



Artículo / Article

Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco

Physical-chemical description of propolis collected in La Primavera forest, Zapopan, Jalisco state

María de Lourdes Delgado Aceves¹, Jesús Ángel Andrade Ortega² y Carlos Alberto Ramírez Barragán²

Resumen

El propóleo es un material resinoso producido por las abejas a partir de recursos naturales vegetativos; tiene propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y antiparasitarias, las cuales varían en función de su fuente natural geográfica. El objetivo de este trabajo fue la caracterización fisicoquímica de propóleo y de su extracto etanólico [EEP], de *Apis mellifera* colectados en la región Zapopan, Jalisco, México. Se obtuvieron extractos etanólicos de propóleo desgrasado [EEPd], que fueron analizados de acuerdo a la Norma Ramal Cubana 932-88. Se determinó la cantidad de flavonoides y fenoles totales, y se obtuvieron sus perfiles espectroscópicos de UV-Vis, fluorescencia y FTIR. Los resultados evidenciaron que el mayor porcentaje en peso se distribuye entre ceras (47 %) y material insoluble en etanol (16 %); sin embargo, el rendimiento del extracto etanólico del propóleo (EEP) fue de 33 %. Se determinó un contenido de fenoles totales de 260 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de EEP y 130 mg de flavonoides equivalentes de quercetina por gramo de EEP. Las huellas espectroscópicas de los EEP muestran bandas de absorbancia (UV-Vis) en los mismos intervalos de longitud de onda en los que las presentan los fenoles; en cuanto a la fluorescencia, las señales de los EEP son similares a las de las moléculas del tipo flavonoides. Los espectros FTIR son consistentes con los de la literatura para otros propóleos, lo que significa que se siguió un buen proceso de obtención.

Palabras clave: Bosque La Primavera, composición química, espectroscopia, fenoles, flavonoides, propóleo.

Abstract

Propolis is a resinous material produced by bees from vegetative natural sources. It has antimicrobial, antiviral and antiparasitic properties, which show variations according to its natural original source and geographic location. The aim of this work was the physicochemical characterization of propolis and its ethanolic extract [EPP] of *Apis mellifera* collected in Zapopan, Jalisco, Mexico. Ethanolic propolis extracts were obtained from defatted propolis [EPPd] according to the *Ramal Cubana* 932-88 standards. Spectroscopic profiles of UV-Vis, fluorescence and FTIR were obtained. Results show that the main percent by weight is composed for waxes (47 %) and ethanol insoluble material (16 %). The yield of ethanolic extract [EEP] was 33 %. The quantification of phenolics compounds were 260 mg of gallic acid equivalents per gram of EEP (expressed as total phenol content) and 130 mg of flavonoids as quercetin equivalent per gram of EEP. The spectroscopic fingerprints (UV-VIS, fluorescence and FTIR spectra) features of the EEP showed absorbance bands in the same wavelength region described by phenols. In the instance of fluorescence, the EEP signals are similar to those reported for flavonoid type molecules. FTIR spectra are consistent with those published in the literature for other propolis, as an indication of a suitable process used in this work.

Key words: La Primavera forest, chemical composition, spectroscopy, phenols, flavonoids, propolis.

Fecha de recepción/date of receipt: 12 de noviembre de 2014; Fecha de aceptación/date of acceptance: 20 de enero de 2015.

¹ Licenciatura en Biología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.

² Centro de Investigación en Biomateriales, Departamento de Madera, Celulosa y Papel, CUCEI, Universidad de Guadalajara. Correo-e: aandrade@dmcy.cucei.udg.mx

Introducción

El nombre de propóleo proviene del griego *propolis*, *pro* “en defensa de” y *polis* “ciudad”; es decir, en defensa de la ciudad, que en el caso de las abejas se refiere a la colmena. El propóleo es una mezcla de resinas y exudados vegetales recolectados por las abejas (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758), con el fin de sellar herméticamente su colmena e impedir que se forme dentro de ella cualquier tipo de contaminación, ya que actúa como un agente microbicida; por lo anterior se le ha usado de manera amplia y popular como un remedio medicinal desde tiempos remotos (Asís, 1991; Farré *et al.*, 2004; Li-Chang *et al.*, 2005).

Las propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y antiparasitarias que se le atribuyen a este producto, también denominadas como actividad biológica o simplemente bioactividad (Banskota *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2013) varían en función de la fuente natural geográfica de donde es extraído (fitogeografía) (Catalin *et al.*, 2010; Yaghoubi *et al.*, 2007); y se atribuyen a la presencia de componentes químicos identificados como familias de polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, etcétera, que pueden llegar a superar los 150 compuestos en un propóleo (Palomino *et al.*, 2010). Entre las moléculas farmacológicamente activas destacan las de tipo flavonoides y ácidos fenólicos con sus ésteres.

En muestras provenientes de países del trópico, que tienen una actividad biológica similar, se han identificado moléculas de terpenoides, derivados prenilados de ácidos *r*-cumáricos, lignanos y benzofenonaspreniladas (Martínez *et al.*, 2012). En Brasil se han aislado como sus constituyentes principales terpenoides y derivados prenilados de ácidos *p*-cumáricos (Maruccci, 1995), mientras que en Chile se han detectado, predominantemente, lignanos, y en Venezuela, Brasil y Cuba se hallaron benzofenonaspreniladas (Palomino *et al.*, 2010).

Los propóleos originarios de zonas templadas (oeste de Asia, Europa y América del Norte) poseen una composición química parecida entre ellos en la que sobresalen los fenólicos (flavonoides, ácidos cinnámicos y derivados).

Lamentablemente, pocos estudios han sido desarrollados con propóleos mexicanos (Lotti *et al.*, 2010), pero es evidente que todo lo anterior sugiere que su actividad biológica se debe a la combinación y sinergias de los diferentes compuestos que contiene.

Si bien, la composición del propóleo es muy compleja y variada, se puede hacer una estimación de sus componentes más importantes: resinas, 50 %; cera, 30 %; polen, 5 %; aceites

Introduction

The name comes from the Greek *propolis*, *pro* for “defending” and *polis* “city”, *i. e.*, in defense of the city, which in the case of bees refers to the hive. Propolis is a mixture of resins and plant exudates collected by bees (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) in order to hermetically seal their hive and prevent it from forming inside any contamination because it acts as a microbicidal agent; for this property, propolis has been used widely and popularly as a medicinal remedy since ancient times (Assisi, 1991; Farré *et al.*, 2004; Li-Chang *et al.*, 2005).

The antimicrobial, antifungal, antiviral and antiparasitic qualities attributed to this product, are also known as biological activity or just bioactivity (Banskota *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2013) which varies depending on the geographical natural source from where it comes (phytogeography) (Catalin *et al.*, 2010; Yaghoubi *et al.*, 2007).

The aforementioned properties are attributed to the presence of chemical components identified as families of polyphenols, flavonoids, phenolic acids, etc., which can reach more than 150 compounds in propolis (Palomino *et al.*, 2010). Among the pharmacologically active molecules include the type of flavonoids and phenolic acids and their esters.

In samples from tropical countries, which also have similar biological activity, terpenoid type molecules have been found prenylated derivatives of *r*-cumaric acids, lignans and prenylated benzophenones (Martínez *et al.*, 2012). On the other hand, in Brazil main constituents of this bee product, terpenoids and prenylated derivatives of *p*-cumaric acids were found (Maruccci, 1995), while in Chile lignans were majorly detected, and in Venezuela, Brazil and Cuba prenylated benzophenones were found (Palomino *et al.*, 2010).

