



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DOCTORAL

**Evaluación de compuestos bioactivos y propiedades funcionales
durante la digestión *in vitro* simulada de emulsiones con
extractos de propóleos**

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M en A. Lucio González Montiel

Director

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Co-Directora

Dra. Elizabeth Pérez Soto

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., noviembre de 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DOCTORAL

Evaluación de compuestos bioactivos y propiedades funcionales durante la digestión *in vitro* simulada de emulsiones con extractos de propóleos

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M en A. Lucio González Montiel

Director

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Co-Directora

Dra. Elizabeth Pérez Soto

Asesores

Dra. Gabriela Medina Pérez

Dra. Ana Cristina Oliveira Lopes Figueira

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., noviembre de 2023

07/11/2023

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

El Comité Tutorial del **PROYECTO TERMINAL O TESIS** del programa educativo de posgrado titulado **"Evaluación de compuestos bioactivos y propiedades funcionales durante la digestión *in vitro* simulada de emulsiones con extractos de propóleos"**, realizado por el sustentante **Lucio González Montiel** con número de cuenta 099432 perteneciente al programa de **Doctorado en Ciencias Agropecuarias**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

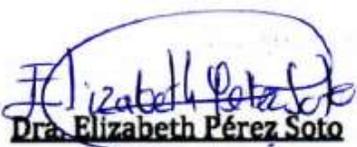
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

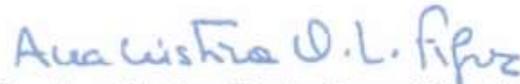
Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"
Tulancingo, Hgo., a 7 de noviembre de 2023

El Comité Tutorial


Dr. Gabriel Aguirre Álvarez
Director


Dra. Elizabeth Pérez Soto
Co-Directora


Dra. Ana Cristina Oliveira Lopes Figueira
Asesora


Dra. Gabriela Medina Pérez
Asesora

Agradecimientos

Especialmente al Dr. Rafael German Campos Montielt, por la confianza, el respeto, los conocimientos y habilidades aprendidos. En verdad muchas, muchas gracias. Y en efecto se logró todo en los tiempos establecidos.

Química Maribel López Tolentino y Claudia en verdad gracias por todo el apoyo, sin duda su labor en el ICAp hace que los estudiantes podamos avanzar y concluir los proyectos de investigación en tiempo y forma.

Dr. Uriel González Lemus y Dr. José Jesús Espino García. Creo que el Dr. Campos no se equivocó al decir que hemos sido su mejor equipo de trabajo. Yo si lo creo, y fue muy chido trabajar con ustedes, la estancia académica fue aún mejor. Espero poder seguir colaborando con esa entrega y lo más importante mantener esa buena amistad.

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez gracias por todo el apoyo en la recta final de esta investigación.

Dra. Elizabeth Pérez Soto, gracias por algunas razones; codirectora de tesis (por las correcciones, el apoyo y recordándome muchas cosas que debía cumplir), por esa amistad que nos ha mantenido unidos por años, y por el gran afecto que nos tenemos.

Dra. Gabriela Medina Pérez y Dra. Ana Cristina Oliveira Lopes Figueira, gracias por el tiempo dedicado a la revisión de esta investigación y muchas gracias por las observaciones realizadas.

Mención muy especial a mi **FAMILIA**, muchas veces he dudado y en algunas ocasiones casi pierdo el camino, sin embargo, ustedes "**TODOS**" son ese impulso para recordar y poner los pies en el suelo. El amor que les tengo no tiene límites.

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el contenido de compuestos bioactivos y propiedades funcionales durante la digestión *in vitro* simulada de emulsiones con extractos de propóleos provenientes de tres municipios de la cañada oaxaqueña. Etapas de la investigación: 1) Para dar inicio a la fase experimental, se obtuvieron extractos de propóleos por dos técnicas de extracción (Maceración y Ultrasonido), los extractos puros fueron caracterizados en cuanto al contenido de compuestos fenólicos (fenoles totales y flavonoides totales) y propiedades funcionales (actividad antimicrobiana y actividad antioxidante DPPH⁺ y ABTS⁺), además se evaluó su comportamiento durante la digestión *in vitro* simulada. Se obtuvieron excelentes rendimientos (63.8 al 71.5 %), el contenido de fenoles totales fue de 30,824 a 34,406 mg EAG/100 g de propóleo y el contenido de flavonoides totales fue de 2,859 a 19,523 mg EQ/100 g de propóleo, dichos resultados son superiores a los recomendados por la normatividad mexicana, así como diversas investigaciones reportadas en diferentes muestras de propóleos. Los extractos de propóleos por el método ABTS⁺ y DPPH⁺ presentaron una fuerte actividad antioxidante, siendo de 8,333.2 a 16,530.2 y 13,368.3 a 20,706.4 mg EAG/100 g respectivamente. Es importante destacar que durante la digestión *in vitro* simulada el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante se vio afectada. Para evitar el daño de los compuestos bioactivos y propiedades funcionales del propóleo, se llevó a cabo la segunda parte de esta investigación. Se obtuvieron extractos etanólicos por la técnica de ultrasonido, los cuales fueron utilizados para la elaboración de emulsiones, se determinó la eficiencia de emulsión, estabilidad, contenido de compuestos bioactivos (fenoles totales y flavonoides totales) y actividad antioxidante de emulsiones durante su almacenamiento a 4°C, y su comportamiento durante la digestión *in vitro* simulada. Con base al contenido de fenoles totales, se obtuvo una eficiencia de emulsión del 87.8 al 97.8%. El tamaño de partícula de las emulsiones fue del 322.5 a 463.9 nm, con un potencial Zeta de -31.5 al -28.2 mV y una conductividad eléctrica del 22.7 al 30.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$, estos resultados indican una buena estabilidad de emulsión. Durante la digestión *in vitro* simulada, el contenido de compuestos bioactivos (fenoles totales, flavonoides totales) y la actividad antioxidante no presentó diferencia significativa durante los 77 días de almacenamiento a 4°C. Se concluye que el proceso de emulsión, cumple con la función de proteger a los compuestos bioactivos y por consiguiente su actividad biológica.

Palabra clave: Fenoles totales, Flavonoides totales, Actividad antioxidante, ABTS, DPPH, Propóleos

Abstract

The objective of the present investigation was to evaluate the content of bioactive compounds and functional properties during the simulated *in vitro* digestion of emulsions with propolis extracts from three regions of Oaxacan area of La Cañada. Research stages: 1) Propolis extracts: Obtained by two extraction techniques (Maceration and Ultrasound), the pure extracts were characterized in terms of the content of phenolic compounds (total phenols and total flavonoids) and functional properties (antimicrobial activity and antioxidant activity DPPH⁺ and ABTS⁺), in addition, the functionality of extracts was evaluated during simulated *in vitro* digestion. Excellent yields were obtained (63.8 to 71.5%), the total phenol content was 30,824 to 34,406 mg EAG/100 g of propolis and the total flavonoid content was 2,859 to 19,523 mg QE/100 g of propolis, these results are higher than those recommended by Mexican regulations, as well as several reports found same amounts on different propolis samples. The propolis extracts measured by the ABTS⁺ and DPPH⁺ methods had antioxidant activity: 8,333.2 to 16,530.2 and 13,368.3 to 20,706.4 mg AGE/100 g respectively. During the simulated *in vitro* digestion, the content of bioactive compounds and antioxidant activity was affected. 2) Protecting the functional properties of propolis extracts: Ethanolic extracts were obtained by ultrasound, with which emulsions were prepared. Emulsion efficiency, stability, content of bioactive compounds (total phenols and total flavonoids), and antioxidant activity were determined during storage of 77 days at 4° C, as well as its behavior during simulated *in vitro* digestion. Based on the total phenol content, it was measured with an emulsification efficiency of 87.8 to 97.8%. The particle size of the emulsions was 322.5 to 463.9 nm, with a Zeta potential of -31.5 to -28.2 mV and an electrical conductivity of 22.7 to 30.6 μS/cm; these results indicate good emulsion stability. During simulated *in vitro* digestion, the content of bioactive compounds (total phenols, total flavonoids) and antioxidant activity did not present a significant difference during the 77 days of storage at 4°C. It was concluded that the emulsion process fulfills the function of protecting the bioactive compounds and, therefore, their biological activity.

Keywords: Total phenols, Total flavonoids, Antioxidant activity, ABTS, DPPH, Propolis

Índice

1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Propóleos	3
2.1.1 Composición química de propóleos	4
2.1.2 Factores que afectan la composición química de los propóleos	11
2.1.3 Propiedades biológicas del propóleo	13
2.2 Proceso digestivo	17
2.2.1 Digestión de alimentos en humanos	17
2.2.2 Digestión <i>in vitro</i> simulada	19
2.2.3 Digestión <i>in vitro</i> simulada en un modelo estático	19
2.3 Protección de compuestos bioactivos	22
2.3.1 Encapsulación	23
2.3.2 Métodos de encapsulación	25
2.3.3 Encapsulado de propóleos	29
3. Justificación	32
4. Hipótesis	33
5. Objetivos	33
5.1 Objetivo general	33
5.2 Objetivos específicos	33
6. Materiales y métodos	34
6.1 Localización de experimento	34
6.2 Muestras	34
6.3 Etapas de la investigación	34
6.3.1 Etapa 1 de la investigación	35
6.3.2 Etapa 2 de la investigación	38
6.4 Determinación de compuestos bioactivos	40
6.5 Actividad antioxidante	42
6.6 Actividad antimicrobiana de extractos de propóleos	43
6.7 Análisis de estadístico	44

7. Resultados y Discusión	45
7.1 Obtención de extractos	45
7.1.1 Rendimiento	45
7.2. Comportamiento de compuestos bioactivos durante la digestión <i>in vitro</i>	46
7.2.1 Fenoles totales	46
7.2.2 Flavonoides totales	48
7.3 Actividad antioxidante durante la digestión <i>in vitro</i>	50
7.4 Actividad antimicrobiana	51
7.5 Obtención de extractos por ultrasonido	53
7.6. Caracterización y estabilidad de emulsiones	55
7.6.1 Eficiencia de emulsión	55
7.6.2 Tamaño de partícula	56
7.6.3 Potencial <i>Zeta</i>	57
7.6.4 Conductividad eléctrica	59
7.7 Comportamiento de compuestos bioactivos durante la digestión <i>in vitro</i> de las emulsiones	60
7.7.1 Fenoles totales	60
7.7.2 Flavonoides totales	61
7.8 Actividad antioxidante durante la digestión <i>in vitro</i> de las emulsiones	62
8. Conclusiones	64
9. Bibliografía	65
10. Anexo	84

Índice de tablas

Tabla 1. Composición química de propóleos crudo	5
Tabla 2. Encapsulado de propóleos de diversas partes del mundo	28
Tabla 3. Procedencia y condiciones para la obtención de extractos de propóleos	35
Tabla 4. Comportamiento de los fenoles totales durante la digestión <i>in vitro</i> de diferentes extractos de propóleos	46
Tabla 5. Comportamiento de los flavonoides totales durante la digestión <i>in vitro</i> de diferentes extractos de propóleos	48
Tabla 6. Actividad antioxidante de extractos de propóleos y su comportamiento durante la digestión <i>in vitro</i>	50
Tabla 7. Contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de extractos de propóleos provenientes de tres municipios de la cañada oaxaqueña	54
Tabla 8. Contenido de fenoles totales y flavonoides totales durante la digestión <i>in vitro</i> simulada de emulsiones con extractos de propóleos	60
Tabla 9. Actividad antioxidante durante la digestión <i>in vitro</i> simulada de emulsiones con extractos de propóleos	63

Índice de figuras

Figura 1. Características que deben presentar los propóleos.	4
Figura 2. Factores que afectan la producción de propóleo.	11
Figura 3. Propiedades biológicas del propóleo.	14
Figura 4. Mecanismos de acción del propóleo, contra virus, hongos y parásitos.	15
Figura 5. Aparato digestivo en humanos; partes y funciones.	18
Figura 6. Proceso de digestión <i>in vitro</i> simulada en modelo estático.	21
Figura 7. Etapas de la fase experimental.	34
Figura 8. Rendimiento de extractos de propóleos, provenientes de tres municipios de la Cañada oaxaqueña y dos métodos de extracción.	45
Figura 9. Actividad inhibitoria de extractos de propóleos contra diferentes cepas microbianas. A) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 13709), B) <i>Candida albicans</i> (ATCC 1023), C) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) y D) <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 43971).	52
Figura 10. Estabilidad del tamaño de gota (nm) de emulsiones con extracto de propóleos, durante su almacenamiento durante 77 días a 4 °C.	57
Figura 11. Potencial Z (mV) de emulsiones con extracto de propóleos, durante su almacenamiento durante 77 días a 4 °C.	58
Figura 12. Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) de emulsiones con extracto de propóleos, durante su almacenamiento durante 77 días a 4 °C.	59

1. Introducción

Durante las últimas décadas, se ha incrementado el interés por el estudio, caracterización, uso y aplicación de productos naturales, principalmente por los beneficios que estos aportan a la salud. El propóleo es considerado una sustancia natural, resinosa, que procesan las abejas (*Apis mellifera*), a partir de secreciones de yemas, tallos y corteza de una gran diversidad de plantas, arbustos y árboles. Estas secreciones resinosas son mezcladas por las abejas, con cera, polen y enzimas, obteniendo un material de aspecto pegajoso, gomoso y balsámico, de diferentes tonalidades de color, que van del color amarillo, verde, rojo, marrón al negro (Zulhendri et al., 2021; NOM, 2017; Huang et al., 2014). Presenta un sabor fuerte, aromático, amargo y picante.

La composición fisicoquímica del propóleo, depende de diversos factores, tales como: la vegetación, tipo de floración, especie de abejas, época del año, zona geográfica, así como las condiciones climático-ambientales (Irigoiti et al., 2021; Mountford-McAuley et al., 2021). En general, el propóleo está compuesto por 50 % de resinas, 30 % de cera, 10 % de aceites esenciales, 5 % polen y 5 % de otros compuestos orgánicos, denominados compuestos bioactivos (Huang et al., 2014).

Dentro de los compuestos bioactivos en el propóleo, se han identificado 300 aproximadamente, entre los cuales encontramos: compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides), ácidos aromáticos, alifáticos y sus ésteres, terpenos, taninos, lignanos, carbohidratos, vitaminas, enzimas y minerales (Hossain et al., 2022; Giampieri et al., 2022; Salatino y Salatino 2021). Durante muchos años, el propóleo ha sido utilizado para el tratamiento de diferentes enfermedades (Kasote et al., 2022), debido a sus propiedades benéficas para la salud, tales como; antioxidantes, antimicrobianos (antibacteriano, antifúngico, antihelmíntico y antiviral), antiinflamatorios, inmunomoduladores, hepatoprotectores, anti-actividades alérgicas, cicatrizantes, antitumorales, antidiabéticas, entre otras (Kasote et al., 2022; Nandre et al., 2021; Irigoiti et al., 2021; Zulhendri et al., 2021).

