousa, B., De Oliveira, J., Barbosa, A. L., Druzian, J. I., & Pellegrini, F. (2020). Extraction of propolis using supercritical carbon dioxide. In *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817388-6.00009-x>
- Staedler, D., Idrizi, E., Kenzaoui, B. H., & Juillerat-Jeanneret, L. (2011). Drug combinations with quercetin: Doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(5), 1161–1172. <https://doi.org/10.1007/s00280-011-1596-x>
- Sumalatha, B. V., Devprakash, Senthil Kumar, G. P., & Mani, T. (2012). Isolation of flavonol of Tephrosia purpurea. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3(3), 105–110.
- Svečnjak, L., Marijanović, Z., Okińczyc, P., Marek Kuś, P., & Jerković, I. (2020). Mediterranean Propolis from the Adriatic Sea Islands as a Source of Natural Antioxidants: Comprehensive Chemical Biodiversity Determined by GC-MS, FTIR-ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MS, DPPH and FRAP Assay. *Antioxidants*, 9(4), 337. <https://doi.org/10.3390/antiox9040337>
- Teles, F., Da Silva, T. M., Da Cruz, F. P., Honorato, V. H., De Oliveira Costa, H., Barbosa, A. P. F., De Oliveira, S. G., Porfírio, Z., Libório, A. B., Borges, R. L., & Fanelli, C. (2015). Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. *PLoS ONE*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116535>
- Toledo, H. (2011). *Characterization of ethanolic extract from propolis produced by phyliopine stingless bees Trigona biroi Friese* (Issue May).
- Tolosa, L., Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *ARS Pharmaceutical*, 187–204.
- Yuan, M., Yuan, X.-J., Pineda, M., Liang, Z., He, J., Sun, S., Pan, T., & Li, K.-P. (2020). Comparative study between Chinese propolis and Brazilian green propolis: metabolite profile and bioactivity. *Food & Function*, 0–24. <https://doi.org/10.1039/c9fo02051a>

## - Conclusiones generales

- Se encuentra que la extracción de los compuestos fenólicos, a partir del propóleo crudo, se logra en mayor rendimiento con etanol al 70% y apoyo de la tecnología de ultrasonido/sonicación.
- Aunque la espectrofotometría es la técnica actualmente aceptada y empleada para la cuantificación de compuesto fenólicos en matrices de origen natural; los resultados tienden a ser bastante variados y las referencias de los estándares seleccionados no son los principales constituyentes de cada muestra.
- Relacionar y comparar resultados reportados entre investigadores, para las pruebas de caracterización de propóleos, se considera de poco aporte científico, por la falta de consensos en sus metodologías. Sin embargo las muestras de P-Zona4 y P-Zona3 fueron las únicas en presentar resultados para contenidos de compuestos fenólicos, flavonoides e índice de oxidación comparables con los publicados para propóleos de otros países.
- En Colombia no existe una propuesta de normatividad ajustada para clasificar la calidad de los propóleos nativos, basada en sus características intrínsecas.
- Las normatividades internacionales presentan falta de armonización, inconsistencias en las metodologías y, especificaciones para los criterios de calidad que impiden la certificación de propóleos colombianos antioqueños como materia prima.
- Se necesita ahondar en la caracterización de las moléculas presentes en los propóleos colombianos, elucidarlas y proponer perfiles químicos completos y reproducibles con tecnologías sofisticadas de separación e identificación como NMR y MS.
- No se puede comprobar una correlación entre la concentración de compuestos fenólicos y la actividad biológica de los propóleos evaluados.
- Es importante seguir generando proyectos que logren la interacción entre la academia y la industria, para generar un mejor aprovechamiento de los avances tecnológicos que se logren.
- Se debe seguir avanzando concomitantemente en el desarrollo y estandarización de metodologías sofisticadas con alta sensibilidad que brinden resultados confiables para la industria, como con el desarrollo y estandarización de metodologías sencillas que sirvan como un filtro de calidad empleable en las asociaciones de apicultores como evaluaciones previas de sus colectas de propóleos.

## - Referencias bibliográficas

1. Alamgir, A. N. . *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts*. vol. 1 (Springer, 2018).
2. Funari, C. S. *et al.* On Track for a Truly Green Propolis-Fingerprinting Propolis Samples from Seven Countries by Means of a Fully Green Approach. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **4**, 7110–7117 (2016).
3. Ghisalberti, E. L. Propolis: A Review. *Bee World* **60**, 59–84 (1979).
4. Jang, M., Sheu, S., Wang, C., Yeh, Y. & Sung, K. Optimization Analysis of the Experimental Parameters on the Extraction Process of Propolis. *Lect. Notes Eng. Comput. Sci.* **2175**, 1295–1299 (2009).

