

Evaluación de características fisicoquímicas y actividad antioxidante de propóleos recolectados en cuatro zonas de la región Antioquia, Colombia.

Maria José Ortiz Quiceno, Laura Estefania Millan Trujillo, Laura Jurado Cardona, Daniel Felipe Arango Rodriguez, Zaribey Ariana Bueno Ramirez, Erick Alejandro Meneses Ramirez.

Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Cl 10A #22 - 04, Medellín, Antioquia

Correos electrónicos

ortizq.maria@uces.edu.co

millan.laura@uces.edu.co

jurado.laura@uces.edu.co

arangoro.daniel@uces.edu.co

emeneses@ces.edu.co

bueno.zaribey@uces.edu.co

RESUMEN

Introducción: El propóleo es un producto de origen animal elaborado por las abejas a partir de las exudaciones de la flora cercana. Su composición es altamente variable, por lo cual sus propiedades físico-químicas, y por consecuencia su actividad biológica primaria, también lo son. A lo largo de la historia ha sido utilizado como ingrediente cosmético, aditivo

alimentario e incluso en formulaciones medicamentosas. Actualmente se ha demostrado su importancia farmacológica, que se asocia en parte a las propiedades antioxidantes dadas por la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides. **Objetivo:** Evaluar propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante de propóleos de 4 subregiones de Antioquia (El Bagre, Salgar, San Rafael, Turbo). **Metodología:** Se realizaron evaluaciones organolépticas a los propóleos y posteriormente se prepararon los extractos etanólicos. Se realizaron pruebas colorimétricas para la determinación de flavonoides y fenoles totales; se determinó la actividad antioxidante mediante el método del radical DPPH y se evaluó mediante espectrofotometría UV. Para la identificación de los compuestos principales de cada propóleo se realizó HPLC utilizando estándares externos **Resultados:** Se obtuvieron resultados positivos en las pruebas cualitativas de fenoles y flavonoides, denotando su presencia en todas las muestras exceptuando la muestra de El Bagre. Las muestras de San Rafael, Salgar y Turbo, presentaron actividad antioxidante, dando como resultado valores positivos en el porcentaje de inhibición por DPPH+, la muestra de El Bagre dió un resultado negativo, lo cual significa que no presentó actividad antioxidante. A partir de HPLC se identificaron los siguientes compuestos fenólicos: Kaempferol, Isorhamnetina , Quercetina, y Ácido Gálico.

Palabras clave:

HPLC, fenoles, flavonoides, espectrofotometría UV, radical DPPH, pruebas colorimétricas.

SUMMARY

Introduction: Propolis is a natural product elaborated by bees from exudations produced by nearby flora, its chemical composition is highly variable and because of this, its biological properties are too. Throughout history it has been used as a cosmetic ingredient, food additive and even in medicinal formulations. Nowadays its pharmacological importance has been proven, closely linked to the presence of phenolic compounds and flavonoids, compounds with antioxidant properties. In Colombia, this product has been underused due to poor knowledge of its physicochemical quality. **Objective:** Evaluation of propolis from four subregions in Antioquia (El Bagre, Salgar, San Rafael, Turbo) conducting physicochemical and antioxidant activity tests. **Methodology:** Initially, organoleptic evaluations were conducted on the propolis. Subsequently, ethanolic extracts were prepared. Qualitative tests were conducted for the determination of flavonoids and total phenols; antioxidant activity was determined utilizing a DPPH radical methodology and was evaluated with UV spectrophotometry. For the identification of the main compounds present in each propolis sample, HPLC and external standards were used. **Results:** The qualitative tests for flavonoids and total phenols all yielded positive results, denoting these compounds' presence, except for the sample from El Bagre. Samples from San Rafael, Salgar and Turbo, displayed antioxidant activity, yielding positive values in DPPH+ percentage inhibition. The sample from El Bagre presented a negative value, meaning it has no antioxidant activity. Using HPLC analysis, the following phenolic compounds were identified: Kaempferol, Isorhamnetin, Quercetin and Gallic Acid.