Saliba et al. (2023); Alencar et al., (2023), enfatizan que muchos de los compuestos bioactivos presentes en extractos de propóleos, pueden afectarse durante la digestión *in vitro* simulada principalmente por las condiciones gastrointestinales, provocando una isomerización e hidrólisis de

los compuestos fenólicos, disminuyendo sus propiedades biológicas. Por lo antes mencionado, se han desarrollado metodologías para la protección de los compuestos bioactivos de extractos de propóleos, que van desde la encapsulación, microencapsulación, emulsiones, microemulsiones y nanoemulsiones, haciendo uso de diferentes agentes de protección, entre los que destacan: dextrinas, maltodextrinas, gomas, almidones, almidones modificados, proteínas, alginatos, aceites, carbohidratos, polímeros, entre otros (Ligarda-Samanez et al., 2023; Jansen-Alves et al., 2023; Alencar et al., 2023; Saliba et al., 2023; Shakoury et al., 2022; Baysan et al., 2021).

Por lo antes mencionado, el objetivo general de la presente investigación fue evaluar el contenido de compuestos bioactivos y propiedades funcionales durante la digestión *in vitro* simulada de emulsiones con extractos de propóleos provenientes de tres municipios de la cañada oaxaqueña.

2. Marco teórico

2.1 Propóleos

La palabra propóleo se deriva del griego *pro* que significa “en la entrada de” y *polis* “ciudad”, es una sustancia que se utiliza para defender la colmena (Hossain et al., 2022; Aminimoghadamfarouj y Nematollahi, 2017; Zabaïou et al., 2017). También recibe el nombre de pegamento de las abejas (Salatino et al., 2021). De acuerdo a la NOM (2017), se le conoce como propóleo a las sustancias resinosas recolectadas y procesadas por las abejas de la vegetación circundante al apiario. De aspecto resinoso, su color puede variar dependiendo de su origen desde el rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro (Pobiega et al., 2019), con sabor amargo y ligeramente picante. Salatino et al. (2021), Anjum, (2019), Veiga et al. (2017) y Zabaïou et al. (2017) mencionan que el propóleo es una sustancia natural recolectada por las abejas melíferas (obreras) de diversas secreciones resinosas de plantas; tales como: árboles, arbustos, matorrales, secreciones de coníferas, gomas, resinas, mucílago, yemas de los árboles y salvia. Las abejas obreras son las responsables de recolectar estas sustancias resinosas y de mezclarlas con secreciones salivales, enzimas y cera (Anjum, 2019; Gardini et al., 2018). Las abejas suelen utilizar esta mezcla para sellar cualquier grieta o hendidura en la colmena de esta manera se evita la entrada de agentes extraños (bióticos y abióticos), para suavizar las paredes internas de la colmena, mantener la humedad y temperatura estable dentro de la colmena, antiséptico para prevenir infecciones microbianas causadas por mohos, levaduras y bacterias, es utilizado para momificar insectos o pequeños animales invasores muertos que son demasiado pesado para que las abejas los puedan retirar, entre otros (Giampieri et al., 2022; Hossain et al., 2022; Huang et al., 2014).

El color del propóleo puede variar, ya que esta propiedad está en función de la zona geográfica y tipo de planta. Además, los propóleos de clima templado son ligeramente diferentes a los propóleos cosechados en climas tropicales (Dantas et al., 2017). A baja temperatura presenta una consistencia dura y si es congelado es muy quebradizo, mientras que a altas temperaturas es blando, maleable y muy pegajoso (Zabaïou et al., 2017). En la figura 1, se muestran las características que deben presentar los propóleos que se producen y/o comercializan en México, de acuerdo a la Norma Oficial

Mexicana (NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento):

Físicas	Color. Rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro
	Aroma. Resinoso o balsámico
	Sabor. Variable (Suave balsámico a fuerte y picante)
	Consistencia. Maleable o rígido (Según la temperatura)
Químicas	Flavonoides. Deben estar presentes
	Fenoles totales. Deben estar presentes
	Índice de oxidación. Máximo 22 segundos
	Compuestos fenólicos. EAG, mínimo 5% (peso/peso)
	Flavonoides. EQ, mínimo 0.5% (peso/peso)
	Actividad antioxidante. (CA50) Mínimo 100 µg/mL
Actividad antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC)
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC) y
	<i>Candida albicans</i> (ATCC)
	Cualquier otra cepa con referencia (ATCC)

EAG = Equivalente Ácido Gálico, EQ = Equivalente Quercetina

Figura 1. Características que deben presentar los propóleos. (Fuente: Elaboración propia, 2023).

2.1.1 Composición química de propóleos

La composición química de los propóleos es muy variable y compleja. Sin embargo, se ha reportado que estas sustancias están compuestas por; 50% de resina y bálsamo vegetal, 30% de cera de abeja,

10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen, y 5% de otros compuestos orgánicos, denominados compuestos bioactivos. Dentro de los compuestos bioactivos, se han identificado aproximadamente 300, entre los cuales encontramos: compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides), ácidos aromáticos, alifáticos y sus ésteres, terpenos, taninos, lignanos, carbohidratos, vitaminas, enzimas y minerales (Hossain et al., 2022; Giampieri et al., 2022; Salatino y Salatino 2021; Anjum et al., 2019). En tabla 1, se presenta una revisión sobre la composición química de propóleos.

Tabla 1. Composición química de propóleos crudo.

Grupo	Compuestos químicos
Ácido benzoico y derivados	Ácido benzoico, ácido salicílico, ácido gentísico, ácido gálico, éster fenilmetílico del ácido benzoico, éster fenilmetílico del ácido salicílico, benzoato de trans-coniferilo, benzoato de trans-p-cumarilo, ácido protocatecuico
Derivados de benzaldehído	Vainillina, aldehídos caproicos, isovanillina p-hidroxibenzaldehído, protocatechualdehído
Alcohol cinámico, ácido cinámico y derivados	Alcohol cinámico, ácido hidrocaféico, ácido isoferúlico, éster metil del ácido cinámico, éster etil del ácido cinámico, Cinamilacetato, ácido cafeico, ácido ferúlico.
Hidrocarburos alifáticos	Eicosina, 1-octadeceno, tricosano, pentacosano, eicosano, heneicosano
Azúcar	D-ribofuranosa, D-fructosa, sorbitol, D-gulosa, talosa, sacarosa, fructofuranosa-1, fructofuranosa-2, galactotil, ácido glucónico, ácido galacturónico, 2-O-glicerilgalactosa.
Vitaminas	B1, B2, B6, C, E
Chalconas y dihidrochalconas	Alpinetina, naringina, pinobanksina, 3-acetato de pinobanksina, pinostrobin, pinocebrina, sakuranetina, 2',6',a-trihidroxio-4'-metoxi, 2',6',dihidroconeo-4'-metoxi-dihidro, 4',6-trihidroxidihidro.
Ésteres	Palmitato de metilo, cinamil-trans-4-cumarato, palmitato de etilo, éster metílico del ácido esteárico, éster de ftalato, benzoato de bencilo, trans-4-cumarato de bencilo, isoferulato de 3-metil-3-butenilo, isoferulato de 3-metil-2-butenilo, Cafeato de 3-metil-3-butenilo, cafeato de 2-metil-2-butenilo, cafeato de 3-metil-2-butenilo, cafeato de bencilo, cafeato de feniletilo, cafeato de cinamilo, cafeato de tetradecilo, cafeato de

	tetradecenilo, cafeato de tetradecenilo (isómero), cafeato de tetradecanilo, cafeato de hexadecilo
Otros ácidos y derivados	Éster fenilmetílico del ácido 14-metilpentadecanoico, éster etílico del ácido palmítico, Ácido mirístico, Ácido sórbico, éster butil-2-metilpropílico del ácido ftálico, ácido esteárico, éster metílico del ácido acústico
Alcohol, cetonas, fenoles y compuestos heteroaromáticos	Alcohol bencílico, acetato de hexadecanol, cumarina, pterostilbeno, xantorreaol, escopoletol
Terpenos, sesquiterpenos, alcohol y derivados	Geraniol, neroleol, β -bisabolol, guaiol, farnisol, Dihydroeudesmol, α -acetoxibetulenol
Esteroles e hidrocarburos esteroides	Colestrileno, colinasterol, estigmasterol, β -dihidrofucosterol, lanosterol, colesterol
Minerales	Sr, Ba, Cd, Sn, Pb, Ti, Ag, Co, Mo, Al, Si, V, Ni, Mn, Cr, Na, Mg, Cu, Ca, Zn, Fe, K
Enzimas	Glucosa-6-fosfatasa, fosfatasa ácida, adenosina trifosfatasa, deshidrogenasa succínica
Cetonas	Acetofenona, p-acetofenolacetofenona, metilacetofenona, Hept-5-en-2-ona, 6-metilcetona
Ácidos cerosos	Archídico, behénico, cerótico, láurico, linoleico, lignocérico, montánico
Ácidos alifáticos y ésteres alifáticos	Acético, angélico, butírico, crotónico, fumárico, isobutírico, metilbutírico, Acetato de isobutilo, Acetato de isopentilo, Acetato de isopentinilo
Alcohol	Metanol de benceno, alcohol cinámico, glicerol, α -glicerofosfato, alcohol fenético, isobutenol, hidroquinona, alcohol prenílico
Ácidos alifáticos	Láctico, hidroxiacético, málico, 5-hidroxi-n-valérico, 2,3-dihidroxi-propanoico, pentónico-2-desoxi-3,5-dihidroxi- γ -lactona, pentónico-2-desoxi-3,5-dihidroxi- γ -lactona (isómero), succínico, 2,3,4,5-tetrahidroxipentanoico 1,4-lactona, 2,3,4,5-tetrahidroxipentanoico 1,4-lactona (isómero), nonanoico, palmítico, oleico, decanoico, dodecanoico, tetradecanoico, heptadecanoico, octadecenoico, tetracosanoico, eicosanoico, hexacosanoico, 2-Hidroxihexacosanoico

Otros compuestos	Ácido fosfórico, 1,4-Dihidroxibenceno, 4-Hidroxi-benzaldehído, 4-Hidroacetofenona, 1,2,4-trihidroxibutano, 1,2,3-trihidroxibutanal, 1,2,3-trihidroxibutanal (isómero), miristicina, 2,4-bis(dimetilbencil)-6-t-butil fenol, 1,8-dihidroxi-3-metil antraquinona, miristicina (isómero)
-------------------------	---

Fuente: (Basado en: Hossain et al., 2022; Kasote et al., 2022; Anjum et al., 2019).

A continuación, se describen algunos de los compuestos bioactivos más abundantes en los propóleos:

- **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos, son considerados metabolitos secundarios, son muy abundantes en las plantas, los cuales son utilizados como mecanismo de defensa, ante el ataque de microorganismos, plagas o cualquier organismo que pueda alterar el metabolismo de las plantas. El contenido y composición de compuestos fenólicos en los propóleos es muy variable, debido a diversos factores, uno de ellos es el tipo de planta donde las abejas recolectan los exudados que van a ser procesados hasta la obtención del propóleo (Mountford-McAuley et al., 2021). Estos compuestos presentan excelente actividad antioxidante debido a su capacidad antiradical, así como actividad antimicrobiana (Cui et al., 2022; Hudz et al., 2020). Por ejemplo, el propóleo verde de Brasil, es rico en ácido cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y sus derivados, dichos compuestos están fuertemente relacionados con la actividad antimicrobiana de los propóleos Huang et al. (2014). Por otra parte, en Kenia se han reportado dos estilbenos, el schweinfurthin A y schweinfurthin B. Otro grupo de interés han sido los lignanos presentes en propóleos de color marrón, debido a su gran capacidad antioxidante con potencial actividad anticancerígena, estos lignanos se encuentran principalmente en propóleos de zonas tropicales como las Islas Canarias, Kenia, Chile y Brasil.

- **Flavonoides**

En la actualidad, se han reportado más de 150 flavonoides presentes en propóleos (Huang et al., 2014). Son los principales componentes del propóleo y se relacionan con las propiedades farmacológicas, debido a la capacidad para eliminar radicales libres, y su efecto protector ante el proceso oxidativo de lípidos y la vitamina C (Zabaiou et al., 2017; Hernández et al., 2018; Sun et al.,

2016), además de sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, anticancerígenas, entre otras (Cui et al., 2022; Nichitoui et al., 2021; Tlak et al., 2017). Se han dividido en diversos grupos tales como: las flavanonas, flavonas, flavonoles, flavanonoles, chalconas, dihidrochalconas, isoflavonas, isodihidroflavonas, flavanas, isoflavanas y neoflavonoides (Zabaiou et al., 2017). En muy raras ocasiones se ha podido encontrar glucósidos flavonoides como la rutina (quercetina-3-O-rutinósido), isorhamnetina-3-O-rutinósido, flavona-C-glucósido y glucósidos de luteolina y naringenina (Huang et al., 2014). Estos componentes se han podido identificar en propóleos de diferentes partes del mundo, y normalmente su contenido es variable, ya que dependen del tipo de planta y origen geográfico.

Las flavanonas, consideradas uno de los grupos más importantes perteneciente a los flavonoides, actualmente, se han podido identificar más de 40 en propóleos de diversas partes del mundo. La pinocembrina, pinostrobinina, la naringenina, la sakuranetina, la isosakuranetina y la liquiritigenina se encuentran presentes en propóleos de Europa, China, Asia no tropical y América del Norte. Sin embargo, hay algunas flavononas que sólo se han encontrado en ciertos lugares, por ejemplo, los derivados de geraniiflavanona en propóleos de Japón, el solofenol y la soforaflavanona A en las Islas Salomón. Es importante destacar que las flavononas presentan excelente actividad antimicrobiana; antitripanosomal (Alenezi et al., 2020).

Las flavonas y flavonoles también es muy común encontrarlos en los propóleos, pero son menos abundantes que las flavanonas. Son ejemplos típicos de estas: la acetina, apigenina, crisina, tectocrisina, galangina, izalpinina, quercetina y kaempferol, y con menor frecuencia la fisetina o pectolinarigenina. Por otro lado, la macarangina es un flavonol que sólo se ha reportado en propóleos de Kenia. De acuerdo a su estructura química, estos flavonoides presentan excelente actividad antioxidante (Cui et al., 2022; Wieczorek et al., 2022).

De acuerdo con Santos-Buelga y González-Paramás (2017) las isoflavonas e isodihidroflavonas son flavonoides reportados ampliamente en propóleos de Brasil y Cuba, provenientes de leguminosas, pero en Europa rara vez se han reportado. La daidzeína, formononetina, xenognosina B, vestitona y calicosina son ejemplos típicos de este grupo.