5. Maraschin, M. *et al.* Metabolic Profiling and Classification of Propolis Samples from Southern Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with Machine Learning. *J. Nat. Prod.* **79**, 13–23 (2016).
6. Pavlovic, R. *et al.* Effectiveness of different analytical methods for the characterization of propolis: A case of study in northern Italy. *Molecules* **25**, 1–25 (2020).
7. Chen, C. T., Chien, Y. H., Yu, Y. H. & Chen, Y. W. Extraction and analysis of taiwanese green propolis. *J. Vis. Exp.* **2019**, 1–5 (2019).
8. Rodríguez Rodríguez, L. E. *et al.* Optimización de la extracción alcohólica para la obtención de soluciones concentradas de propóleos. *Rev. Colomb. Ciencias Químico-Farmacéuticas* **44**, 47–57 (2015).
9. Delgado Aceves, M. D. L., Andrade Ortega, J. Á. & Ramírez Barragán, C. A. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Rev. Mex. Ciencias For.* **6**, 74–87 (2018).
10. Costa *et al.* Metabolomics Approach Expands the Classification of Propolis Samples from Midwest Brazil. *J. Nat. Prod.* (2020) doi:10.1021/acs.jnatprod.9b00783.
11. Sousa, B., De Oliveira, J., Barbosa, A. L., Druzian, J. I. & Pellegrini, F. *Extraction of propolis using supercritical carbon dioxide. Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science* (Elsevier Inc., 2020). doi:10.1016/b978-0-12-817388-6.00009-x.
12. Bankova, V. S., Popov, S. S. & Marekov, N. L. A study on flavonoids of propolis. *J. Nat. Prod.* **46**, 471–474 (1983).
13. Fachri, B. Rizkiana, M. Muharja, M. A Kinetic Study on Supercritical Carbon-dioxide Extraction of Indonesian Trigona sp . Propolis. (2020) doi:10.1088/1757-899X/742/1/012001.
14. Kapare, H., Lohidasan, S., Sinnathambi, A. & Mahadik, K. Standardization, anti-carcinogenic potential and biosafety of Indian propolis. *J. Ayurveda Integr. Med.* **10**, 81–87 (2019).
15. Oroian, M., Ursachi, F. & Dranca, F. Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. *Ultrason. Sonochem.* **64**, 105021 (2020).
16. Pellati, F., Prencipe, F. P., Bertelli, D. & Benvenuti, S. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **81–82**, 126–132 (2013).
17. Tolosa, L. Cañizares, E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *ARS Pharm.* 187–204 (2002).
18. Moncayo Luján, M. del R., Moreno Reséndez, A., Galván Barrón, G. S., Reyes Carrillo, J. L. & Carrillo Inungaray, M. L. Antibacterial activity and phenolic content of propolis extracts obtained by different extraction methods. *Nov. Sci.* **10**, 397–412 (2018).
19. Antonia, S. Á., Graciela, C. M. & Yanet, Á. M. Parámetros físicos y características organolépticas de propóleos provenientes de la Provincia de Misiones , Argentina Physical

parameters and organoleptic characteristics of propolis from the province of Misiones ,  
Introducción. *J. Selva Andin. Biosph* 51–58 (2017).

20. Sosa-López, Á. A., Cabrera, M. G. & Álvarez, M. Y. Vegetación de origen como parámetro de caracterización microbiana de los propóleos Origin vegetation as a parameter for characterization antimicrobial of propolis. *Selva Andin. Biosph.* (2016).
21. Yuan, M. *et al.* Comparative study between Chinese propolis and Brazilian green propolis: metabolite profile and bioactivity. *Food Funct.* 0–24 (2020) doi:10.1039/c9fo02051a.
22. Alencar, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 278–283 (2007).
23. Ribeiro, I., Cadorin, T., De Alencar, S., Rosalen, P. L. & Ikegaki, M. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian J. Pharm. Sci.* **48**, 557–564 (2012).
24. ALEKSANDROVA, L. Rosin and beeswax composition. (1972).
25. Al-Ghamdi, A. A. *et al.* Chemical compositions and characteristics of organic compounds in propolis from Yemen. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**, 1094–1103 (2017).
26. Almutairi, S. *et al.* Isolation of diterpenes and flavonoids from a new type of propolis from Saudi Arabia. *Phytochem. Lett.* **10**, 160–163 (2014).
27. Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G. & Lightfoot, D. A. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* **6**, (2017).
28. Bankova, V., De Castro, S. & Marcucci, M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Eur. J. Polit. Res.* **22**, 329–345 (2000).
29. Bankova, V. *et al.* Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *J. Apic. Res.* **58**, 1–49 (2019).
30. Mobus, B. The importance of propolis to the honey bee. *Brit. Bee J* **19**, (1972).
31. BAIER, K. Die Wasserdampfsperre in der Beute. *Bienenpflege, Weinsb.* (1969).
32. Barre, R. Identification of the colouring matter of beeswax. *Rev. Can. Biol* **1**, (1942).
33. Rösch, G. A. Observations on propolis – collecting bees. *Biol. Zent. Bl.* **47**, (1927).
34. VANSELL, G. H. & BISSON, C. S. The characteristics, contaminants, processing and uses of beeswax. *US Bur. Entomol.* (1940).
35. Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* **36**, 347–363 (1998).
36. Margeretha, I., Suniarti, D. F., Herda, E. & Alim, Z. Optimization and comparative study of different extraction methods of biologically active components of Indonesian propolis *Trigona* spp. *J. Nat. Prod.* **5**, 233–242 (2012).
37. Marina, D., Avella, G., Alberto, C., García, O. & Cisneros, A. M. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simp. Metrol.* 1–5