Key words: HPLC, phenols, flavonoids, UV spectrophotometry, DPPH radical, colorimetric tests

INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto de origen animal procesado por las abejas a partir de exudaciones de la flora cercana mezcladas con las ceras del animal. Presenta una composición conocida de resinas, ceras, sustancias volátiles, polen, sustancias orgánicas y minerales.(1)

Dentro de la fracción resinosa, se ha comprobado la presencia de metabolitos con potencial biológico asociado principalmente a los compuestos fenólicos y flavonoides. (2,3,4). Los compuestos fenólicos engloban todas las sustancias que poseen fenoles, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas(5). Los flavonoides, un ejemplo de fenoles, están conformados por dos anillos bencénicos en los extremos de la molécula, unidos por un anillo de tres átomos de carbono a la que se le pueden unir grupos hidroxilos, metilos, azúcares, entre otros(3). Variaciones entre zonas geográficas ocasionan numerosos cambios en la composición y las propiedades fisicoquímicas y biológicas del propóleo.(1)

Este producto animal ha sido utilizado a lo largo de la historia como medicamento antibacteriano, fitoterapéutico y para el tratamiento de heridas(6). Hoy en día se han realizado diversos estudios que demuestran su gran importancia farmacológica, entre ellos su actividad antioxidante. Los procesos y reacciones normales del cuerpo humano liberan moléculas inestables con electrones no apareados llamados radicales libres. Estas moléculas son muy reactivas y pueden llegar a interactuar indebidamente con otras reacciones metabólicas y causar daños a estructuras celulares. Entre las moléculas inestables más comunes están los EROs, (especies reactivas de oxígeno) que son moléculas con oxígeno que tiene un electrón no apareado. Si hay un desbalance entre los antioxidantes endógenos y moléculas con radicales libres, existe un estrés oxidativo (7). Existen diversas enfermedades de origen oxidativo (8) tales como: aterosclerosis(9) , cáncer (10), diabetes mellitus (11), hipertensión

arterial y daño renal (12) envejecimiento celular, catarata senil, cirrosis (13) entre otras. La actividad antioxidante del propóleo podría reducir el desbalance bioquímico traducido en estrés oxidativo mejorando la calidad de vida y el proceso de envejecimiento (14,15). La capacidad antioxidante del propóleo se ha atribuido a su alto contenido de polifenoles, particularmente de flavonoides. En el caso de los propóleos, los compuestos fenólicos son considerados buenos antioxidantes por sus estructuras portadoras de numerosos electrones de enlace pi e hidroxilos, que facilitan la donación de electrones a estas especies con radicales libres (16). La acción de los antioxidantes es retrasar o inhibir el proceso de oxidación de las demás moléculas, ya que estos no permiten la iniciación de las reacciones oxidativas en cadena (17).

Existen normas para evaluar la calidad del propóleo en otros países (Brasil, México, Argentina) (1), pero en Colombia ha sido poco investigado, y por ende en su mayoría descartado por los apicultores nacionales, cómo es el caso de las cuatro subregiones involucradas en la recolección del propóleo para este proyecto. Su estudio en nuestro país podría incrementar el interés científico, y generar un mayor aprovechamiento y comercialización, así como ocurre en Brasil y Argentina, en donde el propóleo ya se encuentra inmerso en la industria alimenticia y cosmética, gracias a la implementación de diversos parámetros de calidad y normatización para su uso (1). Sin embargo, conocer las propiedades biológicas del propóleo colombiano, su composición y actividad biológica requiere de equipos y reactivos que no son de fácil acceso fuera del ámbito de la investigación.

Este estudio, que hace parte de un proyecto macro de Colciencias, pretende aportar avances en la caracterización fisicoquímica del propóleo de diferentes subregiones de Antioquia y

evaluar su actividad antioxidante con el propósito de proporcionar información que ayude a aumentar el valor agregado de este producto en Colombia. Finalmente, se espera que esta investigación tenga un impacto tanto científico y social, como económico e industrial, ya que a partir de este trabajo se implementaría un conocimiento básico para el desarrollo de productos farmacéuticos, cosméticos o alimenticios a base de propóleo colombiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de muestras de propóleo

Se utilizaron muestras de propóleo recolectadas en los siguientes apiarios de cuatro subregiones de Antioquia, Colombia: Campo Dulce Sas (El Bagre), ASOAPISA-Asociación de apicultores de Salgar (Salgar), Asociación de Apicultores de San Rafael (San Rafael), Asociación de Apicultores de Urabá Miel del Bosque Tropical (Turbo).