En propóleos rojos de Brasil, se han reportados isoflavanas como el vesitol, mucronulatol y noevestiol, además se ha reportado excelente actividad antifúngica (Cui et al., 2022). En propóleos de Nepal se identificaron 14 neoflavonoides únicos de cadena abierta, de hecho, se han utilizado como marcadores químicos en la autenticación de estos propóleos (Funakoshi-Togo et al., 2015). Por último, las chalconas son precursores biosintéticos de los flavonoides presentes en plantas comestibles, las cuales presentan efecto citotóxico y quimioproláctico (Cui et al., 2022), se han reportado en muestras de propóleos de provenientes de álamo y propóleos de Canadá, Brasil y Portugal (Santos-Buelga y González-Paramás, 2017).

- **Terpenos**

Los terpenos con compuestos volátiles y representan el 10% en los propóleos, son los responsables del aroma, así como de sus propiedades farmacológicas tales como: antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios, con potencial anticáncer, entre otras (Wieczorek et al., 2022; Graikou et al., 2016; Bankova et al., 2014; Huang et al., 2014). Los monoterpenos identificados en propóleos se clasifican en acíclicos, monocíclicos, dicíclicos y sus derivados. Dentro de los acíclicos y monocíclicos, tenemos al mirceno, *p*-mentanos y cineol, estos son muy aromáticos con olor a menta y trementina. Los monoterpenos dicíclicos se clasifican en: tujona (alcanfor), carane, pineno, fenchane y canfeno. Entre los diterpenos reportados en propóleos tenemos a la cembrano, ládano, abietano, pimarano y totarano, con un amplio espectro de propiedades farmacológicas, con importante actividad antibacteriana principalmente contra bacterias Gram + (Graikou et al., 2016). Mahamat et al. (2020) mencionan que la presencia de triterpenos en propóleos, es mayor en zonas tropicales y subtropicales.

- **Azúcares**

Se han reportado la presencia de azúcares en propóleos, sin embargo, su procedencia es incierta, algunas teorías apuntan a que su presencia se debe al néctar y la miel, o que provienen de flavonoides glucósidos (isorhamnetina-3-O-rutinósido y flavona-C-glucósido) (Huang et al., 2014), la glucosa es el azúcar más común y abundante en los propóleos (Zheng et al., 2017), además las resinas contienen diversos azúcares (Ahangari et al., 2018). En propóleos de la India se han encontrado diversos

azúcares; d-manosa, D-fructosa, α -D-glucopiranosido, α -D-glucofuranosa, α -d-glucopiranosil sulfato y β -d-galactopiranosido (Ismail et al., 2018; Ramnath et al., 2015).

- **Hidrocarburos**

En los últimos años, se han reportado diversos hidrocarburos en propóleos, tales como; alcanos, alquenos, alcadienos, monoésteres, diésteres, ésteres aromáticos, ácidos grasos y esteroides en diferentes tipos de propóleos. Bayram y Gercek (2017), reportan del 0.31 al 3.88% de hidrocarburos en muestras de propóleos de Turquía. El contenido de hidrocarburos en los propóleos no está relacionado con la proximidad geográfica del propóleo, ya que estos compuestos se originan del metabolismo de las abejas, por lo tanto, el tipo de hidrocarburos depende de factores genéticos de las plantas y no del origen floral (Bayram et al., 2018).

- **Minerales**

El contenido de minerales está directamente relacionado con el origen geográfico y botánico del propóleo, así como la humedad, tipo y pH del suelo (El Menyiy et al., 2021; Soós et al., 2019). Souza et al. (2016) mencionan que el contenido de minerales en los propóleos es muy variable y depende de la zona geográfica, la temporada y la forma de recolección del propóleo crudo. El Ca, K, Mg, Na, Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Ni, Sr y Zn, son los oligoelementos más reportados en propóleos, además de algunos elementos tóxicos como: As, Cd, Hg y Pb (Kasote et al., 2022; Hodel et al., 2020; Tosic et al., 2017; Huang et al., 2014). En los últimos años, el contenido de minerales en propóleos ha servido como un indicador del origen geográfico, o indicador de contaminación ambiental (Pb y Cd), así como para desarrollar métodos de trazabilidad (Hodel et al., 2020; González-Martín et al., 2015).

2.1.2 Factores que afectan la composición química de los propóleos

Existen diversos factores que pueden afectar la producción, calidad y composición fisicoquímica de los propóleos (Figura 2).

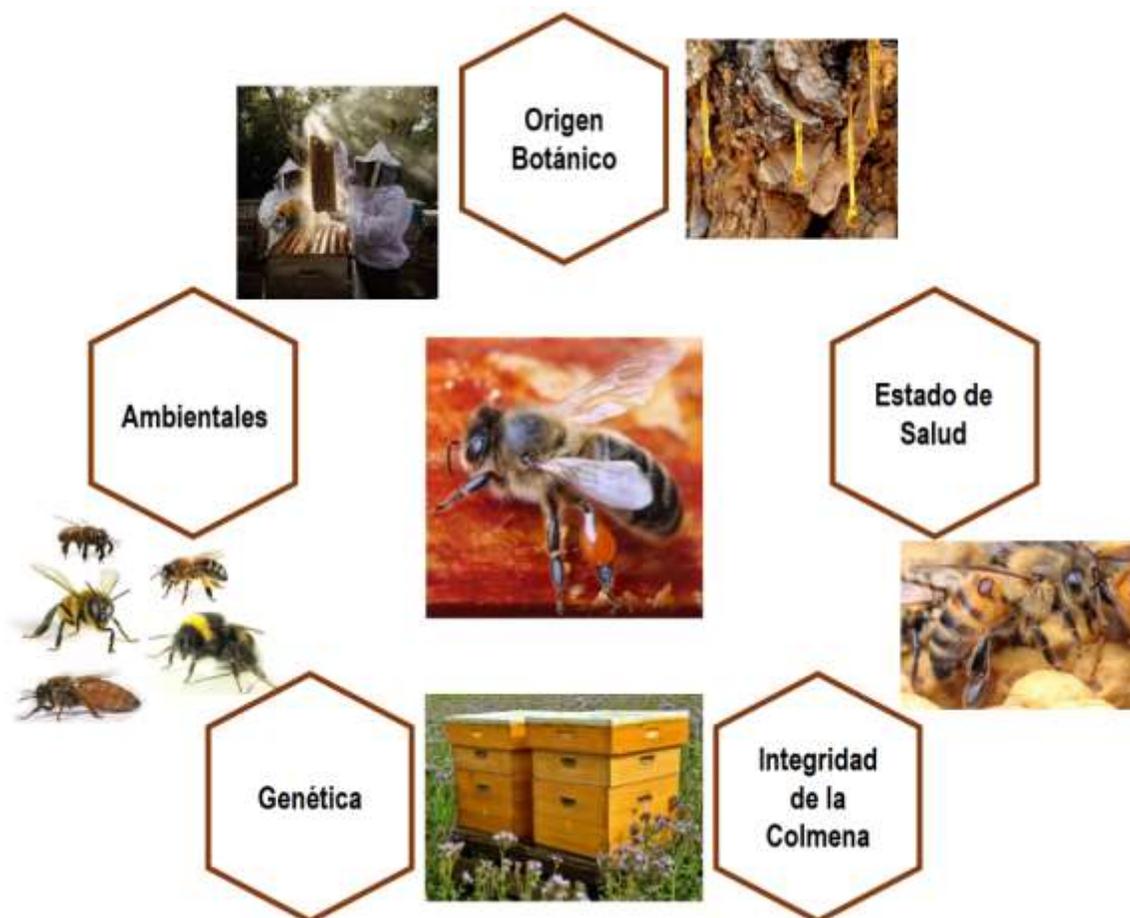


Figura 2. Factores que afectan la producción de propóleo. (Fuente: Elaboración propia, 2023).

Uno de estos factores es el origen botánico, debido a que las abejas son muy selectivas al momento de recolectar las resinas, elijen arboles específicos (Satori et al., 2021; Fernandes-Silva et al., 2020), esto indica que las abejas pueden detectar señales químicas en las superficies de las plantas, por consiguiente, recolectan resinas con mayor actividad biológica (Qiao et al., 2023; El Menyiy et al., 2021). Por otra parte, las abejas pueden recolectar resinas en arboles alejados de la colmena (Satori et al., 2021), afectando el rendimiento, es por ello que, en los últimos años, los apicultores han sembrado plantas adecuadas dentro del rango de vuelo de las abejas y así poder incrementar la

producción de propóleo (Salatino et al., 2021). A pesar de esto, se ha reportado excelente actividad biológica en propóleos de diferentes partes del mundo (Ribeiro et al., 2023; Nada et al., 2022; Alvear et al., 2021; Tomazzoli et al., 2020; Letullier et al., 2019).

Por otra parte, la genética de las abejas es un factor limitante en la producción de propóleos, las abejas melíferas (*Apis mellifera*), son las más abundantes a nivel mundial, sin embargo, estas se han adaptado a diversas condiciones climáticas, dando lugar a otras razas denominadas ecotípicas locales, entre las que podemos mencionar; *A. mellifera caucasica* (abeja del Cáucaso), *A. mellifera carnica* (abeja carniola), *A. mellifera ligustica* (abeja italiana), *A. mellifera anatoliaca* (abeja Turca), *A. mellifera* (abeja alemana negra), *A. mellifera scutellata* (Abeja africanizada y sus híbridos) (Mountford-McAuley et al., 2021). La recolección y uso de propóleos es variable, ya que algunas razas necesitan mayor cantidad de propóleo para mantener la estabilidad de la colmena, por lo tanto, no son ampliamente utilizadas a nivel comercial, por otra parte, algunas razas utilizan cantidades mínimas haciéndolas de gran interés industrial. Algunas razas tienen mayor atracción por cierto tipo de plantas, limitando así la recolección y rendimiento del propóleo. Kekeçoğlu et al. (2020) refieren que algunas características morfométricas de *Apis mellifera*, influyen en la capacidad de recolección de propóleos, siendo la probóscide, aspectos mandibulares, características de las alas (largo, ancho), longitud de tibia, fémur, entre otros. Además, se ha demostrado que las abejas que provienen de progenitores (abeja reina y zángano) altamente productores de propóleo, tienen mayor producción de propóleo dentro de la colonia, esto debido a una posible variación genética heredable (Mountford-McAuley et al., 2021; Garcia et al., 2013).

Mantener la integridad de la colmena es uno de los principales usos del propóleo, es por ello, que los apicultores han implementado diversas estrategias, con la finalidad de incrementar la producción de propóleo (Mountford-McAuley et al., 2021). Se ha demostrado que alteran el interior de la colmena (cortes asimétricos, superficie rugosa), las abejas incrementan la deposición de propóleo (Hodges et al., 2019). El uso de trampas estimuladoras de propóleos ha incrementado hasta un 30% la producción de propóleos, esto consiste en colocar mallas perforadas de plástico o aluminio, en el interior de la colmena (laterales y superior) (El-Sakhawy, 2023). Recientemente se ha demostrado que la utilización

de colmenas de poliestireno, madera y plástico presentan diferente rendimiento en la producción de propóleos, siendo mayor en la madera (Kiziltas y Erkan, 2020).

Los factores climático-ambientales juegan un papel importante en la producción de propóleos, diversas investigaciones refieren que la diversidad vegetal favorece la producción de propóleo (Ożarowski et al., 2022; Salatnaya et al., 2020; Maraschin et al., 2016), no se ha encontrado información referente a la relación de la temperatura con respecto a la producción de propóleo, sin embargo, durante la época de lluvia se obtienen propóleos de mejor calidad, debido a que las abejas tratan de proteger la colmena por lo tanto una mayor recolección de resina. A finales del otoño y a principios del invierno se incrementa la producción de propóleos (Mountford-McAuley et al., 2021).

Por otra parte, el estado de salud de las abejas influye directamente en la producción de propóleos, las abejas cuando están enfermas ellas mismas consumen propóleos para tratar sus enfermedades (Turcatto et al., 2018), por ejemplo, enfermedades transmitidas por bacterias hongos (*Paenibacillus*, *Ascosphaera apis* y *Nosema ceranae*), además cuando se detecta algún tipo de infección en la colmena, el número de recolectoras de resina aumenta considerablemente, de no ser así, la colmena podría colapsar (Mountford-McAuley et al., 2021).

2.1.3 Propiedades biológicas del propóleo

Existen múltiples investigaciones relacionadas con las propiedades biológicas de los propóleos en la figura 3, se presentan las más estudiadas y su relación con la salud (Zulhendri et al., 2021; Pasupuleti et al., 2017; Martinotti y Ranzato 2015).



Figura 3. Propiedades biológicas del propóleo. (Fuente: Elaboración propia, 2023).

A continuación, se describe la actividad antimicrobiana y antioxidante del propóleo.

- **Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana de los propóleos está relacionada con la composición fitoquímica de los propóleos, en la figura 4, se resumen los mecanismos de acción del propóleo contra bacterias, hongos, virus y parásitos.

La actividad antibacteriana del propóleo debe analizarse desde dos perspectivas (Bouchelaghem, 2022; Przybulek y Karpiński, 2019): 1) el efecto directo del propóleo sobre el microorganismo, afectando la permeabilidad de la membrana celular, alteración del potencial de membrana, disminución de la producción de ATP y movilidad, Anjum et al. (2019) refieren que los compuestos bioactivos del propóleos inhiben la síntesis de proteínas evitando así la reproducción bacteriana, se

inhibe la síntesis de la pared celular, además de provocar un colapso citoplasmático. Las evidencias revelan que se tiene mayor actividad contra bacterias Gram negativas en comparación con Gram positivas, ya que los compuestos bioactivos del propóleo inhiben enzimas importantes relacionadas con su metabolismo, así como contra bacterias aerobias y anaerobias. Por otra parte, 2) el efecto sobre el sistema inmunológico del individuo, activando las defensas naturales del organismo. Sin embargo, el efecto antibacteriano está directamente relacionado con algunos factores, tales como; el solvente de extracción (etanol, metanol, agua, dimetilsulfóxido (DMSO), diclorometano, hexano y fluidos supercríticos), concentración empleada, así como del contenido de compuestos bioactivos (contenido de compuestos fenólicos y flavonoides principalmente), la cual depende de la composición química del propóleos, época de recolección, región y especie de abeja, y esto puede variar en cada país (Hossain et al., 2022; Zuhendri et al., 2021).