(2008).

38. Martín Gordo, D. A. Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Rev. Investig. Agrar. y Ambient.* **9**, 81–104 (2018).
39. Creus, E. V. A. G. Compuestos fenólicos Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm* **23**, 80–84 (2004).
40. Sforcin, J. M. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 1–14 (2007).
41. Ghasemzadeh, A. & Ghasemzadeh, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plant Res.* **5**, 6697–6703 (2011).
42. Wagh, V. D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* **11** (2013) doi:10.1155/2013/308249.
43. Vit, P. *et al.* Use of Propolis in Cancer Research. *Br. J. Med. Med. Res.* **8**, 88–109 (2015).
44. Chan, G. C. F., Cheung, K. W. & Sze, D. M. Y. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **44**, 262–273 (2013).
45. Svečnjak, L., Marijanović, Z., Okińczyc, P., Marek Kuś, P. & Jerković, I. Mediterranean Propolis from the Adriatic Sea Islands as a Source of Natural Antioxidants: Comprehensive Chemical Biodiversity Determined by GC-MS, FTIR-ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MS, DPPH and FRAP Assay. *Antioxidants* **9**, 337 (2020).
46. Tolba, M. F., Azab, S. S., Khalifa, A. E., Abdel-Rahman, S. Z. & Abdel-Naim, A. B. Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life* **65**, 699–709 (2013).
47. Yokoyama, T., Kosaka, Y. & Mizuguchi, M. Inhibitory activities of propolis and its promising component, caffeic acid phenethyl ester, against amyloidogenesis of human transthyretin. *J. Med. Chem.* **57**, 8928–8935 (2014).
48. Aparecida, B., Machado, S., Pina, R., Silva, D. & De, G. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. 1–26 (2016) doi:10.1371/journal.pone.0145954.
49. Soltani, E.-K., Mokhnache, K. & Charef, N. Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Ethanolic and Aqueous Algerian Propolis Extracts (Region of Serdj el ghoul). *J. Drug Deliv. Ther.* **10**, 1–4 (2020).
50. Kumazawa, S., Hamasaka, T. & Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* **84**, 329–339 (2004).
51. Avci, Ç. B. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137**, 41–47 (2011).
52. Lin, W. L., Liang, W. H., Lee, Y. J., Chuang, S. K. & Tseng, T. H. Antitumor progression potential of caffeic acid phenethyl ester involving p75NTR in C6 glioma cells. *Chem. Biol.*



*Interact.* **188**, 607–615 (2010).