Propolis originating from temperate zones (West Asia, Europe and North America) have a similar chemical composition between them; the main compounds of them are phenolic (flavonoids, cinnamic acids and derivatives).

Unfortunately few studies have been developed using Mexican propolis (Lotti *et al.*, 2010), but what is clear is that all this suggests that the biological activity of propolis is due to the combination and synergy of the different compounds it contains.

While the composition of propolis is very complex and varied, an estimate of the main constituents can be made, which are: 50 % resin, 30 % wax, 5 % pollen, 10 % essential oil, and 5 % other organic waste. It should be noted that most of the studies are not intended to determine the complete chemical composition, if only some of the components of interest, and the quantification thereof (Bracho, 2003).



esenciales, 10 %; y 5 %, de otros residuos orgánicos. Debe señalarse que la mayoría de los estudios no pretenden determinar la composición química completa, si no tan solo algunos de los elementos de interés, así como la cuantificación de los mismos (Bracho, 2003).

En trabajos recientes se han incorporado métodos analíticos a los ya tradicionalmente usados (FTIR, absorbancia UV-Vis y cromatografía); tal es el caso de la espectroscopía infrarroja visible/cercana (Vis/NIR), fluorescencia, espectroscopía Raman y resonancia magnética nuclear (RMN) (Cruz *et al.*, 2008; Peña, 2008). Se asume que cambios espectrales de un propóleo analizado están directamente ligados a una modificación en la su composición química. Debido a la variedad de especies de árboles de las que las abejas recolectan el propóleo, cada región produce mezclas complejas de compuestos que a su vez producen espectros únicos, los cuales se consideran como "huellas digitales" individuales (Hacura, 2006; Yan-Wen *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2012).

El objetivo del presente trabajo fue la caracterización fisicoquímica de propóleo y de su extracto etanólico [EEP] recolectado en la región Zapopan, Jalisco, México, por *Apis mellifera*, mediante la determinación de la humedad, cenizas, ceras y extraíbles en etanol; con técnicas analíticas espectrofotométricas se cuantificó el contenido de fenoles totales, flavonoides y se obtuvieron las huellas espectrales (UV-Vis, fluorescencia y FTIR). Cabe destacar que estos son los primeros datos descriptivos de un propóleo en la región de estudio.

Materiales y Métodos

Sitio de estudio y obtención de propóleos

Los propóleos se obtuvieron de abejas melíferas africanizadas en el apiario del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, localizado en el km 15.5 de la carretera Guadalajara-Nogales, en el predio Las Agujas, Nextipac, municipio Zapopan, Jalisco, México; de acuerdo a las coordenadas: 20°44'50.3" de latitud norte y 103°30'43.6" de longitud oeste y una altitud de 1 662 m.

Las muestras se recolectaron en el otoño, de septiembre a noviembre de 2013, por el método de malla plástica. La vegetación predominante alrededor del apiario incluye especies arbóreas: *Quercus resinosa* Liebm., *Q. magnoliifolia* Née, *Q. castanea* Née, *Clethra rosei* Britton, *Arbutus xalapensis* Kunth, *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl., *P. devoniana* Lindl., *P. douglasiana* Martínez, *P. lumholtzii* B. L. Rob. & Fernald, *P. luzmariae* Pérez de la Rosa y *Arbutus glandulosa* Mart. & Galleotti. El material se almacenó en refrigeración (2 °C) y ausencia de luz durante 72 h.

In recent works, analytical methods have been incorporated to those traditionally used (FTIR, UV-Vis absorbance and chromatography); such is the case of visible / near-infrared spectroscopy (Vis / NIR) fluorescence, Raman spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR) (Cruz *et al.*, 2008; Peña, 2008). It is assumed that spectral changes of analyzed propolis are directly linked to a change in chemical composition. Due to the variety of tree species from which the bees collect propolis, each region produces complex mixtures of compounds which in turn produce unique spectra, which can be considered as "fingerprints" of each one of them (Hacura, 2006; Yan-Wen *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2012).

The objective of this work was the physicochemical characterization of propolis and its ethanolic extract [EEP] collected in Zapopan, Jalisco, Mexico, by *Apis mellifera* region.

For this, the proportion of the main components (moisture, ashes and removable in ethanol) was determined; by spectrophotometric analytical techniques the content of total phenols, flavonoids was quantified and the spectral fingerprints (UV-Vis, fluorescence and FTIR) were obtained. Notably descriptive data are the first of a propolis in the region.

Materials and Methods

Study Area and propolis recruitment

Propolis were taken from Africanized honeybees in the apiary of the Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) of the Universidad de Guadalajara at km 15.5 of the Guadalajara-Nogales highway, Las Agujas, Nextipac property, Zapopan, Jalisco, Mexico, within 20°44'50.3" north and 103°30'43.6" west at 1 662 m. CUCBA is located near by the "La Primavera" Forest.

Samples were taken during fall, from September to November, 2013, by the plastic mesh method. The dominant vegetation around the apiary includes tree species such as: *Quercus resinosa* Liebm., *Q. magnoliifolia* Née, *Q. castanea* Née, *Clethra rosei* Britton, *Arbutus xalapensis* Kunth, *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl., *P. devoniana* Lindl., *P. douglasiana* Martínez, *P. lumholtzii* B. L. Rob. & Fernald, *P. luzmariae* Pérez de la Rosa and *Arbutus glandulosa* Mart. & Galleotti. The material was stored under refrigeration (2 °C) and without light for 72 h.

Physical-chemical properties

Analysis were performed thrice. The methods that were used are included in the Norma Ramal Cubana 932-88 (Asís, 1991); the use of this regulation obeys to the latitude reciprocation of the study region, which suggests that compositions are similar. To the ethanolic extract of propolis (EEP) were detected

Propiedades fisicoquímicas.

Los análisis se realizaron por triplicado. Los métodos utilizados correspondieron a los de la Norma Ramal Cubana 932-88 (Asís, 1991), cuyo uso obedece a la correspondencia de latitudes de la región de estudio, lo que hace suponer que se trata de composiciones similares. Al extracto etanólico de los propóleos (EEP) se le identificó el contenido de polifenoles y flavonoides y se aplicó espectrofotometría de UV-Vis, fluorescencia e infrarrojo (FTIR). Las pruebas fisicoquímicas realizadas fueron las siguientes:

Cenizas. Se determinaron gravimétricamente al calcinar 0.5 g de muestra en mufla a 500 °C, durante 4 h; posteriormente se pasó a un desecador hasta alcanzar un peso constante.

Humedad. Se calculó de forma termogravimétrica; se secaron 0.5 g de muestra en estufa (Felisa FE-292AD) a 105 ± 2 °C hasta llegar a un peso constante.

Índice de oxidación. Se realizó de acuerdo con la metodología de Salamanca *et al.* (2007) y Asís (1991). El método se basa en el tiempo que demora en decolorar una solución de permanganato de potasio por la acción reductora del propóleo en medio ácido, con modificaciones: se pesaron 0.2 g de propóleo en un frasco ámbar con tapa; enseguida se le adicionaron 3 mL de etanol (96 %) y se le dejó en agitación por 48 h a 25 °C. La mezcla obtenida se pasó lentamente a través de un papel filtro. A continuación, se tomó 1 mL del filtrado y se diluyó con agua destilada hasta 25 mL en un matraz aforado. De esta disolución se vertieron 0.5 mL a un tubo de ensayo, se le agregaron 0.5 mL de agua destilada y 1 mL de H₂SO₄ al 20 %, y se agitó durante 1 min; después de ese lapso se añadieron 50 µL de solución de KMnO₄ (0.1 N).