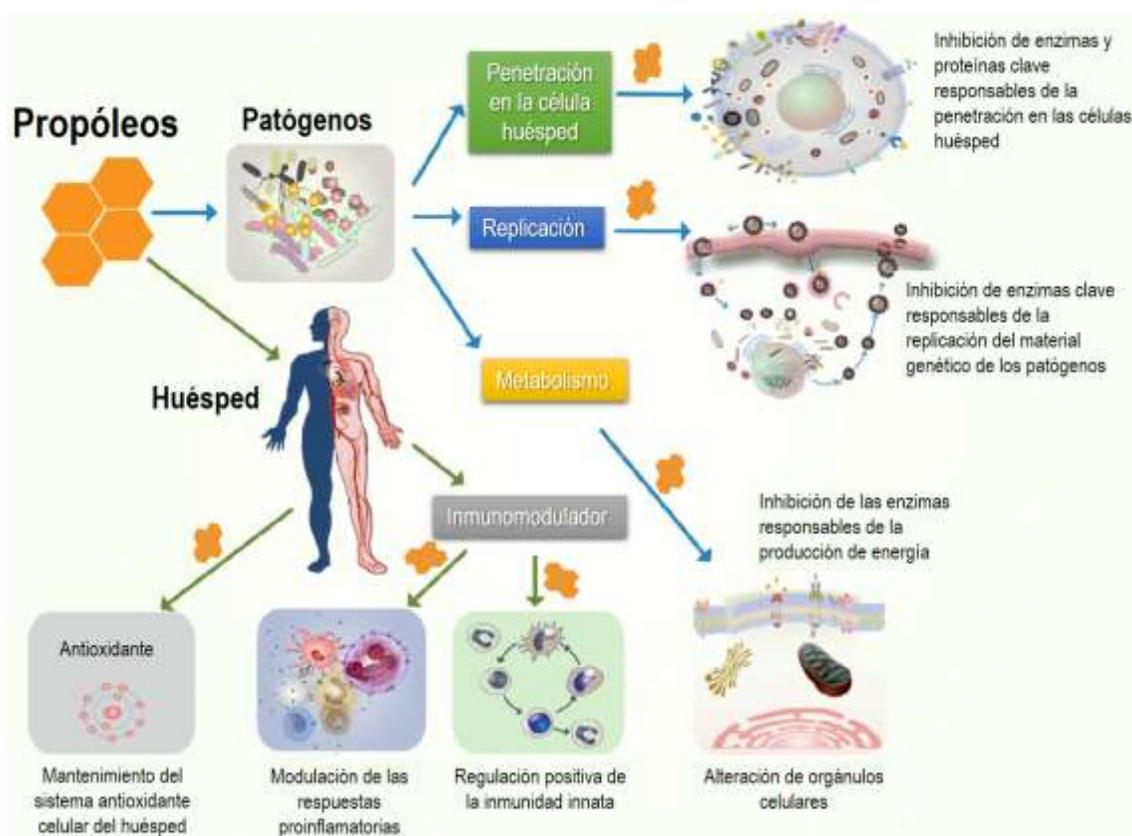


Figura 4. Mecanismos de acción del propóleo, contra virus, hongos y parásitos. (Fuente: Adaptado de Zuhendri et al., 2021).

La actividad antifúngica (mohos y levaduras) del propóleo está relacionada con la inhibición del crecimiento, así como la producción de conidios (Zulhendri et al., 2021). Dependiendo de la concentración de propóleo, puede presentarse un efecto fungistático o fungicida, contra cepas de interés en las diferentes áreas de la medicina humana y animal (Bouchelaghem, 2022; Anjum et al., 2019). Al igual que en las bacterias, los compuestos bioactivos del propóleo actúan sobre la membrana celular de los hongos, induciendo la muerte celular, además de inhibir la actividad de las fosfolipasas extracelulares disminuyendo su habilidad de adhesión. En el caso de algunas levaduras con pseudo micelio, se inhibe la filamentación y la germinación, así como la producción de biopelículas (Ożarowski et al., 2022).

Existe un número menor de investigaciones relacionadas con la actividad antiviral en comparación con la actividad antibacteriana y antifúngica en muestras de propóleos, sin embargo, se han propuesto algunos mecanismos de acción de la actividad antiviral, entre los que podemos destacar: la inhibición de la polimerasa responsable de la síntesis de material genético viral (ADN o RNA), alteraciones en la replicación viral causando destrucción del material genético, el impedir la entrada del virus a la célula huésped (actuando en el reconocimiento entre los receptores celulares y las proteínas del virus), aumento la inmunidad innata del huésped (Monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y NK), (Zulhendri et al., 2021; Ripari et al., 2021; Anjum et al., 2019; Kwon et al., 2019; González-Búrquez et al., 2018; Siheri et al., 2017; Schnitzler et al., 2010).

Zulhendri et al. (2021) mencionan que la actividad antiparasitaria de los propóleos está relacionada con la inducción de la lisis celular, por una alteración del metabolismo de fosfolípidos, el agotamiento de lípidos de la pared celular, condensación citoplasmática, alteración en los mecanismos de adhesión (modificando la expresión de actina, miosina y cortexilina) e inhibición de la síntesis de ADN. Además, algunos compuestos bioactivos del propóleo (Nainu et al., 2021), afectan la expresión de enzimas importante en metabolismo de energético, inducen la hinchazón de las mitocondrias teniendo como resultado una alteración de membrana mitocondrial, se incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática incluso hasta provocar la lisis celular.

- **Actividad antioxidante**

Durante los procesos metabólicos del cuerpo humano, se generan radicales libres naturales, sin embargo, el cuerpo humano cuenta con sistemas antioxidantes enzimáticos naturales tales como: superoxidasa dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, así como antioxidantes no enzimáticos, por ejemplo, la vitamina C y E, que actúan contra las especies reactivas al oxígeno (Siheri et al., 2017). La producción excesiva de especies reactivas al oxígeno puede desencadenar un gran número de enfermedades (cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos inflamatorios, etc.), además, pueden provocar mutaciones o causar daño directo al material genético provocando una transformación celular, con posibilidad de desarrollar alguna condición maligna. Por otra parte, las especies reactivas al oxígeno están directamente relacionadas con el proceso de envejecimiento celular, así como en enfermedades del sistema nervioso central (Parkinson y Alzheimer). Como se ha mencionado anteriormente, la actividad antioxidante de los propóleos es asociada al alto contenido de compuestos fenólicos (Mouhoubi-Tafinine et al., 2016), ya que estos tienen la habilidad de donar iones hidrógeno a los radicales libres, de esta manera protegen a las células de reacciones de oxidación de lípidos, ácidos nucleicos, daños en la membrana y proteínas, así como modular diversos procesos biológicos (Anjum et al., 2019; Boifadi et al., 2017; Zabaïou et al., 2017). Por último, existe un gran número de investigaciones que refieren que el propóleo presenta excelente propiedad antioxidante y que dicha propiedad puede variar dependiendo del origen botánicos, geográfico del propóleo, método de extracción, tipo y concentración de solvente empleado (Hossain et al., 2022; Kasote et al., 2022; Wieczorek et al., 2022; Giampieri et al., 2022; Ding et al., 2020; Šuran et al., 2021; Soltani et al., 2021; Chong y Chua, 2020; Rivero-Cruz et al., 2020).

2.2 Proceso digestivo

2.2.1 Digestión de alimentos en humanos

Li et al., (2020) mencionan que el tracto digestivo de los humanos y en general de los mamíferos es muy complejo, los productos alimentos ingeridos son sometidos a diversos procesos fisicoquímicos y fisiológicos para extraer de manera eficiente los nutrientes, compuestos bioactivos y energía de los

alimentos consumidos, además de evitar la entrada de patógenos y compuestos tóxicos que pongan en riesgo la integridad del individuo. Los cambios fisicoquímicos y fisiológicos ocurren en diferentes compartimentos del sistema digestivo (Figura 5), tales como; boca, estómago, intestino delgado e intestino grueso (Gonçalves et al., 2021). En la boca se realiza la masticación y salivación, con la finalidad de reducir el tamaño de partícula del alimento, así como humectar al mismo, para formar el bolo alimenticio, es importante enfatizar que en la boca existen algunas enzimas que inician el proceso de hidrólisis de carbohidratos (amilasas). En el estómago, el bolo alimenticio es diluido, almacenado, siguen los procesos de degradación, principalmente por las condiciones ácidas del estómago y la participación de enzimas gástricas (lipasas y proteasas). En el intestino delgado los productos alimenticios parcialmente digeridos, siguen el proceso de digestión, por la acción de enzimas pancreáticas y sales biliares, además, los compuestos bioactivos son absorbidos en el duodeno. Por último, en el intestino grueso, se realiza la fermentación de proteínas y polisacáridos no digeridos, y la absorción de compuestos bioactivos producidos por la microbiota intestinal, además de hacer una deshidratación del material de desecho (Li et al., 2020; Dupont et al., 2019; Lucas-González et al., 2018; Cheng et al., 2010).

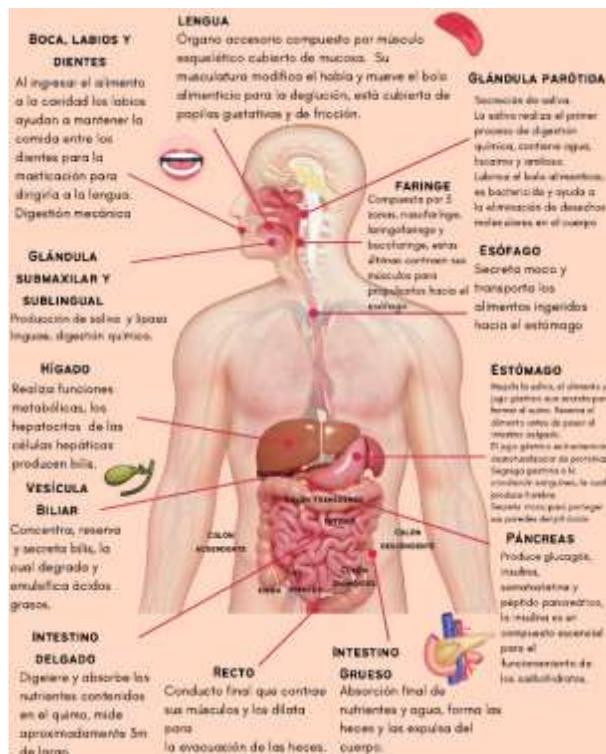


Figura 5. Aparato digestivo en humanos; partes y funciones. (Fuente: Tortora, 2006).

2.2.2 Digestión *in vitro* simulada

Para conocer el comportamiento de alimentos y fármacos durante el trayecto gastrointestinal, en muchas ocasiones los estudios en humanos suelen ser más complejos, laboriosos y costosos, aunque son muy efectivos. Por consiguiente, se prefiere utilizar modelos *in vitro*, ya que son más rápidos, baratos, presentan buena reproducibilidad, de fácil control de variables y muestreo, no hay restricciones éticas, en comparación con los estudios *in vivo* en humanos. En general, los modelos de digestión *in vitro* simulada, tratan de emular las condiciones fisiológicas en sistemas *in vivo*, considerando la presencia de enzimas, pH, tiempo de digestión, contenido y concentración de electrolitos, contenido de sales biliares, entre otros factores (Gonçalves et al., 2021). Existen algunos modelos computarizados muy sofisticados, los cuales tienden a ser muy costosos, y se puede controlar diversos aspectos dinámicos de la digestión, como el transporte del alimento, la concentración de las diferentes enzimas, ajuste automático en el cambio de pH, tiempo de permanencia, entre otros más. Sin embargo, en la mayoría de las investigaciones se reportan la digestión *in vitro* simulada en sistemas estáticos, donde las condiciones son constantes en las diferentes etapas del proceso (Gonçalves et al., 2021; Minekus et al., 2014).

2.2.3 Digestión *in vitro* simulada en un modelo estático

Los estudios relacionados con la digestión *in vitro* se utilizan ampliamente con el objetivo de conocer el comportamiento de los componentes de los alimentos a través del tracto digestivo. Gonçalves et al. (2021), mencionan que aprox., 90% de las investigaciones relacionadas con la digestión *in vitro*, utilizan modelos estáticos. En los cuales se simula las diferentes fases de la digestión; oral, gástrica e intestinal. Estos modelos consisten en uno o una serie de recipientes discontinuos, donde las condiciones bioquímicas son únicas en relación a la temperatura, pH, contenido y concentración de enzimas, electrolitos y sales biliares, además dichas condiciones se mantienen constantes durante todo el proceso (Li et al., 2020), utilizando equipos de laboratorio con agitación, baños María, incubadoras con agitación orbital, agitadores magnéticos, entre otros (Seraglio et al., 2021).

A continuación, se describe el método estandarizado estático de digestión *in vitro*, sugerido para alimentos (Figura 6), propuesto por Minekus et al. (2014).

- **Fase oral**

El proceso de digestión inicia con la boca, con la masticación y salivación, la cual es recomendable aplicar en muestras líquidas, semisólidas y sólidas, sin embargo, en la mayoría de las investigaciones se omite en muestras líquidas (Seraglio et al., 2021). En muestras sólidas es importante simular la masticación, esto puede realizarse con la ayuda de una picadora manual, eléctrica o similar, además se adiciona una solución con electrolitos salivales (relación final 1:1), hasta obtener una consistencia pastosa fina (similar a la pasta de tomate o mostaza). Además, se adicionan 75 U/mL de α -amilasa salival diluida en CaCl_2 0.75 mM. El tiempo de permanencia es variable, en alimentos líquidos es de solo unos segundos, mientras que en muestras semisólidas y en alimentos sólidos pocos minutos (Seraglio et al., 2021). Por lo tanto, se recomiendan 2 min, a 37°C y pH 7.

- **Fase gástrica**

La muestra de alimento que pasa a la fase gástrica, se le conoce como bolo alimenticio, el cual será mezclado con una solución fisiológica gástrica en una proporción 5:4 v/v, a esta solución se le adiciona pepsina porcina a razón de 2000 U/mL disuelta en CaCl_2 al 0.075 mM, con HCl 1M ajustar el pH a 3, la relación final bolo alimenticio-solución fisiológica deberá ser 1:1 v/v. Esta fase tiene una duración de 120 min a 37°C, en caso de ser necesario reajustar el pH con HCl 1M hasta el final de la fase. Se recomienda que esta fase se realice en un baño María y en agitación. Es importante enfatizar, que la principal función del estómago es llevar la digestión del bolo alimenticio al duodeno de manera regulada para optimizar la digestión, es por ello que en el estómago el bolo alimenticio se mezcla con enzimas gástricas y ácido clorhídrico. Al bajar el pH, se tienen una mejor actividad enzimática, la pepsina actúa mejor en un rango de pH de 2 a 4, mientras que las lipasas gástricas en un rango de 5 a 7. Por lo antes mencionado, se recomienda mantener estático el pH a 3 (valor intermedio de la pepsina). La pepsina es considerada la única enzima proteolítica presente en el estómago humano, sin embargo, presenta diversas isoformas y por cuestiones de costos es preferible y recomendable el

uso de pepsina porcina. El contenido de lipasas gástricas es muy reducido en comparación con el tracto duodenal, por lo tanto, la actividad lipolítica en el estómago es limitada, (lipasas actúan en pH 7), por lo tanto, en la digestión *in vitro* simulada el uso de esta enzima puede omitirse. En algunos individuos (humanos) en ayunas se puede encontrar una concentración 0.2mM de sales biliares en el estómago, dicha concentración es muy baja y no está presente en todos los humanos, por lo tanto, en un sistema *in vitro* puede omitirse.