Se tomaron las cuatro muestras de propóleo crudo y se analizaron las propiedades organolépticas según los parámetros de la Norma Oficial Mexicana de propóleos (18) en el apartado de Métodos de Prueba, para las especificaciones físicas, que incluyen color, aroma, consistencia y aspecto.(18)

Preparación del Extracto Etanólico de Propóleos

Para la obtención del extracto etanólico del propóleo (EEP) se pesaron 20 g de las regiones de El Bagre y Salgar, y 25 g de las regiones de San Rafael y Turbo, la diferencia de peso radicó en la disponibilidad y manejo de las muestras. Posteriormente se añadió EtOH al 70% en una proporción de 1:3 para asegurar la misma concentración. Se sometieron las muestras a baño

ultrasónico por 20 min a temperatura ambiente para su extracción y se filtró cada una. Después de esto se concentró el extracto utilizando un rotaevaporador y se conservó cada uno en refrigeración protegidos de la luz para evitar degradación de compuestos, hasta realizar los otros análisis. Todo este proceso de preparación del extracto etanólico del propóleo se realizó bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana de propóleo (18).

Prueba cualitativa de fenoles totales.

Para la determinación de los fenoles totales en cada muestra de EEP se empleó la metodología propuesta en la Norma Oficial Mexicana (18), utilizando como reactivo el Cloruro Férrico. El peso de las muestras se trató de hacer según lo indicado en la metodología que eran 200 mg por región. Sin embargo, debido a la cantidad obtenida de EEP , estos pesos tuvieron una variación de una región a otra.

Para la preparación del reactivo Cloruro Férrico, se utilizó Cloruro férrico Anhidro al 1%. Esto es una modificación al procedimiento de la Norma Oficial Mexicana de propóleos (18), ya que inicialmente en la metodología se utiliza Cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Se aseguró la equivalencia entre estos dos reactivos para obtener la misma concentración de Cloruro Férrico. Se pesaron 0,1g de Cloruro Férrico Anhidro y se disolvieron en 1 ml de agua destilada, posteriormente se aforó a 10 ml.

Para el procedimiento, cada muestra de EEP se llevó a un tubo de ensayo, allí se agregó EtOH al 70%, según el peso registrado de cada muestra para así tener una concentración aproximadamente de 200 mg/ ml, de la siguiente manera:

Tabla 1. Datos para la preparación de las muestras prueba cualitativa de fenoles totales

Muestra	Peso (mg)	EtOH (ml)	Concentración final (mg/ml)
El Bagre	43,2	0,2	216
San Rafael	202,1	1	202,1
Turbo	139,5	0,7	199,3
Salgar	202,3	1	202,3

Para la determinación colorimétrica se agregó 1 ml del reactivo Cloruro Férrico al 1% a cada muestra de EEP previamente preparada con el EtOH contenida en tubos de ensayo y se observó la reacción de cambio del color, luego se realizó de forma inversa, es decir, a 1 ml del reactivo de Cloruro Férrico al 1% se agregó 1 ml de cada muestra de EEP y se observó la reacción de cambio de color.

Prueba cualitativa de flavonoides

Para la determinación de los fenoles totales en cada muestra de EEP se empleó la metodología propuesta en la Norma Oficial Mexicana de propóleos (18), utilizando como reactivo NaOH al 20%. La solución de NaOH 20% fue preparada al disolver 2 g de NaOH en 10 ml de agua destilada en un balón de 10 ml y se aforó a volumen. Se pesaron muestras de alrededor de 200 mg de las regiones de San Rafael, Turbo y el Salgar. Dada la disponibilidad de muestra

proveniente del Bagre, se pesaron 43 mg de muestra y se tomó en cuenta para los resultados. Para la determinación colorimétrica se agregó 1 ml de extracto de propóleo en EtOH 70% a 1 ml de NaOH al 20% en tubos de ensayo para cada muestra, luego se realizó de forma inversa, es decir, se agregó 1 ml de NaOH en 1 ml de extracto de propóleo en cada muestra. Se observó la reacción del cambio de color en las muestras.