Cera. Se determinó por gravimetría (diferencia de masas) entre una muestra original y el residuo obtenido mediante una extracción con hexano (40-60 °C) en un equipo Soxhlet, durante 8 h.

Material insoluble en etanol. Se pesó 1 gramo de propóleo desgrasado, y se le añadieron 10 mL de alcohol etílico (96 %); se dejó 24 h en agitación, al término se filtró a vacío en papel Whatman Núm. 41; el residuo sólido remanente se secó a temperatura ambiente en desecador de vidrio hasta peso constante, que corresponde al material insoluble en etanol.

Extraíbles en etanol. Basado en la descripción metodológica anterior, la diferencia de masa entre la muestra original y el material insoluble en etanol se denomina "extraíbles en etanol".

Obtención de los extractos. Se pesaron 5 g de propóleo desgrasado, los cuales se sometieron a extracción exhaustiva en agitación con etanol de 96 % (1 g 10 mL⁻¹) durante 24 h, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Después se

the contents of polyphenols and flavonoids and the UV-Vis fluorescence and infrared (FTIR) spectra were obtained. The physical-chemical tests were the following:

Ashes. They were gravimetrically determined when 0.5 g of the sample were charcoaled in a muffle at 500 °C for 4 h; afterwards, it was put into a desiccant until a constant weight was reached.

Moisture. It was calculated by thermogravimetry; 0.5 g of the sample were dried in an Felisa FE-292AD oven at 105 ± 2 °C until a constant weight.

Oxidation index. It was carried out by the methodology of Salamanca *et al.* (2007) and Asís (1991). The method is based on the time that it takes to discolor a sodium permanganate solution by the reduction action of propolis in an acid medium, with some modifications, as described as follows: 0.2 g of propolis were weighted in an amber jar with cap; afterwards, 3 mL ethanol (96 %) were added and it was left 48 h stirring at 25 °C. This mixture was slowly passed through a filter paper. Next, 1 mL of this filtered and was dissolved in 25 mL distilled water in a volumetric flask. 0.5 mL of this solution was drained into a test tube, to which 0.5 mL distilled water and 1 mL 20 % H₂SO₄ were added and it was stirred for 1 min. Next, 50 µL of KMnO₄ (0.1 N) solution were added.

Wax. Calculation was made through gravimetry (mass difference) between the original y the residual obtained through hexane extraction (40-60 °C) in a Soxhlet equipment for 8 h.

Insoluble material in ethanol. 1 g of lean propolis was weighted and 10 mL of ethilic alcohol (96%) and it was left stirring for 24 h and at the end, it was filtered in Whatman No. 41 paper in a vacuum; the solid residue was dried at room temperature in a glass desiccant until constant weight, which corresponds to the insoluble material in ethanol.

Extracts in ethanol. Based upon the former methodological description, the difference of mass between the original sample and the insoluble material in ethanol is named "extracts in ethanol".

Obtainment of the extracts. 5 g of lean propolis were weighted, which were submitted to exhaustive extraction by stirring with 96 % ethanol (1g 10 mL⁻¹) for 24 h at room temperature and without light. Later a vacuum was used for filtering with Whatman No. 41 paper; the solid fraction was put into Petri boxes, which were kept in a desiccant until in order to know the yield. The ethanolic fraction was subjected to an evaporation in a vacuum and at 40 °C, until de dry point. The resulting resine (EEPd) was bottled in amber phials and refrigerated under -12 °C for its later use. In the same way the raw propolis extract (not lean, EEPo) was produced.

usó vacío para la filtración con papel filtro Whatman Núm. 41; la fracción sólida se colocó en cajas de Petri que se mantuvieron en desecador hasta alcanzar un peso constante, con el propósito de conocer el rendimiento. La fracción etanólica se sometió a un proceso de evaporación al vacío y temperatura de 40 °C, hasta el punto de sequedad. La resina resultante (EEPd) fue envasada en viales ámbar y refrigerada a -12 °C hasta su posterior utilización. De la misma forma se produjo el extracto de propóleo en crudo (sin desgrasado, EEPo).

Preparación de las soluciones de extractos etanólicos de propóleo (EEP). Se pesaron 0.33 g de EEP (tanto desgrasado como sin desgrasar) y se disolvieron en 10 mL de etanol.

Determinación cuantitativa de fenoles totales y flavonoides

El contenido de fenoles totales en el extracto fue determinado por el método de *Folin Ciocalteu* (Singleton y Rossi, 1965), con ácido gálico como estándar de referencia; se graficaron curvas de calibración (100, 200, 300 y 400 ppm) y se leyó la absorbancia a 760 nm; el contenido de flavonoides totales se cuantificó por el método del $AlCl_3$ (Woisky y Salatino, 1998), con quercetina como estándar de referencia (40, 60, 80 100 y 120 ppm) y se registró la absorbancia a 420 nm; en ambos casos se usó un espectrofotómetro *Ocean Optics* USB 4000 y etanol al 96 % como blanco.

Análisis espectroscópicos

Espectroscopía UV-Vis. A partir de las soluciones de extracto etanólico (EEP) se hicieron diluciones en etanol al 96 % y enseguida se produjeron los perfiles de absorbancia en UV-Vis, mediante un equipo *Ocean Optics* USB 4000 en un intervalo de 200 a 450 nm.

Espectrofluorescencia. Se procedió de igual forma y con las mismas soluciones que en la espectroscopia UV-Vis, para establecer los perfiles de fluorescencia, solo que las lecturas se llevaron a cabo en un intervalo de 400 a 650 nm con un equipo *Ocean Optics* USB 2000 FL.

Espectroscopía FTIR. Se lograron los espectros de FTIR de soluciones de propóleo desgrasado (EEPd), las cuales se prepararon a partir de la disolución de 1 g en 10 mL de etanol. Estos análisis se efectuaron en un equipo *Perkin Elmer* modelo *Spectrum GX*® con aditamento de cristal de diamante, en un intervalo de 700 a 4 000 cm^{-1} .

En todos los análisis espectroscópicos también se obtuvieron los espectros de los compuestos usados como estándares para la determinación de fenoles totales y flavonoides: ácido gálico (SAG), quercetina (SQ) y una mezcla de ambas (MAGQ).

Preparation of the ethanol propolis extracts (EEP) solutions. 0.33 g of EEP (lean and not lean) were weighted and were solved into 10 mL ethanol.

Quantitative determination of total phenols and flavonoids

The total phenol content in the extract was determined by the *Folin Ciocalteu* (Singleton and Rossi, 1965) method, with Gallic acid as reference standard; calibration curves (100, 200, 300 and 400 ppm) were drawn and absorbance was read at 760 nm; the content of total flavonoids was quantified by the $AlCl_3$ method (Woisky and Salatino, 1998), with quercetin as reference standard (40, 60, 80, 100 and 120 ppm) and absorbance was recorded at 420 nm; in both cases an *Ocean Optics* USB 4000 spectrophotometer and 96 % ethanol as target were used.