- **Fase intestinal**

El producto resultante de la fase gástrica es conocido como quimo, el cual pasa a la fase intestinal. El quimo es mezclado en con una solución fisiológica intestinal en una relación 5:4 v/v. Es necesario ajustar el pH a 7 con NaOH 1M (inhibición de pepsina), la relación final quimo-solución fisiológica intestinal deberá ser 1:1 v/v, además adicionar pancreatina porcina en relación a 100 U/mL, o si se prefiere enzimas individuales, sin embargo, por cuestiones prácticas es recomendable el uso de pancreatina. En la pancreatina porcina, se encuentran enzimas proteolíticas, lipolíticas y amilolíticas. En alimentos con alto contenido de grasas o muestras donde el objetivo sea la digestión de material lipídico, la concentración de pancreatina debe estar en razón de la actividad de las lipasas, por lo tanto, la concentración final deberá ser de 2000 U/mL. En esta fase es importante la incorporación de sales biliares en una concentración final de 10mM. Tanto la pancreatina como las sales biliares deben ser incorporadas en una solución de CaCl₂ 0.3mM a pH 7. Esta fase tiene una duración de 120 min a 37°C, en caso de ser necesario reajustar el pH hasta el final de la fase. Se recomienda que esta fase se realice en un baño María y agitación.



Figura 6. Proceso de digestión *in vitro* simulada en modelo estático. (Fuente: Adaptado de Brodkorb et al., 2019).

Milinčić et al. (2023) mencionan que la mayoría de los compuestos bioactivos obtenidos de productos naturales, son susceptibles a degradación durante el proceso de digestión, con una reducción significativa de sus propiedades funcionales (actividad antioxidante y actividad antimicrobiana) y efectos benéficos a la salud. Por lo tanto, es necesario proteger a los compuestos bioactivos, y así evitar la pérdida de las propiedades funcionales. Siendo las emulsiones (nano y microemulsiones) la opción más adecuada, ya que han demostrado ser excelentes portadores de compuestos bioactivos durante la digestión *in vitro*, mejorando la bioaccesibilidad y absorción.

2.3 Protección de compuestos bioactivos

Como hemos mencionado anteriormente, el propóleo contiene una gran variedad de compuestos bioactivos (compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides), ácidos aromáticos, alifáticos y sus ésteres, terpenos, taninos, lignanos, carbohidratos, vitaminas, enzimas y minerales (Hossain et al., 2022; Giampieri et al., 2022; Salatino y Salatino 2021). Dichos compuestos, presentan una amplia actividad

biológica (antioxidantes, antimicrobianos (antibacteriano, antifúngico, antihelmíntico y antiviral), antiinflamatorios, inmunomoduladores, hepatoprotectores, anti-actividades alérgicas, cicatrizantes, antitumorales, antidiabéticas, entre otras (Kasote et al., 2022; Nandre et al., 2021; Irigoiti et al., 2021; Zuhendri et al., 2021). Sin embargo, en los últimos años se ha podido demostrar que gran cantidad de estos compuestos bioactivos, pueden perderse durante su metabolismo en el cuerpo humano (Grgić et al., 2020). Debido a que los compuestos bioactivos pueden interactuar con otras macromoléculas (proteínas, lípidos, azúcares y polisacáridos), además, los compuestos bioactivos pueden verse afectados por las condiciones durante el trayecto del tracto gastrointestinal, tales como; el pH y el contenido enzimático (Heleno et al., 2015). Por lo tanto, se han desarrollado diversas tecnologías con la finalidad de proteger a los compuestos bioactivos durante su digestión y mantener su biodisponibilidad (Dias et al., 2017).

2.3.1 Encapsulación

Se le conoce como encapsulación al proceso donde compuestos activos de interés, ya sean sólidos, líquidos o gaseosos son cubiertos por un material, este material recibe diferentes nombres tales como; material de pared, cubierta revestimiento, membrana, fase externa o matriz (Vinceković et al., 2017). El producto resultante es conocido como cápsula, la cual puede ser de diferente tamaño; 10 nm a 100 nm (nanocápsulas) y de 3 a 800 μm (microcápsulas) y propiedades, dependiendo del proceso de elaboración (Eghbal y Choudhary, 2018). Grgić et al. (2020) Sonawane et al. (2020), Dias et al. (2017) y Narsaiah et al. (2014) mencionan las principales razones por las cual se realiza el encapsulado:

- Protección del compuesto bioactivo de interés y evitar pérdidas nutricionales e interacción con factores ambientales, tales como; luz, temperatura, humedad, radiación y oxígeno.
- Disminuir la evaporación y tasa de transferencia del compuesto bioactivo de interés con el exterior.
- Modificar las propiedades físicas del compuesto bioactivo de interés, por ejemplo, un compuesto líquido, convertirlo en sólido y así facilitar su manipulación.
- Mejorar la solubilidad, funcionalidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos de interés, por medio de una liberación controlada temporal o prolongada.
- Enmascarar el olor y sabor desagradable del compuesto bioactivo de interés.

- Unir compuestos o agentes bioactivos de baja compatibilidad.
- Manipular pequeñas cantidades del agente bioactivo de interés.
- Mantener las propiedades químicas, físicas y biológicas de los compuestos bioactivos de interés.

Existe una gran diversidad de materiales que pueden ser utilizados como material de pared o de recubrimiento, para el encapsulado de compuestos bioactivos de interés, entre los que podemos encontrar (Bamidele y Emmambux, 2020; Vinceković et al., 2017):

- Polímeros de carbohidratos:
 - Quitosano
 - Gomas: agar, alginatos, carragenanos, goma de acacia, goma arábiga, pectina, carboximetilcelulosa, entre otros.
 - Almidones y productos del almidón; maltodextrinas, dextrinas, almidones, almidones resistentes, almidones modificados.
- Lípidos
 - Glucolípidos
 - Grasas fraccionadas
 - Mono y diglicéridos
 - Grasas naturales y aceites
 - Fosfolípidos
 - Ceras: cera de abeja y cera de carnauba
- Proteínas
 - Proteína de huevo
 - Hidrolizados de proteína
 - Proteínas de leche: caseínas y proteínas de suero
 - Proteína de soya
 - Proteína de trigo
 - Zeína

2.3.2 Métodos de encapsulación

Para obtener un buen producto encapsulado, con capsulas o esferas homogéneas, bien distribuidas, con alta eficiencia de encapsulación, alta capacidad de carga, con propiedades de liberación deseadas, y de bajo costo, es necesario conocer los diferentes métodos de encapsulación y evaluar el que mejor convenga. A continuación, se describen los métodos de encapsulación más utilizados para la protección de compuestos bioactivos de interés.

- **Encapsulación por aspersion**

Este método de encapsulado, es uno de los más empleados, debido a sus múltiples ventajas, tales como; fácil aplicación, muy eficaz, bajo costo, excelente calidad en el producto final, prolonga la vida útil de material de interés, puede ser aplicado a una gran variedad de materiales, entre otras (Marcillo-Parra et al., 2021; Chou et al., 2021; Grgić et al., 2020). Donde el compuesto bioactivo de interés y el material de pared son mezclados, formando una emulsión (compuestos bioactivos hidrofóbicos, con material de pared hidrofílico), solución o suspensión, a esta etapa se le conoce como “recubrimiento”. Posteriormente, el material recubierto pasa a un secador por aspersion, donde es atomizado en una cámara de aire caliente (secado). Durante el secado, el aire caliente evapora el disolvente y el material de pared se solidifica, de esta manera se forman las cápsulas, normalmente en forma de polvo (Timilsena et al., 2020; Rezvankhan et al., 2019; Dias et al., 2017). Este tipo de metodología es recomendable para compuestos altamente sensibles e inestables, dentro de las cuales encontramos; grasas poliinsaturadas, vitaminas, enzimas, microorganismos probióticos, polifenoles, por mencionar algunos (Vinceković et al., 2017). Sin embargo, es limitado en número de materiales de pared, ya que estos deben ser solubles en agua, por otra parte, la temperatura del aire debe controlarse, ya que algunos compuestos de interés son sensibles al calor (Gonçalves et al., 2021).

- **Recubrimiento de lecho fluidizado**

La encapsulación en lecho fluidizado, se basa en la utilización de aire fluidizante, que proporciona una circulación uniforme de las partículas que pasan a través de boquillas atomizadoras (Mirzamani et al.,

2021). El proceso inicia con la preparación de una solución del material de recubrimiento, y el material de interés, los cuales van a ser atomizados a través de boquillas hacia una cámara donde en el parte inferior el aire caliente va a fluidizar con la ayuda de un distribuidor de partículas, cuando las partículas de material de interés y de recubrimiento chocan, el agua se evapora, dejando que las partículas de soluto precipite al fondo. Es importante tener un buen control de la velocidad y temperatura del aire, de no ser así, la velocidad de evaporación del agua es mayor, evitando la agregación del material de recubrimiento (Lipin y Lipin, 2022; Timilsena et al., 2020). Normalmente, en este tipo de metodología se sugiere utilizar como material de recubrimiento; polímeros, lípidos o ceras (Zhang et al., 2020).

- **Pulverización en frío**

Este proceso se basa en la solidificación de un fluido pulverizado en una cámara de enfriamiento, normalmente le fluido contiene como material de encapsulamiento, lípidos de alto punto de fusión (Favaro-Trindade et al., 2021). Para iniciar, en primer lugar, se debe realizar el encapsulamiento del material de interés en una matriz lipídica, emulsión de agua en aceite (Bertoni et al., 2019). Posteriormente, la mezcla es atomizada a través de una boquilla atomizadora caliente (con la finalidad de evitar que la recristalización de los compuestos lipídicos). Cuando el material pulverizado entra en contacto con un ambiente a una temperatura inferior al punto de fusión de los lípidos, se produce una transferencia de calor entre el lípido y el aire frío, provocando la solidificación de la mezcla, generándose así la formación de partículas encapsuladas (Figueiredo et al., 2022). Este método de encapsulado se recomienda para proteger; fertilizantes químicos, productos de interés farmacéutico, vitaminas, enzimas, acidulantes, sabores, entre otros (Timilsena et al., 2020).

- **Liofilización**

La liofilización es un método adecuado para la encapsulación de los compuestos bioactivos volátiles y sensibles al calor (Nowak y Jakubczyk, 2020), esta metodología es más adecuada que el encapsulado por aspersion. En este caso, se realiza una mezcla de los compuestos bioactivos de interés con los materiales de pared, esta mezcla es congelada y posteriormente se elimina el agua sin pasar por el estado líquido (sublimación), el polvo resultante es muy estable durante su

almacenamiento. Sin embargo, el proceso es muy costoso ya que para la eliminación del agua se requieren largos periodos de tiempo (mínimo 20 horas), por lo tanto, es una metodología costosa (Gonçalves et al., 2021).

- **Recubrimiento por extrusión**

De acuerdo con Bamidele y Emmambux (2020), esta metodología puede ser empleada para encapsular una gran diversidad de productos de interés, sin embargo, se recomienda que, al momento de realizar el proceso, estos sean muy densos. Es considerado un proceso de co-extrusión líquida en donde el núcleo (compuestos bioactivos de interés) y el material de recubrimiento son bombeados por separado, a través de un orificio concéntrico ubicado en la circunferencia exterior de un cilindro giratorio. El material de interés fluye por el centro del tubo, y el material de recubrimiento fluye a través del otro tubo (Grgić et al., 2020). El equipo está unido a un eje giratorio, tanto el núcleo como el material de pared se coextruyen a través de los orificios concéntricos a medida que gira el cabezal. Durante este proceso, la fuerza centrífuga impulsa la varilla hacia afuera, provocando que se rompa en pequeñas partículas. Debido a la actividad superficial del material de recubrimiento, se mueve rápidamente en la superficie del núcleo hasta rodear completamente el material del núcleo. Este método, es utilizado en la protección de carbohidratos de bajo peso molecular, sabores, condimentos, vitaminas, entre otros. Los materiales de pared utilizados en el proceso de encapsulación por extrusión incluyen gretina, alginato de sodio, carragenina, almidones, derivados de celulosa, goma arábica, grasas y ácidos grasos, ceras y polietilenglicol (Timilsena et al., 2020).

- **Coacervación**

La coacervación implica interacciones electrostáticas capaces de promover la separación de la fase líquida de uno (coacervación simple) o muchos (coacervación compleja) agentes encapsulantes, con la formación de un complejo compuesto por dos fases distintas. En la fase rica en agente encapsulante, las gotas de líquido se depositan y endurecen alrededor del compuesto bioactivo, formando el coacervado. Después de este proceso se obtienen partículas autosostenibles. La

encapsulación por coacervación es un proceso muy eficiente, aunque está asociado a un coste elevado (Wang et al., 2018).

- **Emulsionado**

Los sistemas de al menos dos fases inmiscibles se denominan dispersión. Un sistema disperso está formado por una fase dispersa en un flujo continuo. Existen tres tipos principales de dispersiones basadas en la física de la fase dispersa: espumas de un gas en una mezcla líquida; suspensiones de un sólido en una mezcla líquida; y emulsión de un líquido en un sistema líquido. Algunos métodos de encapsulación se basan en emulsiones (Rezvankhan et al., 2019). En general, una emulsión es un sistema que se compone de por lo menos dos líquidos inmiscibles (típicamente agua y aceite, aunque no siempre), en el cual uno de esos dos líquidos se ha dispersado en el otro en forma de pequeñas gotas esféricas con ayuda de un agente que funciona como emulsificante, adicionalmente se aplica una fuerza mecánica (Kale y Deore, 2017; Fang y Bhandari, 2010). Definen a las emulsiones como dispersiones de gotitas macroscópicas de un líquido en otro líquido, con un diámetro de gotita aproximadamente de 0,5 a 100 μm . Estas emulsiones son normalmente inestables en altas temperaturas, pueden ser turbias u opacas a la vista debido a que las gotas de ese tamaño poseen un tamaño similar a la longitud de onda de la luz y suelen dispersarla fuertemente (Grgić et al., 2020). Es importante destacar el uso de agentes durante el proceso de elaboración de las emulsiones, los cuales pueden ser naturales (Lecitinas, proteínas y polisacáridos) o químicos como los tensoactivos (Span, Tweens, entre otros), debido a que presentan dominios hidrofóbicos (Jia et al., 2016). Las emulsiones pueden clasificarse de acuerdo a la distribución espacial de sus fases (oleosa y acuosa); emulsión aceite-agua o también conocida como O/W (por sus siglas en inglés *Oil/Water*), emulsión agua-aceite, también conocida como W/O (por sus siglas en inglés *Water/Oil*) y emulsiones múltiples o dobles; agua-aceite-agua, también conocidas como W/O/W (por sus siglas en inglés *Water/Oil/Water*), aceite-agua-aceite o O/W/O (por sus siglas en inglés *Oil/Water/Oil*) y aceite-agua-agua o O/W/W (*Oil/Water/Water*) (Ding et al., 2019).