53. Chen, M. J. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology* **8**, 566–576 (2008).
54. Xuan, H. *et al.* Effect of Brazilian propolis on human umbilical vein endothelial cell apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 78–85 (2011).
55. Biológicas, L. C. & Departamento, D. “Actividad antitumoral del propóleo”.
56. Staedler, D., Idrizi, E., Kenzaoui, B. H. & Juillerat-Jeanneret, L. Drug combinations with quercetin: Doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **68**, 1161–1172 (2011).
57. Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M. & Garcia-Parrilla, M. C. Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **48**, 649–671 (2008).
58. Kimoto, T. *et al.* Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. *Virchows Arch.* **438**, 259–270 (2001).
59. Helmbach, H., Rossmann, E., Kern, M. A. & Schadendorf, D. Drug-resistance in human melanoma. *Int. J. Cancer* **93**, 617–622 (2001).
60. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.* (Taylor & Francis, 2006).
61. Choudhari, M. K., Haghniaz, R., Rajwade, J. M. & Paknikar, K. M. Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: An in vitro study. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, (2013).
62. Li, H. *et al.* Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int. J. Oncol.* **31**, 601–606 (2007).
63. Coskun, O. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *North. Clin. Istanbul* **3**, 156–160 (2016).
64. Ozdal, T., Sari-Kaplan, G., Mutlu-Altundag, E., Boyacioglu, D. & Capanoglu, E. Evaluation of Turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity, anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line. *J. Apic. Res.* **57**, 627–638 (2018).
65. Fangio, M. F., Orallo, D. E., Gende, L. B. & Churio, M. S. Chemical characterization and antimicrobial activity against *Paenibacillus* larvae of propolis from Buenos Aires province, Argentina. *J. Apic. Res.* **58**, 626–638 (2019).
66. Biscaia, D. & Ferreira, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *J. Supercrit. Fluids* **51**, 17–23 (2009).
67. Pelantová, H., Bártová, S. & Kuzma, M. Natural Products Analysis. in *Natural Products Analysis* (eds. Havlíček, V. & Spížek, J.) 239 (John Wiley & Sons, 2014). doi:10.1002/9781118876015.

68. Sánchez Alarcón, O. a. Sistemas de Producción y Economía Apícola en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Caso de Tres Organizaciones de Productores. *Univ. Nac. Colomb. Sede Bogotá*. 144 (2014).
69. Silva Garnica, D., Arcos Dorado, A. L. & Gómez Díaz, J. A. *Guía ambiental apícola*. (2006).
70. Avellaneda, R. Viabilidad económica del mejoramiento del proceso de extracción de miel de abejas en una compañía artesanal. (Fundación Universidad de América, 2017).
71. Grosso, G. S., Carvajal, I. L. C. & Principal, J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootec. Trop.* **25**, (2007).
72. Talero, C., Hernandez, D. & Figueroa, J. Calidad microbiologica de propóleo crudo y sólidos solubles de extractos de propóleos de *Apis mellifera* en Colombia. *Rev. la Fac. Med. Vet. y Zootec.* **59**, 109–118 (2012).
73. Martínez G, J., Garcia P, C., Durango R, D. & Gil G, J. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Rev. MVZ Cordoba* **17**, 2861–2869 (2012).
74. Palomino G, L. R., García P, C. M., Gil G, J. H., Rojano, B. A. & Durango R, D. L. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia). *Vitae* **16**, 388–395 (2009).
75. Martínez Galán, J. P. Caracterización fisico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. *Univ. Nac. Colomb. Sede Medellín Fac. Ciencias Agropecu.* 102 (2009).
76. Pedraza Bedoya, D. M. & Del Portillo Gargía, N. Estrategias de competitividad para fortalecer el sector apícola en Colombia. (Universitaria Agustiniiana, 2019).
77. López-Patiño, C. Globalización y producción de propoleos. *Biotechnol. en el Sect. Agropecu.* **9**, 119–125 (2011).
78. Pujirahayu, N., Suzuki, T. & Katayama, T. Cycloartane-type triterpenes and botanical origin of propolis of stingless Indonesian bee *tetragonula sapiens*. *Plants* **8**, (2019).
79. Silva, C. C. F. da, Salatino, A., Motta, L. B. da, Negri, G. & Salatino, M. L. F. Chemical characterization, antioxidant and anti-HIV activities of a Brazilian propolis from Ceará state. *Brazilian J. Pharmacogn.* **29**, 309–318 (2019).
80. Seyhan, M. F. *et al.* Different propolis samples, phenolic content, and breast cancer cell lines: Variable cytotoxicity ranging from ineffective to potent. *IUBMB Life* **71**, 619–631 (2019).
81. Kasiotis, K. M., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A. & Machera, K. Revisiting Greek propolis: Chromatographic analysis and antioxidant activity study. *PLoS One* **12**, 1–27 (2017).
82. Zaccaria, V. *et al.* Multi dynamic extraction: An innovative method to obtain a standardized chemically and biologically reproducible polyphenol extract from poplar-type propolis to be used for its anti-infective properties. *Materials (Basel)*. **12**, (2019).
83. Ávalos, A. y Pérez, E. Metabolismo secundario de plantas. REDUCA (Biología). *REDUCA (Biología)* **2**, 119–145 (2009).

84. Picco, M. E. & Bergami, P. L. Melanoma: Diagnóstico, evolución y tratamiento bajo una perspectiva molecular. *Cienc. Invest.* **60**, 35–50 (2010).
85. Castaño Amores, C. & Hernández Benavides, P. J. Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos antienvjecimiento. *Ars Pharm.* **59**, 77–84 (2018).