Evaluación de la actividad antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante se empleó el método del radical DPPH, siguiendo los lineamientos de la Norma Mexicana de propóleos (18). Se prepararon diluciones en MeOH reactivo de cada muestra hasta obtener una concentración de 1 mg/ml, se mezclaron 250 µl de cada muestra con 750 µl de una solución de DPPH 100 µM, se protegieron de la luz y se dejaron reposar por 30 minutos. Posteriormente, se llevaron las muestras a un espectrofotómetro de absorción UV-VIS para medir la absorbancia a 515 nm. Como control negativo se utilizó MeOH y como control positivo se utilizó quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema. Los resultados fueron convertidos a porcentaje de inhibición relativo el cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{A-A1}{A} * 100$$

A= absorbancia DPPH

A1= absorbancia muestra

Identificación de compuestos mediante la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Para la identificación de los compuestos principales de cada muestra de propóleo se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución HPLC bajo la metodología previamente validada para la cuantificación de flavonoides en fitoterapéuticos, empleando estándares primarios externos como: Quercetina, Kaempferol, Isorhamnetina, Ácido gálico, CAPE (éster del ácido caféico) para determinar la presencia de flavonoides presentes en los EEP. La fase móvil fue una mezcla de MeOH:Agua: Ácido fosfórico (100:100:1) y la solución diluyente fue MeOH:ME. Las condiciones de análisis fueron: flujo de la fase móvil 1,5 ml/ min, longitud de onda a 278 nm , la separación se realizó mediante una elución isocrática, el tiempo de análisis fue de min 80 minutos. Se utilizó un cromatógrafo líquido UHPLC Shimadzu Nexera-DAD, acoplado a un detector de matriz de fotodiodos (PDA) Multi, en fase reversa con una columna LiChrospher 5um RP-18 100 Å, LC Column 250 x 4,6 mm. con un volumen de inyección de 20 µl.

Los tiempos de retención (TR) de los estándares fueron TR= 1,996 min para Ácido gálico, TR= 14,167 min para Quercetina, TR=20,767 para Kaempferol, TR= 26,597 para Isorhamnetina y TR=63,330 para CAPE

<Chromatogram>

mAU

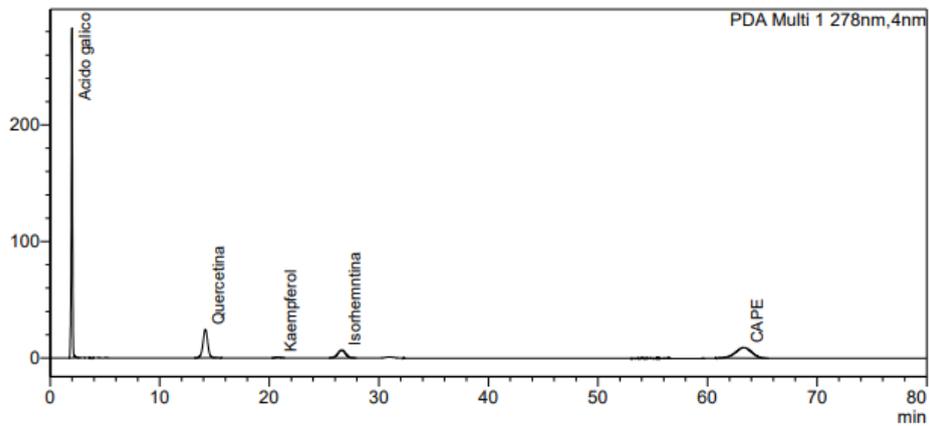


Figura 1. Cromatograma de estándares externos a una longitud de onda de 278 nm.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Tabla 2. Resultados de las pruebas organolépticas, de actividad antioxidante, determinaciones de fenoles y flavonoides, HPLC.

Prueba	El Bagre	Salgar	San Rafael	Turbo
Organoléptica	Color: Café neutro claro Aroma: Resinoso aromático Consistencia: Rígido	Color: Café amarillento Aroma: Resinoso aromático Consistencia: Maleable	Color: Café rojizo oscuro Aroma: Resinoso muy aromático Consistencia: Rígido	Color: Café amarillento claro Aroma: Resinoso muy aromático. Consistencia: Rígido

	Aspecto: Trozos irregulares opacos -Levemente pegajoso	Aspecto: Trozos irregulares opacos -Pegajoso	Aspecto: Trozos irregulares opacos	Aspecto: Trozos irregulares opacos -Muy fino
Actividad Antioxidante (porcentaje de inhibición)	-10,79%	77,27%	30,37%	44,76%
Determinación de flavonoides	Ausencia	Presencia	Presencia*	Presencia
Determinación de fenoles	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
HPLC	Estándar y tiempo de retención: -Kaempferol (21.338)	Estándar y tiempo de retención: -Kaempferol (21.461)	Estándar y tiempo de retención: -Ácido Gálico (2,005) -Kaempferol (21.997)	Estándar y tiempo de retención: -Quercetina (14,023) -Kaempferol (19,950)