2.3.3 Encapsulado de propóleos

En la tabla 2, se presenta una revisión de diversas investigaciones donde se aplican los procesos de encapsulado de propóleos de diversas partes del mundo, con la finalidad de protegerlos contra diferentes factores.

Tabla 2. Encapsulado de propóleos de diversas partes del mundo. (Fuente: Elaboración propia, 2023).

Origen del propóleo	Tipo de Encapsulación	Tamaño de partícula	Material de cubierta	Referencia
Alagoas (Brasil)	Microencapsulación	21.8-286.7 μm	Goma arábica Grasa vegetal (Semilla de algodón, soya y palma)	Gomes et al. (2023)
Perú	Microencapsulación	5.7-33.9 μm	Maltodextrina Goma tara	De Alencar et al. (2023)
Brasil	Microencapsulación	6.7-6.8 μm	Ovoalbúmina	Jansen-Alves et al. (2023)
Perú	Nanoencapsulación	198-266 nm	Maltodextrina Goma arábica	Ligarda-Samanez et al. (2022)
Azerbaiyán (Irán)	Nanoencapsulación	99.76-242.22 nm	Proteína de suero	Shakoury et al. (2022)
Haryana, Punjab y Himachal Pradesh (India)	Microencapsulación	10.34 -89.34 μm	Maltodextrina	Pant et al. (2022)
Egipto	Nanoemulsiones	--	Fosfolípidos (Fosfatidilcolina al 70%) Colesterol	Refaat et al. (2021)
Surabaya (Indonesia)	Nanoemulsiones	11.7-44.7 nm	Labrasol Labrafac Cremophor RH 40, Kollisolv Kolliphor Aceite de ricino Aceite de sésamo Aceite de girasol Aceite de coco Tween 20 Polietilglicol	Syukri et al. (2021)

			Propilenglicol	
Khorramabad (Irán)	Nanoemulsiones	611-4,064 nm	Caseinato de sodio Maltodextrina	Soleimanifard et al. (2021)
Turquía	Microemulsión	1.42-74.39 μ m	Maltodextrina Lactosa Goma arábica Gelatina Caseinato de sodio Aislado de proteína de suero Aceite de girasol	Baysan et al. (2021)
Portugal	Nanoencapsulación	4.6 \pm 0.3 μ m	Etilcelulosa Poliácido láctico-co-glicólico Policaprolactona Alcohol polivinílico	Paulo et al. (2021)
Egipto	Nanoemulsiones	126-723 nm	Fosfolípidos Lecitina de soya Fosfatidilcolina	El-aziz et al. (2021)
Turquía	Nanoemulsiones	374-759 nm	Fosfolípidos	Aytekin et al. (2020)
Alagoas (Brasil)	Nanoemulsiones	42-69 nm	Poliácido láctico-co-glicólico	De Mélo et al. (2020)
Ribeirão Preto (Brasil)	Emulsión	--	Quitano Pectina	Sato et al. (2020)
Ardabil (Irán)	Nanoencapsulación	51-281 nm	Monoestereato de clerilo Tween 80 Lecitina de soya Polietilglicol 400	Afra et al. (2020)
Brasil	Nanoencapsulación	75-170 nm	Aislado de proteína de suero Alginato de sodio Aceite de girasol	Chang et al. (2020)
Turquía	Microencapsulación	500-800 μ m	Alginato de sodio Tween 80	Keskin et al. (2019)
Minas Gerais (Brasil)	Nanoemulsiones	50.561.8 nm	Aceite de maíz Span 80 Tween 80	Seibert et al. (2019)
Rio Grande do Sul (Brasil)	Microencapsulación	5-20 μ m	Proteína de arroz, guisantes y soya Ovoalbúmina	Jansen-Alves et al. (2018)

Como se puede observar, se han encapsulado propóleos de diferentes lugares, sin duda, Brasil es uno de los países con mayor investigación relacionada con el tema, debido a que es uno de los principales países productores de propóleo a nivel mundial. Normalmente, se ha encapsulado el propóleo, con los siguientes objetivos: la protección del propóleo contra factores ambientales, evitar cambios físicos y químicos del propóleo, mejorar la solubilidad, funcionalidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos del propóleo, así como enmascarar el sabor fuerte, picante y astringente del propóleo. Sin duda alguna, durante el encapsulado del propóleo, ha generado la utilización de diversas tecnologías, sin embargo, la nanoencapsulación, microencapsulación y las emulsiones son de las más utilizadas, con excelentes resultados, obteniendo diversos tamaños de partícula, lo cual está directamente relacionado con el tipo de tecnología empleada, así como las condiciones del encapsulado. Dependiendo de la tecnología empleada, el objetivo del proceso, se pueden utilizar una gran diversidad de productos de cubierta. Es importante enfatizar, que independientemente del origen del propóleo, es necesario realizar un buen proceso de encapsulado, de esta manera los compuestos bioactivos del propóleo puedan ejercer los efectos benéficos de interés en la salud.

3. Justificación

Como se ha podido apreciar, en las últimas décadas, el propóleo ha sido sujeto de diversas investigaciones, debido a su aplicación desde tiempos remotos en la medicina tradicional, es por ello, que cada vez se encuentra mayor información sobre la caracterización, usos y aplicaciones del propóleo, en diversas áreas, tales como; la medicina, industria cosmética, industria alimentaria, entre otras. Sin embargo, diversos factores (origen botánico, especie de abeja, estado de salud de las abejas, zona geográfica, así como las condiciones climático-ambientales) pueden influir en su composición, por consiguiente, sus propiedades biológicas pueden cambiar. Los compuestos fenólicos, son los compuestos bioactivos asociados a las propiedades funcionales del propóleo; tales como; antioxidantes, antimicrobianos (antibacteriano, antifúngico, antihelmíntico y antiviral), antiinflamatorios, inmunomoduladores, hepatoprotectores, anti-actividades alérgicas, cicatrizantes, antitumorales, antidiabéticas, entre otros. Sin embargo, muchos de estos compuestos bioactivos, pueden verse afectados durante el trayecto gastrointestinal, disminuyendo sus efectos benéficos en la salud. Por lo tanto, en esta investigación se obtuvieron extractos etanólicos de propóleos provenientes de tres municipios de la cañana oaxaqueña, dichos extractos fueron obtenidos por la técnica de ultrasonido asistido, se evaluó el contenido de compuestos bioactivos, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana. Posteriormente se prepararon emulsiones con los extractos y se evaluó su comportamiento durante la digestión *in vitro* simulada, como una alternativa para proteger a los compuestos bioactivos y evitar la pérdida de las propiedades funcionales.

4. Hipótesis

Las emulsiones con extractos de propóleo protegerán a los compuestos bioactivos, durante la digestión *in vitro* simulada, por lo tanto, se evitará la degradación de los compuestos fenólicos (fenoles totales y flavonoides totales) así como la pérdida de sus propiedades funcionales (actividad antioxidante).

Variable dependiente (X)

Proceso de emulsión

Variables independientes (Y)

Estabilidad de las emulsiones
Contenido de compuesto fenólicos
Fenoles totales
Flavonoides totales
Actividad antioxidante

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el contenido de compuestos bioactivos y propiedades funcionales durante la digestión *in vitro* simulada de emulsiones con extractos de propóleos provenientes de tres municipios de la cañada oaxaqueña.

5.2 Objetivos específicos

- Obtener extractos etanólicos de propóleos por la técnica de ultrasonido y maceración, provenientes de tres municipios de la cañada oaxaqueña.
- Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos (fenoles totales y flavonoides totales), actividad antimicrobiana y actividad antioxidante de extractos de etanólicos de propóleos durante la digestión *in vitro* simulada.
- Obtener emulsiones con extractos etanólicos de propóleos, mediante la técnica de ultrasonido.
- Determinar la estabilidad, contenido de compuestos bioactivos (fenoles totales y flavonoides totales) y actividad antioxidante de emulsiones con extractos etanólicos de propóleos, durante la digestión *in vitro* simulada.

6. Materiales y métodos

6.1 Localización de experimento

La fase experimental de esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Química, Biología y Microbiología de la Universidad de la Cañada, ubicada en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca. En los laboratorios Usos Múltiples, Nutrición Animal y de Análisis Especiales y el Laboratorio de Aprovechamiento de Subproductos Agroalimentarios del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, ubicado en Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.

6.2 Muestras

Se utilizaron tres muestras de propóleos de aprox., 500 g, provenientes de tres municipios de la Cañada oaxaqueña; Teotitlán de Flores Magón (18°08'00"N 97°05'00"O), San Pedro Ocopetatillo (18°12'00"N 96°55'00"O) y San Jerónimo Tecóatl (18°10'00"N 96°55'00" O), codificadas como T, SP y SJ respectivamente. Las muestras fueron recolectadas directamente del apiario, con el apoyo de las organizaciones de apicultores: "Miel Néctar Mazateco" y "Sociedad de Apicultores de Eloxochitlán". Las muestras se transportaron en recipientes herméticamente cerrados, protegidos de la luz y fueron almacenados a -30 °C hasta su uso.

6.3 Etapas de la investigación

En la figura 7, se muestran las etapas de la fase experimental de la presente investigación, con la fase experimental de la etapa 1, se cubren los dos primeros objetivos específicos de esta investigación, la etapa 2, se cumplen con los dos últimos objetivos específicos.

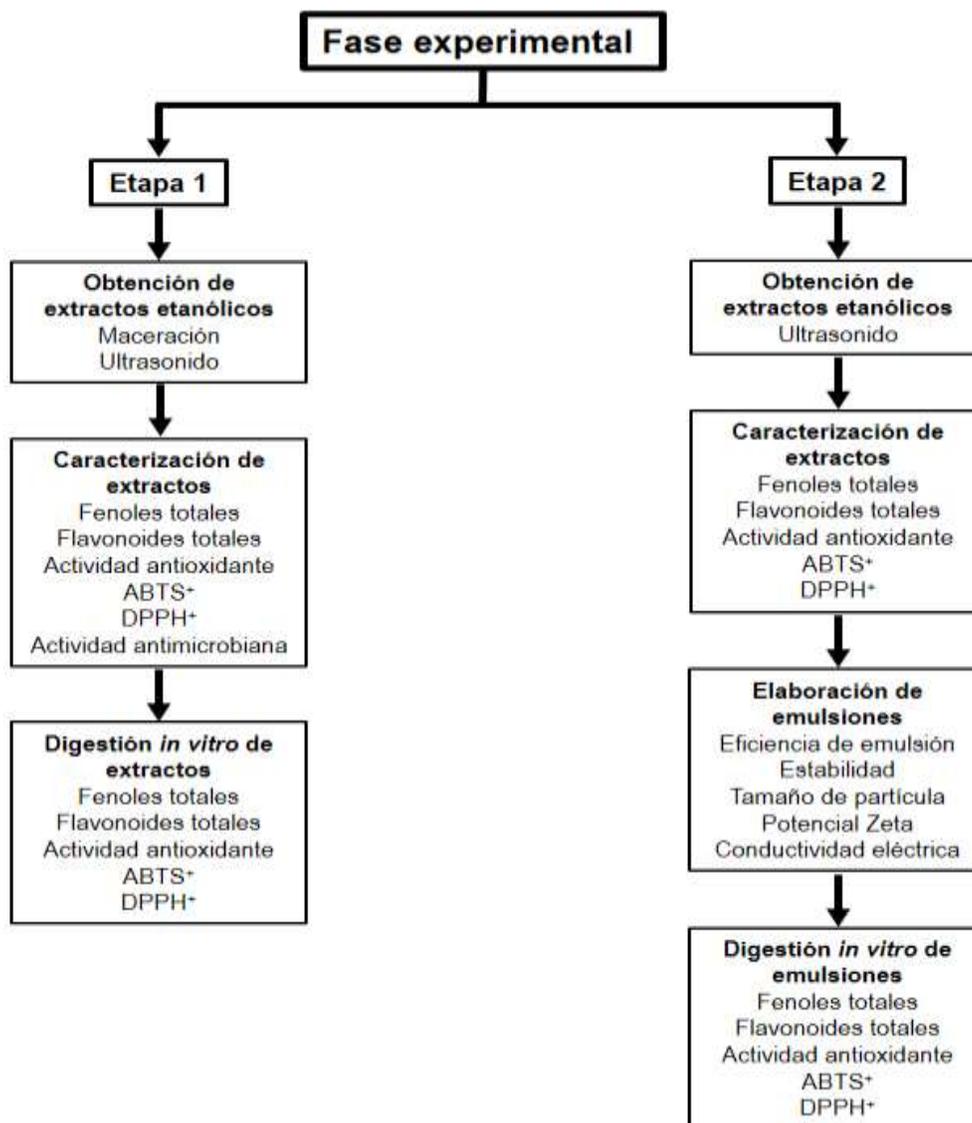


Figura 7. Etapas de la fase experimental.

6.3.1 Etapa 1 de la investigación

- **Método de extracción y preparación de extractos**

Los extractos fueron obtenidos de acuerdo a Osés et al. (2016), con algunas modificaciones; los propóleos congelados (-30 °C) fueron molidos con la ayuda de un molino (Jia-wanshun, Modelo HC-2000Y, China), a partir del propóleo en polvo se prepararon 6 tratamientos (Tabla 3). En todos los

tratamientos, el solvente utilizado fue etanol al 85%, en una proporción 1:30 w/v, a temperatura de 20°C. La maceración se realizó con agitación magnética a 200 rpm. Los extractos por ultrasonido fueron obtenidos en un baño ultrasónico (Branson 3510, México), durante 30 min, a una frecuencia de 42 kHz. Posteriormente, se centrifugaron a 18,510 xg durante 15 min a 4 °C, con la finalidad de eliminar solo sólidos no extraíbles. El solvente de extracción fue concentrado en un rotavapor a 40 °C (Büchi R-215, Switzerland). Para la eliminación total del solvente se utilizó una estufa al vacío (Fisher Scientific Vo, USA) a 40 °C. Los extractos fueron rotulados y almacenados a 4 °C, en recipientes de vidrio color ámbar hasta su uso. Se determinó el contenido de fenoles totales, flavonoides totales, la actividad antioxidante por ABTS⁺ y DPPH⁺ y la actividad antimicrobiana.

Tabla 3. Procedencia y condiciones para la obtención de extractos de propóleos.