Spectroscopic analysis

UV-Vis Spectroscopy. From the ethanolic extract (EEP) were made dilutions in 96 % ethanol and later were obtained the profiles of the absorbance in UV-Vis by an *Ocean Optics* USB 4000 equipment in a 200 to 450 nm range.

Spectrofluorescence. In the same way and with the same solutions as with the UV-Vis Spectroscopy it was proceeded in order to establish the fluorescence profiles, only that the readings were made at a 400 a 650 nm range with an *Ocean Optics* USB 2000 FL.

FTIR Spectroscopy. The FTIR spectra of lean propolis (EEPd), which were prepared by the solution of 1 g in 10 mL ethanol. These analysis were made with a *Perkin Elmer* *Spectrum GX*™ model equipment in a 700 a 4 000 cm^{-1} range.

In all the spectroscopic analysis there were also found the compound spectrum used as standards for the determination of total phenols and flavonoids: Gallic acid (SAG), quercetin (SQ) and a mixture in both (MAGQ).

Results and Discussion

The physical-chemical assessment, total phenols and flavonoids of propolis as well as of its ethanolic extract are in Table 1.

The per cent values of ashes and moisture (2.5 % and 4.0 %, respectively) in the studied propolis were considered right as a higher number than 5 % of the first one would be associated to a higher metal content, including some that are toxic, such as lead; in regard to moisture content, a value over 10 % indicates the presence of possible fermentations, which forms non desirable or polluting products that might be toxic and harmful for health (Palomino *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Caracterización del propóleo de estudio y su comparación con valores estandarizados.
Table 1. Description of the studied propolis and its comparison with standard values.

| | Humedad (%) | Cenizas (%) | Cera (%) | Material insoluble en etanol(%) | Extraíbles con etanol (%) | Fenoles (%) | Flavonoides (%) |
|---------------------------|----------------|----------------|-------------|------------------------------------|------------------------------|----------------|--------------------|
| Propóleo de este trabajo | 4 | 2.5* | 47 | 16 | 33 | 8.6 ** | 4.3 ** |
| Norma Ramal Cubana 932-88 | ≤ 10 | ≤ 5 | ≤ 45 | ≤ 30 | ≥ 30 | - | - |

*Las cenizas se consideran dentro de impurezas mecánicas.

**Dentro de extraíbles con etanol.

*Ashes are considered within the mechanical impurities

**Within extractables with ethanol

Resultados y Discusión

La evaluación fisicoquímica, contenido de fenoles totales y flavonoides del propóleo y de su extracto etanólico se presentan en el Cuadro 1.

Los valores porcentuales de cenizas y humedad (2.5 % y 4.0 %, respectivamente) se consideran adecuados debido a que un valor superior a 5 % de cenizas estaría asociado a un mayor contenido de metales, incluso algunos que resultan nocivos, como el plomo; en cuanto al contenido de humedad, un porcentaje superior a 10 % sería indicativo de ocurrencia de posibles fermentaciones, lo que genera productos no deseados o contaminantes, que pueden ser tóxicos y perjudiciales para la salud (Palomino *et al.*, 2010).

La cantidad de cera presente en el propóleo resultó alta (47 %), y posiblemente esté influenciado por múltiples factores: la época del año en que se recolectó, por una mala manipulación del apicultor, o por la especie de abeja que llevó a cabo la recolección (Arrate, 2008; Londoño *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2012). Un gran contenido de ceras en muestras de propóleos crudos es desfavorable, porque en esta fracción no están los compuestos fenólicos, los cuales se asocian con la actividad biológica (Cupull *et al.*, 2013).

Además del contenido de ceras, otro parámetro que incide notablemente en la calidad del propóleo son las resinas solubles en etanol, ya que cuanto mayor sea el valor de esta fracción, mejor será el producto final, debido a que es en ella donde están los compuestos de interés. En el caso particular del estudio que se documenta, el valor de 33 % resulta favorable, si se considera el contenido de ceras determinado. Adicionalmente, el material insoluble es un elemento que no contiene los principios activos y su elevada presencia deprecia el producto (Arrate, 2008). En el propóleo analizado, este parámetro fue de 16 %; es decir, casi no contiene impurezas mecánicas, y se ubica 50 % por debajo de lo establecido en la norma Ramal Cubana 932-88 (Asís, 1991).

The amount of wax in propolis was high (47 %); this value might be influenced by multiple factors: time of the year when it was collected, incorrect handling by the beekeeper, bee species that made the collection (Arrate, 2008; Londoño *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2012). A high content of wax in raw propolis samples is unfavorable because in this fraction are present the phenolic compounds, which are associated to the biological activity (Cupull *et al.*, 2013).

In addition to the wax content, another parameter that notably influences the quality of propolis is the content of soluble resins in ethanol since, the higher this value of this fraction becomes, better would be the quality of the final product, since there is where the compounds of interest are. In the particular case of this study, the value of 33 % is favorable, starting from the wax content that was found. Also, the insoluble material is an element of propolis that does not have the active principles and its high presence depreciates the product (Arrate, 2008). The result for this parameter in the studied propolis was 16 %, that is, it has almost no mechanical impurities, which places it 50 % under what the *Ramal Cubana* 932-88 regulation states (Asís, 1991).

Finally, a fast determination of the antioxidant (related to the biological activity of propolis), is the oxidation index. Results for these tests were seven seconds in average, a number that is a good indicator of the presence of phenolic compounds, or with oxidating functional groups (Palomino *et al.*, 2010), as the *Ramal Cubana* regulation defines 22 seconds as maximum (Asís, 1991).

The quantification of total phenolic compounds in the EEP showed a content of 260 mg equivalent to Gallic acid / g of the sample. On the other hand, the flavonoid concentration obtained in EEP was 130 mg equivalent to quercetin g⁻¹ of the sample. Lotti *et al.* (2010) recorded, for the first time, the existence of isoflavonoids in Mexican propolis; the importance of the presence and concentration of phenolic compounds lies in the fact that it is to these molecules to which are attributed the biological properties of propolis, mainly the flavonoid compounds that are associated to antimicrobial activity (Manrique, 2006; Mihai *et al.*, 2012).



Una determinación rápida de la capacidad antioxidante (asociada a la actividad biológica del propóleo) es el índice de oxidación. Los resultados para esta prueba fueron en promedio de siete segundos, número que representa un buen indicador de la presencia de compuestos de naturaleza fenólica, o con grupos funcionales oxidables (Palomino *et al.*, 2010), ya que la norma de Ramal Cubana (Asís, 1991) establece 22 segundos como máximo.

La cuantificación de compuestos fenólicos totales en los EEP arrojó un contenido de 260 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. Por otra parte, la concentración de flavonoides obtenida en EEP fue de 130 mg equivalentes de quercetina g⁻¹ de muestra. Lotti *et al.* (2010) registraron por primera vez la existencia de isoflavonoides en propóleos mexicanos; la importancia de la presencia y concentración de compuestos fenólicos radica en que se les atribuyen las propiedades biológicas del propóleo, principalmente, los tipo flavonoides que se asocian a la actividad antimicrobiana (Manrique, 2006; Mihai *et al.*, 2012).

Al referirse a estos compuestos, en términos porcentuales respecto al propóleo bruto, hay 8.6 % de fenoles totales, cantidad que parece ser baja; sin embargo, el contenido de flavonoides es de 4.3 %; por lo que su proporción dentro de los fenoles totales es de 50 %, valor relevante e importante debido a las propiedades a las que se asocian esas moléculas.