				-Isorhamnetina (27,623)
--	--	--	--	----------------------------

El porcentaje de inhibición del radical DPPH+ osciló entre un mínimo de -10,79% para el extracto de la región de El Bagre y un máximo de 77,27% para la región de Salgar. Los valores de San Rafael (30,37%) y Turbo (44,76%) tuvieron diferencias significativas entre sus valores. Las variaciones entre las diferentes regiones pueden deberse a que los radicales pueden reaccionar de forma distinta dependiendo de la naturaleza química y física del antioxidante, que en este caso es el propóleo. La actividad antioxidante del propóleo se le ha atribuido al alto contenido de polifenoles como los flavonoides presentes en este. En el caso de los propóleos, se ha reportado ampliamente la presencia de los compuestos fenólicos, y éstos son considerados buenos antioxidantes por sus estructuras, conteniendo muchos electrones de enlace pi e hidroxilos, facilitando la donación de electrones a especies con radicales libres (16)

Debido a los valores del porcentaje de inhibición que presentó la muestra del EEP de El Bagre, se puede asumir que hubo muy baja capacidad antioxidante respecto a las demás regiones. Este bajo rendimiento antioxidante puede ser atribuido a la baja presencia de sustancias con dicha característica en la muestra proveniente de El Bagre. Adicionalmente, durante la prueba se pudo observar que la muestra de El Bagre no presentó cambio en su tonalidad y se conservó violeta, color característico del radical DPPH sin reaccionar, lo que confirma que no hubo actividad antioxidante. La muestra de esta región también presentó una absorbancia incluso más alta que la del mismo radical DPPH, lo que se puede explicar por interferencia de compuestos presentes en la muestra con un pico de absorbancia similar al del

radical, aumentando un poco este valor. Este fenómeno se puede interpretar cómo % cero de inhibición.

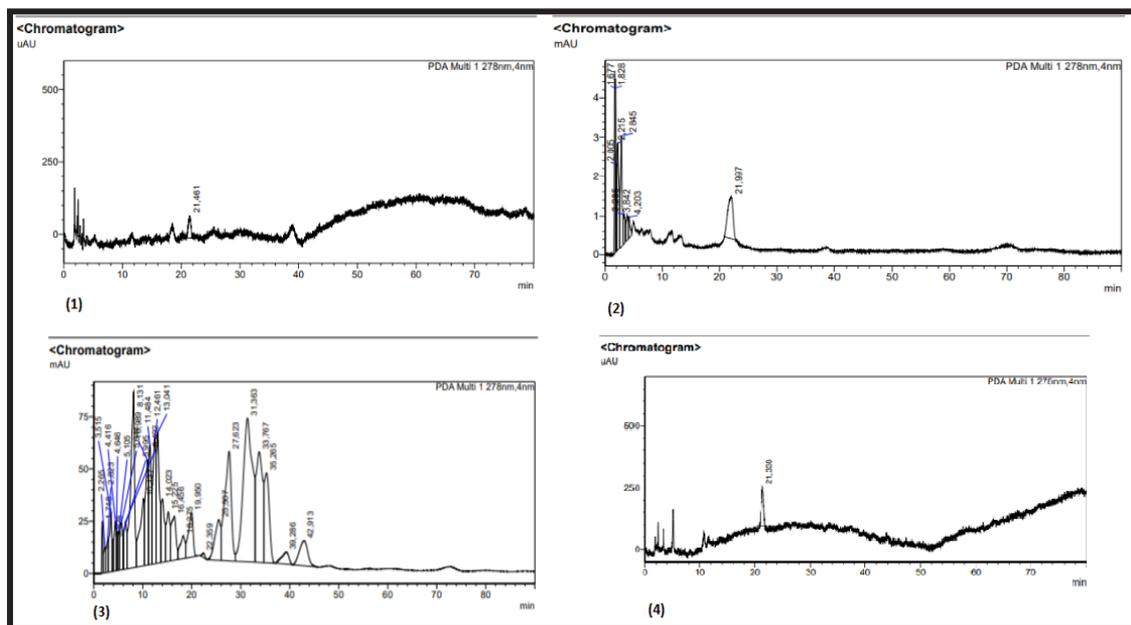
Al realizar la prueba colorimétrica de determinación de flavonoides se obtuvieron varias tonalidades de amarillo en las diferentes regiones. Muestras provenientes de Salgar y Turbo, presentaron una coloración amarilla tenue y amarilla oscura respectivamente, de acuerdo con la especificación en la norma mexicana. Estos resultados son indicativos de la presencia de flavonoides. En la muestra de El Bagre no se observó cambio en coloración, indicativo de una muy baja presencia de flavonoides. En la muestra de San Rafael se evidencio una coloración azul tenue, la cual no está dentro de la especificación en la norma mexicana. Una posible razón de este resultado podría ser la presencia de antocianinas, moléculas pertenecientes a la familia de los flavonoides que al ser expuestos a un ambiente básico, sufren reacciones de hidroxilación lo cual genera un desplazamiento a tonalidades azules (19).