Muestra	Procedencia	Tratamiento	Tiempo
T	Teotitlán de Flores Magón	Ultrasonido	30 min
T M	Teotitlán de Flores Magón	Maceración	17 días
SP	San Pedro Ocopetatlillo	Ultrasonido	30 min
SP M	San Pedro Ocopetatlillo	Maceración	17 días
SJ	San Jerónimo Tecóatl	Ultrasonido	30 min
SJ M	San Jerónimo Tecóatl	Maceración	17 días

T = Teotitlán de Flores Magón, Ultrasonido; T M = Teotitlán de Flores Magón, Maceración; SP = San Pedro Ocopetatlillo, Ultrasonido; SP M = San Pedro Ocopetatlillo, Maceración; SJ = San Jerónimo Tecóatl, Ultrasonido; SJ M = San Jerónimo Tecóatl, Maceración.

En este punto, es muy importante enfatizar, que la elección de los tratamientos (Tabla 3) así como las condiciones de operación, se realizó con base, al resultado de un conjunto de experimentos previamente realizados, donde se probaron diferentes tratamientos, tales como:

Obtención de extractos por maceración se realizaron de acuerdo con Sime et al. (2015) con algunas modificaciones, se realizaron 4 tratamientos donde se utilizó etanol al 70 y 85 %, la relación de solvente fue 1:30 w/v y 1:3 w/v y tiempo de maceración de 1 y 17 día. El mejor rendimiento se obtuvo en la maceración durante 17 días, con etanol al 85 % en una relación 1:30 w/v.

Obtención de extractos utilizando ultrasonido, se realizó de acuerdo a Osés et al. (2016) y Pobiega et al. (2019), con algunas modificaciones, se realizaron 8 tratamientos donde se utilizó etanol al 70 y 85 %, la relación de solvente fue 1:30 w/v y 1:3 w/v, el tratamiento de ultrasonido fue durante 20 y 30 min a una frecuencia de 42 kHz. El mejor rendimiento se obtuvo en los extractos con ultrasonido durante 30 min, con etanol al 85 % en una relación 1:30 w/v.

Por último, se obtuvieron 9 extractos por agotamiento, se utilizó 1, 2.5 y 5 gramos de propóleo en polvo (de tres diferentes lugares), a los cuales se les agregó 30 mL de etanol al 85 %, se colocaron en un baño ultrasónico (Branson 3510, México), durante 30 min, a una frecuencia de 42 kHz. Después se centrifugaron, el retenido fue resuspendido en 30 mL de etanol al 85 %, nuevamente se dió el tratamiento en el baño de ultrasonido, en total se hicieron tres extracciones. Los resultados obtenidos respecto al rendimiento fueron similares a los tratamientos anteriores. Por lo antes mencionado, se tomó la decisión de obtener los extractos bajo la metodología y condiciones de operación, tal como se muestra en la tabla 3.

- **Digestibilidad *in vitro* de extractos de propóleos**

La simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal de los extractos se realizó de acuerdo a Minekus et al. (2014), con algunas modificaciones. La digestión se dividió en dos etapas: (a) la fase gástrica; se preparó una solución de 20 mg/mL extracto seco en etanol al 80 %, posteriormente esta solución fue diluida (1:5 v/v) con agua destilada, a esta solución se le ajustó el pH a 2 con HCl 6 M, se adicionó 20 mL de líquido gástrico (40,000 unidades de pepsina porcina en CaCl₂ 0.3 M en HCl 0.1 M), la mezcla fue incubada en baño María a 37°C, con agitación durante 120 min. (b) la fase intestinal, el pH fue ajustado a 7 con bicarbonato de sodio 0.5 M, posteriormente se le adicionó 10% de líquido pancreático (0.4 g de pancreatina y 2.5 g de sales biliares en 100 mL de NaHCO₃ 0.1 M), la mezcla fue incubada en baño María a 37 °C, con agitación durante 120 min. Por último, la mezcla fue calentada a ebullición durante 4 min, con la finalidad de inactivar las enzimas. Se tomaron 4 muestras durante la digestión; extracto, al final de la fase gástrica, al final de la fase intestinal y después de la ebullición. Todas las muestras fueron centrifugadas (Hermle, Z 36 HK, Alemania) a 18510 xg durante

10 min a 4 °C, y fueron guardadas en refrigeración hasta su análisis: fenoles totales, flavonoides, actividad antioxidante (ABTS⁺ y DPPH⁺) y actividad antimicrobiana.

6.3.2 Etapa 2 de la investigación

- **Extracción y preparación de extractos por ultrasonido**

Los extractos fueron obtenidos de acuerdo a Osés et al. (2016), con algunas modificaciones; los propóleos congelados (-30 °C) fueron pulverizados con la ayuda de un molino (Jia-wanshun, Modelo HC-2000Y, China), a partir del propóleo en polvo se realizó la extracción, como se especifica a continuación; se realizó por ultrasonido durante 30 min a una frecuencia de 42 kHz en un baño ultrasónico (Branson 3510, México), se utilizó etanol al 85 %, en una proporción 1:30 w/v, a 20 °C. Posteriormente se realizó una centrifugación a 18510 xg durante 15 min a 4 °C, con la finalidad de eliminar solo sólidos no extraíbles. Posteriormente el solvente de extracción fue concentrado en un rotavapor a 40 °C (Büchi R-215, Switzerland). Para la eliminación total del solvente se utilizó una estufa al vacío a 40 °C. Los extractos fueron rotulados (T, SP y SJ) y almacenados a 4 °C, en recipientes de vidrio color ámbar hasta su uso. Se determinó el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y la actividad antioxidante por ABTS⁺ y DPPH⁺.

- **Preparación, caracterización y estabilidad de las emulsiones**

Las emulsiones fueron elaboradas de acuerdo a Espino-Manzano et al. (2020) y Seibert et al. (2019) con algunas modificaciones. La composición de las emulsiones fue de: 3 % de monooleato de sorbitan (Span 80, Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA), 5 % de extracto puro propóleo, 5 % de aceite esencial de naranja (W282510, Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA), 7 % de polisorbato 80 (Tween 80, Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA) y 80 % de agua ultrapura (Milli-Q, Millipore). El extracto de propóleo, aceite esencial de naranja, Span 80 y Tween 80 fueron mezclados con un procesador ultrasónico (Ultrasonic Vibra-Cell VCX 130 Sonics, Newton, CT, USA) a una frecuencia de 20 kHz, al 80 % de amplitud. Con una sonda de 6 mm de diámetro, se aplicaron 36 intervalos de 50 s con 10 s de reposo. Posteriormente, se agregó el agua ultrapura y se aplicaron 36 intervalos de 50 s con 10 s de reposo,

durante el proceso la mezcla estaba colocada en un baño de hielo. Las emulsiones fueron rotuladas (ET, ESP y ESJ), colocadas en frasco de vidrio color ámbar y almacenadas en refrigeración (4 °C) hasta su análisis. Para determinar el tamaño de partícula (nm), potencial Z (mV) y conductividad eléctrica ($\mu\text{s}/\text{cm}$) de las emulsiones se utilizó un Zetasizer (Nano-ZS2000 Model, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). Para lo cual se colocaron 20 μL de la emulsión y 1980 μL de agua ultrapura, el análisis se realizó a los 0, 7, 14, 49, 56, 63, 70, 77 días de almacenamiento, todas las mediciones se realizaron por triplicado.

- **Eficiencia de encapsulación**

La eficiencia de emulsión se calculó según Saliba et al. (2023) con algunas modificaciones.

$$\text{Eficiencia de emulsión} = (\text{CFT del EP} - \text{CFE}) / (\text{CFT del EP})$$

Dónde:

CFT del EP= Contenido de fenoles totales en el extracto puro

CFE= Contenido de fenoles totales en la emulsión.

Para romper la emulsión se adición una solución de etanol-metanol (1:1 v/v) en una relación 1:1.2 v/v (por cada mililitro de emulsión se adicionó 1.2 mililitros de la solución etanol-metanol) los cuales se agitaron vigorosamente durante 30 min en ausencia de luz, después se centrifugaron a 18510 $\times g$ durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante se utilizó para el análisis.

- **Digestión *in vitro* de las emulsiones con extractos de propóleos**

La simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal de las emulsiones con extractos de propóleos fue de acuerdo a Saliba et al. (2023) y Minekus et al. (2014), con algunas modificaciones. La digestión se dividió en dos etapas: (a) fase gástrica; se utilizaron 10 mL de cada una de las emulsiones (ET, ESP y ESJ) y el control (Agua destilada), se les adicionó 15 mL de líquido gástrico (2,000 U/mL de pepsina porcina en CaCl_2 0.3 M en HCl 0.1 M), se ajustó el pH a 2 con HCl 6 M, todo fue incubado en baño

María a 37 °C, con agitación durante 120 min. (b) fase intestinal, el pH fue ajustado a 7 con bicarbonato de sodio 0.5 M, posteriormente se le adicionó 10 % de líquido pancreático (0,4 g de pancreatina y 2,5 g de sales biliares en 100 mL de NaHCO₃ 0.1 M), la mezcla fue incubada en baño María a 37 °C, con agitación durante 120 min. Por último, la mezcla fue calenda hasta ebullición durante 4 min, con la finalidad de inactivar las enzimas. Se tomaron muestras al final de cada una de las fases (Gástrica e Intestinal). Todas las muestras fueron centrifugadas (Hermle, Z 36 HK, Alemania) a 18510 xg durante 10 min a 4 °C, posteriormente fueron guardadas en refrigeración hasta su análisis: fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante (ABTS⁺ y DPPH⁺).

6.4 Determinación de compuestos bioactivos

- **Cuantificación de fenoles totales**

La cuantificación de fenoles fue de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu descrito por Rababah et al. (2013), con algunas modificaciones, para los extractos se realizó una dilución de extracto de propóleo (1:1000 p/v) usando etanol al 85 %, en el caso de las emulsiones (ET, ESP y ESJ) se agregó 1.2 mL de etanol-metanol por cada mL de la emulsión, las muestras se homogenizaron hasta completa solubilidad utilizando un Vortex, posteriormente fueron centrifugadas a 18510 xg durante 15 min a 4 °C (Hermle, Z 36 HK, Alemania). Se tomaron 0.3 mL del sobrenadante en un tubo de ensayo y se mezclaron con 1.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 N, se incubó durante 8 min a temperatura ambiente y en ausencia de luz, después se agregaron 1.2 mL de Na₂CO₃ 0.7 M, se homogenizaron e incubaron a temperatura ambiente durante 120 min en ausencia de luz. La absorbancia se midió a 765 nm usando un espectrofotómetro (Jenway 6715, UK), frente a un blanco de agua. El contenido de fenoles totales se determinó a partir de una curva estándar de ácido gálico (0 a 100 mg/L). La cantidad de fenoles totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG/100 g extracto de propóleo y emulsión), de acuerdo a la siguiente ecuación. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

$$\text{Fenoles totales (mg EAG/100 g)} = (\text{CAG} * \text{V} * \text{DF} * 100) / (\text{Peso de la muestra (g)})$$

Donde:

CAG = Concentración de ácido gálico de la curva estándar (mg/mL)

V = Volumen de muestra (mL)

DF = Factor de dilución de la muestra

- **Cuantificación de flavonoides totales**

El contenido de flavonoides totales se determinó de acuerdo al método Dowd adaptado por Arvouet-Grand et al. (1994), con algunas modificaciones, para los extractos se realizó una dilución de extracto de propóleo (1:1000 p/v) usando metanol puro, en el caso de las emulsiones (ET, ESP y ESJ) se agregó 1.2 mL de etanol-metanol por cada mL de la emulsión, las muestras se homogenizaron hasta completa solubilidad con un Vortex, posteriormente los extractos fueron centrifugados a 18510 xg durante 15 min a 4 °C (Hermle, Z 36 HK, Alemania). Se preparó una solución de cloruro de aluminio al 2 % (AlCl₃) en metanol. En un tubo de ensayo se colocaron 2 mL del sobrenadante con 2 mL de AlCl₃, se homogenizaron y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 20 min en ausencia de luz. La absorbancia se midió a 415 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6715, UK), usando metanol como blanco. Se utilizó quercetina para la elaboración de la curva estándar (0 a 100 mg/L). El contenido total de flavonoides se expresó en mg equivalente de quercetina / 100 g de extracto de propóleo y emulsión (mg EQ/100 g de extracto de propóleo y emulsión), de acuerdo a la siguiente ecuación. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

$$\text{Flavonoides totales (mg EQ/100 g)} = (\text{CQ} * \text{V} * \text{DF} * 100) / (\text{Peso de la muestra (g)})$$

Donde:

CQ = Concentración de quercetina de la curva estándar (mg/mL)

V = Volumen de muestra (mL)

DF = Factor de dilución de la muestra

6.5 Actividad antioxidante

- **Actividad de inhibición de radicales libres ABTS⁺**

La actividad antioxidante se determinó utilizando el compuesto cromogénico ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) de acuerdo a Pimentel-González et al. (2015). Para los extractos, se realizó una dilución de extracto de propóleo (1:1000 p/v) usando etanol al 85 %, en el caso de las emulsiones (ET, ESP y ESJ) se agregó 1.2 mL de etanol-metanol por cada mL de la emulsión, las muestras se homogenizaron hasta completa solubilidad utilizando un Vortex, posteriormente los extractos fueron centrifugados a 18510 xg durante 15 min a 4°C (Hermle, Z 36 HK, Alemania). Se preparó 20 mL de solución stock de ABTS 7 mM (36 mg del reactivo ABTS aforando a 10 mL con agua destilada, y se agregó 10 mL de persulfato de potasio 2.45 mM (5.83 mg de persulfato de potasio en 10 mL de agua destilada). Para generar los radicales libres ABTS⁺, la mezcla se mantuvo en agitación magnética durante 24 h en oscuridad total. Antes de iniciar la lectura de las muestras, el reactivo de ABTS⁺ se estandarizó a una absorbancia de 0.7 ± 0.01 utilizando etanol al 20 %. En un tubo de ensayo se colocaron 0.2 mL del sobrenadante con 2 mL de ABTS⁺ estandarizado, se homogenizaron y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 6 min en ausencia de luz. Las muestras se leyeron a 734 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6715, UK). Se utilizó ácido gálico para la elaboración de la curva estándar (0 a 100 mg/L) y como blanco etanol al 20%. La actividad antioxidante se expresó como mg equivalentes de ácido gálico en 100 g de extracto y emulsión, de acuerdo a la siguiente ecuación. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

$$\text{Actividad antioxidante (mg AG/100 g)} = (\text{AG} * \text{V} * \text{DF} * 100) / (\text{Peso de la muestra (g)})$$

Donde:

CAA o AG = Concentración de ácido gálico de la curva estándar (mg/mL)

V = Volumen de muestra (mL)

DF = Factor de dilución de la muestra

- **Actividad de inhibición de radicales libres DPPH⁺**

Para la actividad antioxidante de DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) fue de acuerdo a Turkmen et al. (2006). En el caso de los extractos, se realizó una dilución de extracto de propóleo (1:1000 p/v) usando metanol puro, en el caso de las emulsiones (ET, ESP y ESJ) se agregó 1.2 mL de etanol-metanol por cada mL de la emulsión, las muestras se homogenizaron hasta completa solubilidad con un Vortex, posteriormente los extractos fueron centrifugados a 18510 xg durante 15 min a 4°C (Hermle, Z 36 HK, Alemania). Se preparó 100 mL de solución madre de DPPH 0.2 mM (7.9 mg de DPPH aforando a 100 mL con metanol al 80 %), para generar los radicales libres DPPH⁺, la mezcla se mantuvo en agitación magnética durante 2 h en oscuridad total. Antes de iniciar la lectura de los extractos, el reactivo de DPPH⁺ se estandarizó a una absorbancia de 0.7 ± 0.01 utilizando metanol al 80 %. A 0.5 mL del sobrenadante se agregó 2.5 mL del reactivo DPPH⁺ estandarizado, se incubaron durante 1 h en ausencia de luz. Las muestras se leyeron a 517 nm con un espectrofotómetro (Jenway 6715, UK), el metanol fue utilizado como blanco. La actividad antioxidante se expresó como mg equivalentes de ácido gálico en 100 g de extracto y emulsión, de acuerdo a la siguiente ecuación. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

$$\text{Actividad antioxidante (mg AG/100 g)} = (\text{AG} * \text{V} * \text{DF} * 100) / (\text{Peso de la muestra (g)})$$

Donde:

CAA o AG = Concentración de ácido gálico de la curva estándar (mg/mL)

V = Volumen de muestra (mL)

DF = Factor de dilución de la muestra

6.6 Actividad antimicrobiana de extractos de propóleos

Se utilizaron cuatro cepas microbianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 43971) y *Candida albicans* (ATCC 1023). Las cepas se activaron en tubo con 10 mL de caldo Müller Hinton, incubadas a 37 °C durante 24 horas, esta

operación se realizó en un total de tres veces. Por último, se estandarizó la turbidez de los microorganismos a 0.5 en la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL).