Espectroscopía UV-Vis

Dado que se emplean tanto el ácido gálico, como la quercetina en la determinación del contenido en el propóleo de fenoles y flavonoides (moléculas bioactivas), respectivamente (Cai *et al.*, 2012), se obtuvieron las huellas espectrales de absorbancia para las moléculas puras, así como una mezcla de las (Figura 1a). En el caso de SAG se distinguen las señales características registradas por Hernández *et al.* (2013) a 220 y 267 nm (221 y 267 en la solución del estudio); en la SQ también se aprecian señales previamente establecidas por Dimarco *et al.* (2012) que se ubican en 260 y 375 nm (255 y 376 en el estudio). Además, se evidencian un par de señales más a 210 y 230 nm. Al analizar la mezcla de las soluciones estándar, se obtuvo el espectro de la MAGQ que, si se observa con atención, es el resultado de la suma de las señales de los espectros de los estándares individuales; en la zona de los 200 a los 300 nm los picos de la quercetina son apantallados por la mayor absorbancia del ácido gálico.

La Figura 1b muestra el espectro de absorbancia de los EEPo y EEPd que presentan dos señales características y distintivas: a 211 y 292 nm; las distintas intensidades entre EEPo y EEPd se asocian a la diferencia en el contenido de ceras y grasas que fueron removidas en el caso del EEPd; por ello, el comportamiento de la absorbancia es casi el mismo para

When referring to these compounds in per cent terms in regard to raw propolis, there are 8.6 % of total phenols, an amount that seems to be low; however, the content of flavonoids is 4.3 %, that is, its proportion within the total phenols is 50 %, a relevant and important value due to the properties to which are linked this kind of molecules.

UV-Vis Spectroscopy

Since Gallic acid and quercetin are used to determine the phenol and flavonoid content (bioactive molecules) respectively, in the propolis (Cai *et al.*, 2012) were obtained the spectral fingerprints of absorbance for the pure molecules, as well as a mixture of them, which are shown in Figure 1a. In the case of SAG were observed the characteristic signals reported by Hernández *et al.* (2013) at 220 and 267 nm (221 and 267 in the solution of this study); in SQ are appreciated the signals previously described by Dimarco *et al.* (2012) that are located in 260 and 375 nm (255 and 376 in the actual study). In addition, one more pair of signs at 210 and 230 nm appeared. When the mixture of standard solutions was analyzed, the MAGQ specter was found, which if carefully observed, is the result of the addition of signals of the individual standard spectra; in the 200 to 300 nm zone, the peaks of quercetin are screened for the greatest absorbance of the Gallic acid.

Figure 1b shows the absorbance spectrum of the EEPo and EEPd, that show two characteristic and distinctive signals: at 211 nm and at 292 nm; the difference of intensities between EEPo and EEPd are associated to the difference in the content of wax and grease that were removed in EEPd; therefore, the behavior of absorbance is the same for both EEP, which seems to be basically governed by the content of total phenolic compounds which is based on the signals at 211 nm for both EEP, which is very close to that of MAGQ at 223 nm, while the 292 nm signal looks displaced to the right compared to the MAGQ which is at 262 nm and further (to the left) of 373 nm. This tendency (two signals) in the EEP atypical in contrast to absorbance spectra of other propolis, as most the them have only one single signal between 200 and 300 nm, or either a wide curve of 210 to 300 nm (Samara *et al.*, 2011; Bedascarrasbure *et al.*, 2004).



ambos EEP, lo que parece estar regido, básicamente, por el contenido de compuestos fenólicos totales, esto obedece a las señales a 211 nm para ambos EEP muy cerca de la que presenta MAGQ a los 223 nm, mientras que la señal a los 292 nm aparece desplazada a la derecha, con respecto al de la MAGQ que está a 262 nm y lejos (hacia la izquierda) de la de 373 nm. Esa tendencia (dos señales) en los EEP es atípica en comparación con espectros de absorbancia de otros propóleos, pues la mayoría tiene una sola señal entre 200 y 230 nm o bien una amplia curva de 210 a 300 nm (Samara *et al.*, 2011; Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

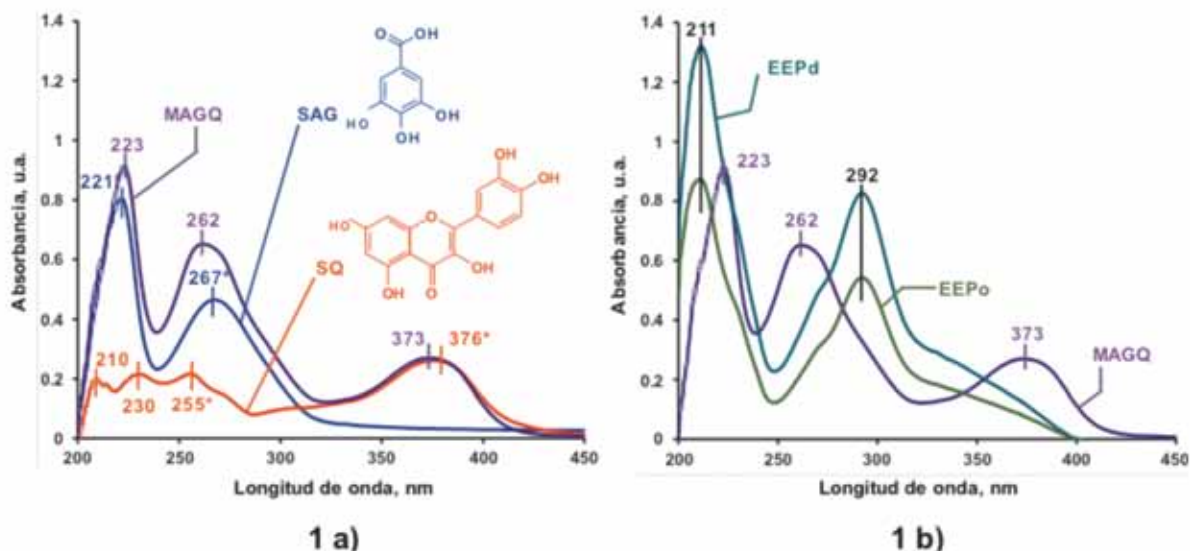


Figura 1. Espectros de absorbancia: a) comparación entre solución estándar de ácido gálico (SAG), solución estándar de quercetina (SQ) y mezcla (MAGQ). b) Extractos etanólicos de propóleo (EEPo y EEPd) y MAGQ.

Figure 1. Absorbance spectra: a) comparison between the standard solution of Gallic acid (SAG), the standard solution of quercetin (SQ) and mixture (MAGQ); b) Ethanolic extracts of propolis (EEPo and EEPd) and MAGQ.