Al realizar la prueba colorimétrica de fenoles totales, se obtuvieron resultados positivos, en donde todas las muestras mostraron un cambio de color y formación de precipitados para las regiones de: San Rafael, Salgar y El Bagre; la región de Turbo cambió de color a marrón claro sin formación de precipitado. Estos resultados son indicativos de la presencia de fenoles, ya que estos compuestos al estar presentes forman un complejo con Fe(III) del reactivo, que es intensamente coloreado dando cómo resultado un precipitado y una coloración azul, verde, rojo, violeta o negro, mientras que si el color es amarillo débil (mismo que el reactivo), la reacción se considera negativa.

El análisis de HPLC, realizado a una longitud de onda de 278 nm confirmó la presencia de flavonoides en las muestras. Se decidió trabajar con esta longitud de onda debido a que se ha

demostrado que los flavonoides presentan absorciones características en la región UV/VIS del espectro electromagnético por su estructura, mostrando bandas de intensidad especialmente en la zona de 240-350 nm. (2, 20)

En la muestras de Salgar y El Bagre se evidenciaron pocos picos, solamente se logró identificar el compuesto kaempferol, con tiempos de retención 21.461 y 21.338 min respectivamente. En el cromatograma de San Rafael, también se pudo evidenciar la presencia de Kaempferol (21,997 min) y adicional a este, el compuesto Ácido gálico (2,005 min). En el cromatograma de Turbo, se evidencian 17 picos. De estos, se pueden identificar la presencia de tres picos correspondientes a los compuestos de Quercetina (14,023 min), Kaempferol (19,950 min), e Isorhamnetina (27,623 min).



El Kaempferol es un flavonol en la categoría de flavonoides, que tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, cardiovasculares y neuroprotectoras. Puede ser utilizado en el tratamiento de cánceres regulados por hormonas, por su similitud estructural al estrógeno (21,22). La isorhemnetina es un monometoxiflavonol que tiene propiedades y efectos de protección cardiovascular y cerebrovascular, además tiene efectos farmacológicos sobre una variedad de tumores, y posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (23). La Quercetina es un flavonoide polifenólico, el cual posee propiedades antidiabéticas, anticancerígenas, antiulcerosas, antivirales, antiplaquetarias, y antioxidantes (24,25). El ácido gálico es un ácido fenólico al que se le ha atribuido diferentes actividades biológicas como la antiinflamatoria, antioxidante y antibiótica, además de la protección cardiovascular y anticancerígena (26). A los compuestos encontrados se les atribuye una gran variedad de propiedades biológicas, siendo la actividad antioxidante la más común entre todos, la cual es la principal estudiada en este artículo, y se fundamenta en la capacidad que tiene un compuesto para eliminar especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), evitando las reacciones en cadena que llevarían al estrés oxidativo, el cual también contribuye a la inflamación (25).

En los cromatogramas se pueden observar más picos que no fueron identificados por el equipo y la técnica, debido que para esto, se debían utilizar otros estándares externos como referencia, sin embargo, teniendo en cuenta la literatura se podría decir que probablemente corresponden a compuestos fenólicos, los cuáles presentan picos característicos alrededor de esta longitud de onda (278 nm). (2,20)