Espectrofluorimetría

Los espectros obtenidos por el método de espectrofluorimetría se muestran en las figuras 2a y 2b. Al analizar el de las soluciones estándar SAG, SQ y MAGQ (Figura 2a), se puede reconocer como SAG, tiene poca intensidad de fluorescencia en comparación con SQ, efecto que parece estar asociado a lo que se denomina "rigidez molecular", que involucra la cantidad de anillos y dobles enlaces en la molécula del estándar, y que en este caso favorece a la molécula mayormente conjugada tipo flavonoide como la quercetina (SQ). Las señales de intensidad de fluorescencia consignadas en la literatura (Frederice *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2013) de 490 y 540 nm para SAG y de 496 y 532 nm para SQ son consistentes con los aquí documentadas (494 y 535 nm para SAG y SQ); sorprendentemente, la mezcla

Spectrofluorometry

The spectra that were obtained by the spectrofluorometry method are shown in figures 2a and 2b. When analyzing the one of the SAG, SQ and MAGQ standard (Figure 2a), it can be recognized how SAG has low fluorescence intensity compared to SQ, an effect that seems to be associated to what has been called "molecular stiffness", which involves the number of rings and double links in the standard molecule, and that, in this case, favors the mostly combined flavonoid type molecule as quercetin (SQ). The signals of fluorescence intensity

in literature (Frederice *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2013) of 490 and 540 nm for SAG and of 496 and 532 nm for SQ are consistent with those of the actual work (494 and 535 nm for SAG and SQ); surprisingly, the MAGQ mixture seems to provoke a "quenching" effect, since it reduces drastically the intensity of fluorescence to 535 and 494 nm. Also, a new band is generated in an inverse sense to Stokes displacement (to the left) at 406 nm, even though of medium intensity.

The fluorescence spectra for EEPo and EEPd are similar between them (Figure 2b), with signals of maximum intensity at 540 and 535 nm, regardless of whether EEP is lean or not; also, such value coincides with the maximum fluorescence intensity for SAG, SQ and MAGQ which is of 535 nm. From tendency and intensity, it seems that flavonoids are analyzed by similitude to the SQ spectrum.

MAGQ parece provocar un efecto de "quenching" ya que reduce de forma drástica la intensidad de fluorescencia a 535 y 494 nm. Asimismo, se genera una nueva banda en sentido contrario al desplazamiento de Stokes (hacia la izquierda) a 406 nm, aunque de mediana intensidad.

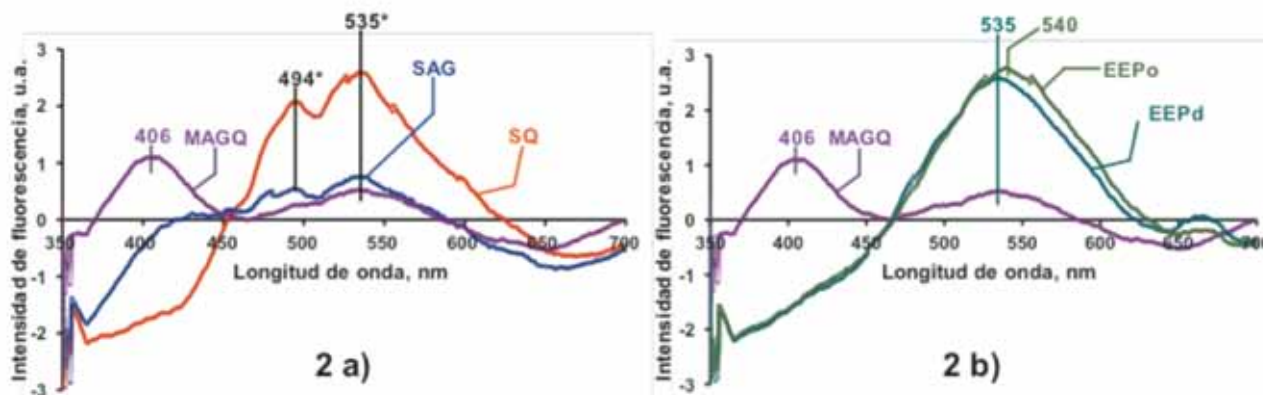


Figura 2. Espectros de intensidad de fluorescencia: a) comparación entre solución estándar de ácido gálico (SAG), solución estándar de quercetina (SQ) y mezcla (MAGQ). b) Extractos etanólicos de propóleo (EEPo y EEPd) y MAGQ.
 Figure 2. Fluorescence intensity spectra: a) comparison between the standard solution of Gallic acid (SAG), the standard solution of quercetin (SQ) and mixture (MAGQ); b) Ethanolic extracts of propolis (EEPo and EEPd) and MAGQ.

Los espectros de fluorescencia para EEPo y EEPd son similares entre sí (Figura 2b), con señales de máxima intensidad a 540 y 535 nm, independientemente de si está desgrasado o no el EEP; además, dicho valor coincide con la máxima intensidad de fluorescencia para SAG, SQ y MAGQ que es de 535 nm. Por tendencia e intensidad, parece que se analizan flavonoides por su similitud al espectro de SQ.

Espectroscopía FTIR

Se generaron espectros de infrarrojo con el objetivo de identificar los principales grupos funcionales y enlaces de los componentes en el propóleo obtenido (EEPd). En la Figura 3 se observan los espectros de infrarrojo en transmitancia para la muestra EEPd y su comparación con ácido gálico y quercetina.

Como se aprecia, las principales señales se corresponden entre sí, tan solo con ligeros desplazamientos, lo cual es factible que se relacione con la presencia de diferentes tipos de fenoles en el extracto EEPd, mientras que las señales del espectro de ácido gálico son solo de uno de ellos en particular. Lo anterior

FTIR Spectroscopy

Infrared spectra were formed with the aim to identify the main functional groups and links of the components in the resulting propolis (EEPd). In Figure 3 can be observed the infrared spectra in transmittance for the EEPd and its comparison with Gallic acid and quercetin.

As it can be appreciated, the main signals are coincidental among them, only with slight displacements, which could be related with the presence of different kinds of phenols in the EEPd extract, while the signals of the spectrum of Gallic acid are just one of them in particular. This too can be seen with more detail in Table 2, in which a summary of the main signals for phenols and flavonoids are shown and it is easy to find that most of the characteristic signals of phenols do coincide with those obtained for the EEPd extract.

Something alike happens with the EEPd and the quercetin spectra (Figure 3), in which almost all the signals exist, in SQ and in the extract, in a similar way only with a slight displacement, which have already been registered by some authors for this kind of samples (Yan-Wen *et al.*, 2008). In an analogous way (Table 2), there is high correspondence of the signals of the sample analyzed in the laboratory (EEPd) with those in literature (Yan-Wen *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2012) for phenols and flavonoids; this can be considered as a strong indicator of



también se advierte con mayor detalle en el Cuadro 2, en el que se ofrece un resumen de las principales señales para fenoles y flavonoides, y es fácil visualizar que la mayoría de las señales características de los fenoles se corresponden con las obtenidas para el extracto EEPd.

the presence of both types of compounds in the extract, which can be explained with the main characteristic signals for them are: vibration and bending at $1\ 450\ \text{cm}^{-1}$ (for this study, $1\ 450\text{-}1\ 455\ \text{cm}^{-1}$), of vibration and bending at $1\ 369\ \text{cm}^{-1}$ (for this study, $1\ 380\ \text{cm}^{-1}$) and of vibration, lengthening and

Cuadro 2. Principales señales de FTIR para el extracto (EEPd) y su comparación con los de la literatura (Yan-Wen *et al.*, 2008).
Table 2. Main FTIR signals for the extract (EEPd) and its comparison with those in literature (Yan-Wen *et al.*, 2008).

| Frecuencia, cm^{-1} (literatura) | Frecuencia, cm^{-1} (este trabajo) | Tipo de señal | Tipo de enlace | Asignación |
|---|---|--|--|--|
| 3335 | 3339 | Alargamiento | O-H y N-H | Hidroxilos y aminas |
| 2917 | 2973 | Alargamiento asimétrico | C-H | grupos CH_2 de saturación |
| 2849 | 2880 | Alargamiento simétrico | C-H | Hidrocarburos |
| 1699 | 1653 | Vibración de flexión asimétrica | C=O | Lípidos, flavonoides y aminoácidos |
| 1661 | 1653 | Vibración de alargamiento (C-O) y flexión (C-OH) | C-O y C-OH | Lípidos y alcoholes terciarios |
| 1513 | - | Alargamiento | Compuestos aromáticos | Flavonoides y anillos aromáticos |
| 1450 | 1450-1455 | Vibración de flexión | C-H de grupos CH_2 y CH_3 , aromáticos | Flavonoides y anillos aromáticos |
| 1369 | 1380 | Vibración de flexión | C-H | grupo CH_3 de flavonoides |
| 1269 | 1274 | Vibración de flexión (O-H) y de flexión asimétrica (C-CO) | O-H y C-CO | Hidrocarburos |
| 1088 | 1087 | Vibración de alargamiento (C-C) y flexión (C-OH) | C-C y C-OH | Flavonoides y grupos alcohólicos secundarios |
| 1043 | 1046 | Alargamiento (=C-O-C), Alargamiento (C-C) y flexión (C-OH) | =C-O-C, C-C y C-OH | Grupos alcohólicos primarios |
| 881 | 880 | Estiramiento simétrico | C-C-O | Alcoholes primarios y secundarios |

Algo similar ocurre con la comparación entre los espectros de EEPd y la quercetina (Figura 3), en la que prácticamente todas las señales existen, tanto en SQ como en el extracto, de modo parecida tan solo con ligeros desplazamientos, los cuales han sido ya registrados por algunos autores para este tipo de muestras (Yan-Wen *et al.*, 2008). De forma análoga (Cuadro 2), hay alta correspondencia de las señales de la muestra analizada en el laboratorio (EEPd) con las dadas a conocer por diversos autores (Yan-Wen *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2012) para fenoles y flavonoides; lo cual se puede considerar como un fuerte indicativo de la presencia de los dos compuestos en el extracto, y se explica porque las señales características principales para ambos son vibración y flexión a $1\ 450\ \text{cm}^{-1}$ (para este estudio, $1\ 450\text{-}1\ 455\ \text{cm}^{-1}$), de vibración y flexión a

bending at $1\ 088\ \text{cm}^{-1}$ (for this study, $1\ 087\ \text{cm}^{-1}$). The signal at $880\ \text{cm}^{-1}$ is related to primary and secondary alcohols, and specifically ethanol shows a symmetrical stretching at $880\text{-}881\ \text{cm}^{-1}$ (for this study, $800\ \text{cm}^{-1}$), which obeys to the fact that the extracts are dissolved into ethanol.



1 369 cm^{-1} (en el presente trabajo, 1 380 cm^{-1}) y de vibración, alargamiento y flexión a 1 088 cm^{-1} (para el caso analizado, 1 087 cm^{-1}). La señal a 880 cm^{-1} está asociada a alcoholes primarios y secundarios y específicamente en el etanol se da un estiramiento simétrico a 880-881 cm^{-1} (para este estudio, 800 cm^{-1}), en respuesta a que los extractos están disueltos en etanol.

The infrared spectra for the EPPd sample may be considered as a "fingerprint" of the studied propolis in particular. It has been recorded by other authors (Zimnicka and Hacura, 2006; Shang, 2011) that the composition of propolis may vary with the area and the season in which they are collected.

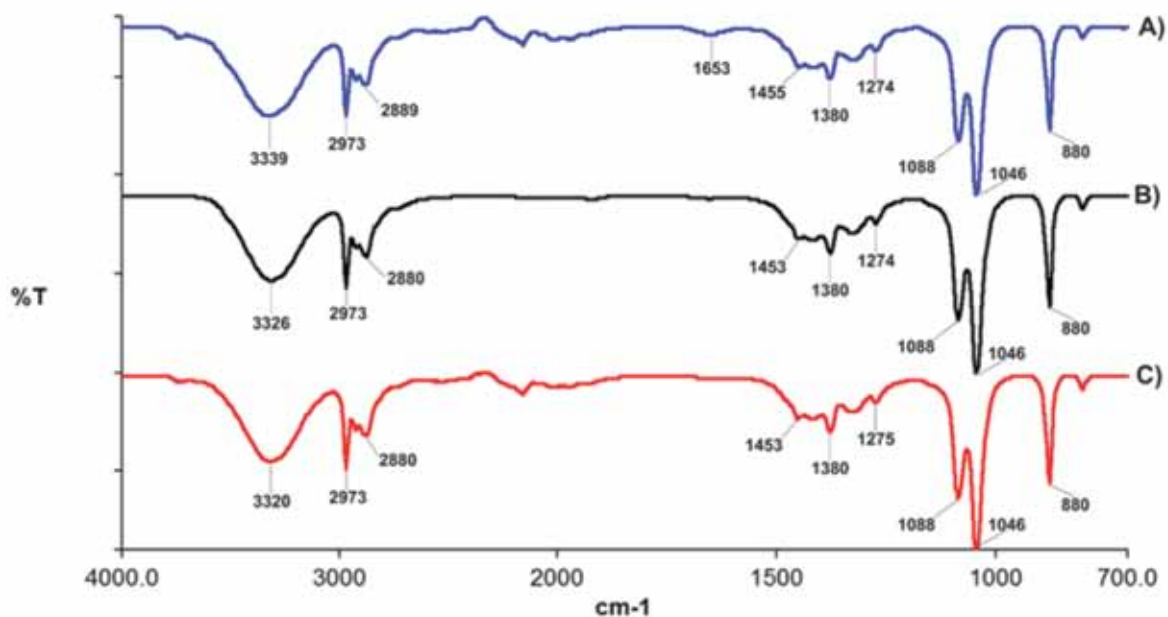


Figura 3. Espectros de FTIR de A) propóleo desgrasado (EPPd), B) ácido gálico (SAG) y C) quercetina (SQ).
 Figure 3. FTIR spectra of: A) lean propolis (EPPd), B) Gallic acid (SAG) and C) quercetin (SQ).

Los espectros de infrarrojo obtenidos para la muestra EPPd se considera como una "huella digital" del propóleo estudiado. Ha sido consignado por otros autores (Zimnicka y Hacura, 2006; Shang, 2011) que la composición de los propóleos pueden variar con el área y la estación del año en los que se recolectan.

Por lo anterior se propone el uso de las técnicas espectroscópicas (UV-VIS, Fluorescencia, FTIR) para dar un seguimiento a la composición del propóleo o a infecciones de la colmena por bacterias o virus a lo largo del tiempo, y usar los cambios en los espectros como indicadores de las modificaciones en el medio ambiente, las cuales son factibles de verificarse en las especies de árboles de las que las abejas obtienen los diferentes componentes para elaborar este importante producto.

Conclusiones

El estudio que se presenta constituye la primera descripción fisicoquímica de propóleo procedente del Bosque La Primavera, en el que la muestra analizada presenta características ubicadas


Therefore, it can be proposed the use of the spectroscopic techniques (UV-VIS, Fluorescence, FTIR) to monitor the composition of propolis or infections of the beehive by bacteria or virus along time and use the changes in the spectra as indicators of the modifications in the environment, which may take place in the tree species from which bees take the different ingredients to make this important product.