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad CES, al Centro de la Ciencia y la Investigación Farmacéutica (CECIF) y a Colciencias por el apoyo y uso de instalaciones para la realización de este proyecto.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. Gil J, Vilorio J, Durango D, García C. Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del bajo cauca antioqueño (Antioquia, Colombia). *Biotecnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial BSAA*. 2012;10(1):77–86.
2. Palomino G LR, García P CM, Gil G JH, Rojano BA, Durango R DL. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia). *Vitae* [Internet]. 2009;16(3):388–95. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042009000300013&script=sci_abstr&act&tlng=es
3. Soto M. Metabolitos secundarios , cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del. In *crescendo* [Internet]. 2015;6(2):22–32. Available from: https://www.researchgate.net/publication/290418655_Metabolitos_secundarios_cuantificacion_de_fenoles_y_flavonoides_totales_de_extractos_etanolicos_de_propoleos_de_tres_localidades_del_Peru
4. Catalán FS. Perfil químico y evaluación de la actividad antioxidante de própoeleos recolectados en la región del Bajo Cauca antioqueño. 2018;
5. Creus EVAG. *Compuestos fenólicos*. 2004;23:80–4.
6. Noriega Salmón V. El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. *Curso Adapt al grado* [Internet]. 2014;1–28. Available from: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/5580/NoriegaSalmonV.pdf>
7. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Vol. 39, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Pergamon; 2007. p. 44–84.
8. Preventiva M, Legal M, Andr V. El própolis y la salud. 2004;21–43. Available from: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5105>
9. Fang Y, Sang H, Yuan N, Sun H, Yao S, Wang J, et al. Ethanolic extract of propolis inhibits atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2013;12(1):1. Available from: *Lipids in Health and Disease*

10. Hernandez J, Goycoolea FM, Quintero J, Acosta A, Castañeda M, Dominguez Z, et al. Sonoran propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med.* 2007;73(14):1469–74.
11. Rivera-Yañez CR, Terrazas LI, Jimenez-Estrada M, Campos JE, Flores-Ortiz CM, Hernandez LB, et al. Anti-Candida Activity of *Bursera morelensis* Ramirez Essential Oil and Two Compounds, α -Pinene and γ -Terpinene-An In Vitro Study. *Molecules.* 2017;22(12).
12. Teles F, Da Silva TM, Da Cruz FP, Honorato VH, De Oliveira Costa H, Barbosa APF, et al. Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. *PLoS One.* 2015;10(1):1–15.
13. Elejalde Guerra JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna.* 2001;18(6):326–35.
14. Paredes Salido F, Roca Fernández J. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm Farm y Soc.* 2002;21(7):96–100.
15. Adonis L, Zorrilla García E. EL ENVEJECIMIENTO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO. *Rev Cubana Invest Biomed* 2002;21(3):178-85
16. Bittencourt MLF, Ribeiro PR, Franco RLP, Hilhorst HWM, de Castro RD, Fernandez LG. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Res Int* [Internet]. 2015;76:449–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.008>
17. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J Agric Food Chem.* 1998;46(10):4113–7.
18. Gan- NOMN--sag. Dof: 06/10/2017. 2020;1–8.
19. Garz GA. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biol Colomb.* 2008;13(3):27–36.
20. Guerra, Mercedes, Bermello, Addiss, Crespo, Déborah, Michelena, Georgina L., Mieres, Gretel, Matos, Silvia, Legrá, Silvano, Ortega, Grisel M., Castillo, Grolamys, Carreras, Emilia, Armenteros, Silvia, Estudios de separación y caracterización de pigmento en caldos de fermentación de *Botryodiplodia theobromae*. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* [Internet]. 2007;XLI(3):27-34. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120666004>
21. Chemotherapeutics M. Shields Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy, 1 2017
22. Natural herbal products for cancer therapy Durgeshwer Singh, Khushboo Kumari et al. *Understanding Cancer*, 1 2022
23. Isorhamnetin: A review of pharmacological effectsPDF Gang Gong, Ying Yun Guan et al. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 8 2020
24. Effects of Quercetin and Its Combinations on Health S. K. Shebeko, I. A. Zupanets et al. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*, 1 2018
25. Anti-Inflammatory Properties of Cinnamon Polyphenols and their Monomeric Precursors Dhanushka Gunawardena, Suresh Govindaraghavan et al. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, 1 2014
26. Salas MG, Zugasti Cruz A, Yesenia S, Belmares S, Urdiales BV, Rodríguez Herrera R, et al. Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro. *Rev Científica la Univ Autónoma Coahuila* [Internet]. 2013 [cited 2022 May

25]; Volumen 5 (No 9). Available from:
<http://biofisica-tema1y2.blogspot.com/2011/05/reacciones-de-oxido-reduccion.html>