Conclusions

This is the first study of the physical-chemical description of propolis collected in *La Primavera* Forest, in which the analyzed sample showed characteristics which place it within the parameters established in the *Ramal Cubana* 932-88 regulation, according to which it is considered that it has a great potential to develop biological activity and possible applications in the health area.

The obtained spectra suggest that the UV-Vis profile is atypical since it has two particular and differentiated signals; this kind of result would be more linked to the existence and concentration of total phenols. The fluorescence profile suggests

dentro de los parámetros establecidos en la norma Ramal Cubana 932-88, en función de los cuales se considera que tiene un gran potencial para desempeñar actividad biológica y, por lo tanto, tener aplicaciones en el área de la salud.

Los espectros obtenidos sugieren que el perfil UV-Vis es atípico, ya que tiene dos señales particulares y diferenciadas; resultados más asociados a la existencia y concentración de fenoles totales. El perfil de fluorescencia evidencia compuestos con anillos conjugados y gran cantidad de dobles enlaces, como los que se observan en las moléculas tipo flavonoide, los cuales poseen un espectro de emisión fluorescente único. En cuanto al análisis mediante FTIR, los espectros revelaron prácticamente la totalidad de las señales representativas de los grupos químicos correspondientes a fenoles y flavonoides, indicador de la presencia de dichos compuestos en el propóleo estudiado. 

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no tener conflicto de intereses.

Contribución por autor


María de Lourdes Delgado Aceves: desarrollo experimental, cálculos y redacción; Jesús Ángel Andrade Ortega: concepción y planeación del trabajo, gestión de recursos materiales y económicos, revisión de resultados de trabajo experimental, redacción y corrección del manuscrito y Carlos Alberto Ramírez Barragán: desarrollo experimental, revisión de resultados de trabajo experimental, redacción y corrección del documento.

Agradecimientos

Los autores desean expresar al Mtro. Rafael Ordaz Briseño por las facilidades otorgadas en el muestreo de propóleo en el apiario del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara.

Referencias

- Arrate, L. 2008. Propóleo, el "antibiótico" natural de la colmena. *Sustrai: Revista Agropesquera* 85:56-61.
- Asís, M. 1991. Propóleo, el oro púrpura de las abejas. Centro de Información y Documentación Agropecuario (CIDA). La Habana, Cuba. 255 p.
- Banskota, A. H., Y. Tezuka and S. Kadota. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research* 15 (7):561-571.
- Bedascarrasbure, E., L. Maldonado, A. Álvarez y E. Rodríguez. 2004. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleos Argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 23 (3):369-372.
- Bracho, J. 2003. Calidad de propóleos de origen argentino. I. Propiedades organolépticas. *Vida Apícola* 118:52-59.
- Cai, R., S. Wang, Y. Meng, Q. Meng and W. Zhao. 2012. Rapid quantification of flavonoids in propolis and previous study for classification of propolis from different origins by using near infrared spectroscopy. *Analytical Methods* 4:2388-2395.
- Catalin, M. A., F. Soponar and C. Sárbu. 2010. Multivariate analysis of reflectance spectra from propolis: Geographical variation in Romanian samples. *Talanta* 81 (3):1010-1015.

compounds with combined rings and a great amount of double links, such as the flavonoid type of molecules have, which have a unique fluorescent emission spectrum. About the analysis by FTIR, the spectra revealed almost the total representative signals of the chemical groups of phenols and flavonoids, which is an indicator of such compounds of the studied propolis. 

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Contribution by author

María de Lourdes Delgado Aceves: experimental development, calculations and writing of the manuscript; Jesús Ángel Andrade Ortega: original idea and planning of the work, negotiation of material and financial resources, review of experimental results, writing and correction of the manuscript; Carlos Alberto Ramírez Barragán: experimental development, review of results of the experimental work, writing and correction of the manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Mtro. Rafael Ordaz Briseño for the provided facilities for the collection of propolis in the apiary of the Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara.

End of the English version



- Choi, Y. M., D. O. Noh, S. Y. Cho, H. J. Suh, K. M. Kim and J. M. Kim. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology* 39 (7):756-761.
- Cruz, C., A. Cavaco, R. Guerra, D. Antunes, H. Guia and M. Graca. 2008. A First Approach to the Optical and Antioxidant Properties of Propolis Collected at Different Sites of Algarve Region. In: World Scientific and Engineering Academy and Society (eds.). 4th IASME/WSEAS International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development (EEESD'08), June 11-13. Algarve, Portugal. pp. 532-536.
- Cupull-Santana, R. D., R. Cortés-Rodríguez, E. E. Olazábal-Manso y C. A. Hernández-Medina. 2013. Actividad antifúngica de propóleos obtenidos en tres provincias de Cuba sobre hongos contaminantes en cultivos de tejidos vegetales. *Acta Universitaria* 23 (6):3-9.
- Farré, R., I. Frasquet and A. Sánchez. 2004. Propolis and human health. *Ans Pharmaceutica* 45(1): 21-43.
- Hacura, A. and B. Zimnicka. 2006. An Investigation of Molecular Structure and Dynamics of Crude Beeswax by Vibrational Spectroscopy. *Polish Journal of Environmental Studies* 15 (4A):112-114.

- Li-Chan, L., C. Yue-Wen and C. Cheng-Chun. 2005. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 102 (2): 213-220.
- Londoño, A., J. Penieres, C. García, L. Carrillo, M. Quintero, S. García, M. Mendoza y T. Cruz. 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en Marcha* 21 (1):49-55.
- Lotti, C., M. Campo F., A. L. Piccinelli, O. Cuesta-Rubio, I. Márquez H. and L. Rastrelli. 2010. Chemical constituents of red Mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (4):2209-2213.
- Manrique, A. J. 2006. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia Tropical* 24 (1):43-53.
- Marcucci, M. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26 (2):83-99.
- Martínez, J. G., C. García P., D. Durango R. y J. Gil G. 2012. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Revista MVZ Córdoba* 17 (1):2861-2869.
- Mihai, C. M., L. A. Marghitas, D. S. Dezmirean, F. Chirila, R. F. A. Moritz and H. Schlüns. 2012. Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 110 (1):68-72.
- Mok-Ryeon, A., S. Kumazawa, Y. Usui, J. Nakamura, M. Matsuka, F. Zhu and T. Nakayama. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry* 101 (4):1383-1392.
- Palomino G., L. R., J. P. Martínez G., C. M. García P., J. H. Gil G. y D. L. Durango R. 2010. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 63 (1):5373-5383.
- Peña, R. C. 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e Investigación Agraria* 35 (1):17-26.
- Salamanca, G., I. L. Correa y J. Principal. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical* 25 (2):95-102.
- Shimizu, K., H. Ashida, Y. Matsuura and K. Kanazawa. 2004. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 424 (2):181-188.
- Singleton, V. L. and J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-58.
- Vargas, R., G. Torrescano y A. Sánchez. 2013. El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia* 38 (10):705-711.
- Woisky, R. and A. Salatino. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37 (2):99-105.
- Yaghoubi, S. M. J., G. R. Ghorbani, Z. S. Soleimanian and R. Satari. 2007. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 15 (1):45-48.
- Yan-Wen, W., S. Su-Qin, J. Zhao, Y. Li and Q. Zhou. 2008. Rapid discrimination of extracts of Chinese propolis and poplar buds by FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 883-884:48-54.