La actividad antibacteriana fue por la técnica de difusión en agar por pozo (Montero-Recalde et al., 2018). Se colocó 1 mL de la suspensión microbiana ajustada a 0.5 en la escalada de McFarland, en una caja de Petri y se le adicionó 20 mL de agar Müller Hinton, el inóculo se homogenizó y se dejó solidificar, posteriormente se realizaron los pozos con un sacabocados estéril (5 mm). A partir del extracto puro, se prepararon diferentes diluciones (540 mg, 270 mg, 135 mg y 67.5 mg/mL) utilizando DMSO como diluyente. En los pozos se colocó 25 μ L de cada una de las concentraciones, control negativo (DMSO) y control positivo (Solución antibiótico-antimicótico 100x: 10,000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomycin y 25 μ g de anfotericina B por mL (Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V. A5955)). Las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 h, todos los análisis fueron por triplicado. Para la actividad inhibitoria, se midió el diámetro de los halos de inhibición (mm) con un vernier.

6.7 Análisis de estadístico

Para la primera etapa de la investigación se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados están expresados en la media \pm desviación estándar. Cuando ANOVA presento diferencias significativas ($p \leq 0.05$), se utilizó la técnica de comparación de medias de Tukey. Todos los análisis se realizaron utilizando el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.11 (Stat Point Technologies, Inc.).

Para la segunda etapa de la investigación, los resultados de cada una de las variables de estudio (expresados por media \pm desviación estándar) se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía y comparación de medias por la prueba de Tukey, con un nivel de significancia ($p \leq 0.05$). Todos los análisis se realizaron utilizando el software SAS versión 9.22 para Windows (9.22, Institute Inc., Cary, NC, USA).

7. Resultados y Discusión

A continuación, se hace la descripción de los resultados de la etapa 1 de la investigación.

7.1 Obtención de extractos

7.1.1 Rendimiento

El método de extracción no influyó en el rendimiento de los extractos, sin embargo, el lugar de procedencia del propóleo si influye en el rendimiento, esto podría deberse al tipo de vegetación en la que las abejas recolectan el propóleo. Por otra parte, se obtuvieron rendimientos muy elevados, teniendo un rango de 63.84 al 71.54 % (Figura 8). El propóleo de San Jerónimo Tecoaht fue el que presentó en el mayor rendimiento (71.34 a 71.54 %), además no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en el método de extracción. Por otra parte, el propóleo procedente de San Pedro Ocopetatillo fue el de menor rendimiento (63.84 – 66.05 %), y de igual forma el método de extracción no influyó en el rendimiento. En general, el propóleo crudo no es utilizado en la preparación de alimentos y medicamentos debido a su composición. Es importante considerar que el rendimiento de los extractos puede variar, debido a diferentes factores, tales como; el método de extracción (maceración, Soxhlet, extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, fluidos supercríticos con CO₂ y altas presiones), naturaleza del solvente (de acuerdo a su polaridad; baja, media o alta), relación o proporción de solvente, tiempo y temperatura de extracción (Šuran et al., 2021; Bankova et al., 2021). Los extractos de esta investigación presentaron un rendimiento del 63.8 al 71.5%, siendo superior al 2.57 a 22.67 % de diversas muestras de propóleos (Bayram et al., 2018) y el 18.2% (Soltani et al., 2020).

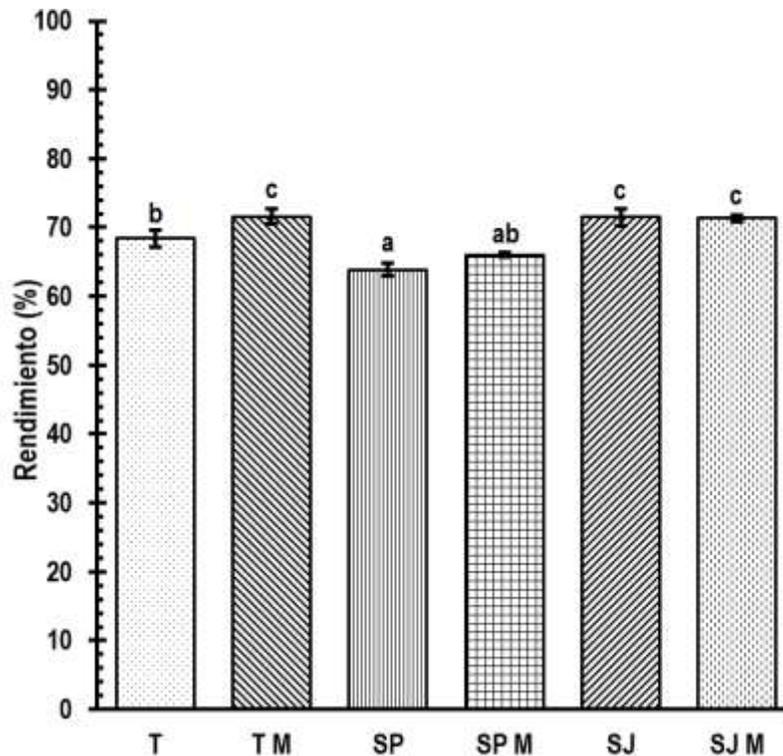


Figura 8. Rendimiento de extractos de propóleos, provenientes de tres municipios de la Cañada oaxaqueña y dos métodos de extracción (T= Teotitlán de Flores Magón, Ultrasonido; T M = Teotitlán de Flores Magón, Maceración; SP= San Pedro Ocopetatillo, Ultrasonido; SP M = San Pedro Ocopetatillo, Maceración; SJ= San Jerónimo Tecóatl, Ultrasonido; SJ M = San Jerónimo Tecóatl, Maceración).

7.2. Comportamiento de compuestos bioactivos durante la digestión *in vitro*

7.2.1 Fenoles totales

En la tabla 4, se observa el contenido de fenoles totales en los extractos de propóleos, así como en las diferentes etapas de la digestión *in vitro*: fase gástrica (FG), fase intestinal (FI) y fase intestinal después de ebullición (FIE). En general, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en el contenido de fenoles totales en los diferentes extractos de propóleos y métodos de obtención. El contenido de compuestos fenólicos fue de 30,824.9 a 3,4406.6 mg EAG/100 g. Hubo diferencia significativa en los propóleos T y T M, teniendo un mayor contenido de fenoles el tratamiento por ultrasonido (33,433.3 mg EAG/100 g). Sin embargo, los tratamientos SP y SP M y SJ y SJ M no se vieron afectados por el método de obtención. Por lo tanto, el uso del ultrasonido puede ser una excelente opción para la

obtención de extractos de propóleos, reduciendo su tiempo de obtención. Durante la digestión *in vitro* (FG), hubo una disminución alrededor del 80 % en el contenido de fenoles totales en todos los tratamientos, esto podría indicar que el pH ácido o la pepsina afectan directamente a estos compuestos. Sin embargo, en la siguiente etapa de la digestión (FI y FIE) los fenoles se mantuvieron constantes. El contenido de fenoles al final de la digestión fue de 6,958.5 a 8,208.2 mg EAG/100 g.

Tabla 4. Comportamiento de los fenoles totales durante la digestión *in vitro* de diferentes extractos de propóleos

Fase	Contenido de fenoles totales (mg EAG/100 g)					
	T	T M	SP	SP M	SJ	SJ M
Ext	33433.3 ± 293.9 ^{aA}	31642.4 ± 1110.0 ^{aB}	33316.5 ± 178.4 ^{aA}	34406.6 ± 116.7 ^{aA}	31253.1 ± 233.5 ^{aB}	30824.9 ± 526.6 ^{aB}
FG	7262.6 ± 189.9 ^{bB,C}	6746.7 ± 321.1 ^{bA}	6921.9 ± 87.5 ^{bA,B}	7476.7 ± 58.3 ^{bC}	7447.5 ± 87.5 ^{bC}	7291.8 ± 73.4 ^{bB,C}
FI	7572.8 ± 245.2 ^{bA,B}	7245.8 ± 88.1 ^{bA}	7187.4 ± 245.2 ^{bA}	7315.9 ± 88.1 ^{bA}	7374.3 ± 123.0 ^{bA}	8098.4 ± 455.5 ^{bB}
FIE	7273.8 ± 157.9 ^{bA}	7495.8 ± 420.4 ^{bA}	6958.5 ± 20.2 ^{bA}	7180.4 ± 0.0 ^{cA}	7472.4 ± 438.1 ^{bA}	8208.2 ± 72.9 ^{bB}

Diferentes letras minúsculas en las columnas representan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. Diferentes letras mayúsculas en las filas representan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. Ext = Extracto, FG= Fase Gástrica, FI= Fase Intestinal, FIE= Fase Intestinal después de Ebullición, T= Teotitlán de Flores Magón, Ultrasonido; T M = Teotitlán de Flores Magón, Maceración; SP= San Pedro Ocopetatillo, Ultrasonido; SP M = San Pedro Ocopetatillo, Maceración; SJ= San Jerónimo Tecóatl, Ultrasonido; SJ M = San Jerónimo Tecóatl, Maceración

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana, los propóleos que se comercialicen en México deberán tener un mínimo de 5,000 mg EAG/100 g de compuestos fenólicos (NOM, 2017). Los propóleos analizados presentan un contenido de fenoles totales de 30,824.9 a 34,406.6 mg EAG/100 g, cumpliendo así con la normatividad mexicana. Además, estos resultados son superiores a los reportados en extractos etanólicos de propóleos provenientes de China (8,934. 3 a 20,178.6 mg EAG/100 g). Dichos extractos fueron obtenidos con ultrasonido, y la diferencia en el contenido de fenoles totales podría estar relacionada con el tipo de vegetación donde las abejas recolectaron el propóleo, la época de recolección, así como diversos factores ambientales (Ding et al., 2020; Mountford-McAuley et al., 2021). Extractos etanólicos (70 %) de propóleos provenientes de Turquía presentan un contenido de fenoles totales muy variable que va de 2,748 a 19,970 mg EAG/100 g, los autores mencionan que dicha variabilidad está asociada al origen geográfico de los propóleos, además

dichos valores son inferiores a los de esta investigación (Ozidal et al., 2019). Por otra parte, extractos acuosos de propóleos de Algerian presentan un contenido de fenoles totales de 9,688.3 a 45,883.3 mg EAG/100 g, la variación fue principalmente por el lugar de procedencia de los propóleos (Soltani et al., 2021). Existen diversos métodos para la purificación de extractos, los cuales pueden influir en el contenido de compuestos bioactivos. En la elaboración de extractos de propóleos de Grecia, utilizaron cuatro métodos de purificación, obteniendo un contenido de fenoles totales de 11,385 a 29,811 mg EAG/100 g, siendo la centrifugación el método más efectivo (Graikini et al., 2019). El contenido de fenoles totales en extractos etanólicos de propóleos de Turquía fue de 25,000 mg EAG/100 g, sin embargo, al final de la digestión *in vitro* solo el 8.9 % eran biodisponibles, cabe hacer mención, que la digestión *in vitro* fue realizada en propóleo crudo (Ozidal et al., 2019), la baja biodisponibilidad de los fenoles podría deberse a las condiciones ácidas y posibles reacciones de isomerización de los compuestos fenólicos durante el proceso de digestión (Turkut et al., 2019). La biodisponibilidad de los extractos al final de digestión fue del 20.88 al 26.62 %. Por lo antes mencionado, es importante buscar alternativas que ayuden a proteger estos compuestos, para que se encuentren disponibles para el organismo y de esta forma ejercer beneficios a la salud.

7.2.2 Flavonoides totales

Los extractos de propóleos de Teotitlán de Flores Magón, presentaron el mayor contenido de flavonoides con un rango de 18,107.7 a 19,523.2 mg EQ/100 g, seguidos por los extractos de San Pedro Ocopetatillo con 3,361.0 a 4,152.3 mg EQ/100 g y los extractos con menor contenido fueron los de San Jerónimo Tecoaht con 2,859.8 a 3,237.9 mg EQ/100 g (Tabla 5). Todos los extractos obtenidos por ultrasonido presentan el mayor contenido de flavonoides totales. El rango de flavonoides totales de los extractos fue de 2,859 a 19,523 mg EQ/100 g de propóleo, estos resultados son superiores a los propuestos por la normatividad mexicana (mín. 500 mg EQ/100 g). Diversas investigaciones reportan un contenido de flavonoides totales de: 3,823 a 4,745 mg EQ/100 g (Graikini et al., 2019); 304.7 a 527.3 mg EQ/100 g (Soltani et al., 2021); 16,622 a 51,977 mg EQ/100 g (Ding et al., 2020); 1,100 a 15,000 mg EQ/100 g (Gardini et al., 2018); 4,946.5 mg EQ/100 g (Mouhoubi-Tafinine et al., 2016); 55,758 mg EQ/100 g (Soltani et al., 2020). Como se observa, el contenido de flavonoides es muy variable, por consiguiente, la actividad biológica podría variar. Como se mencionó anteriormente,

la composición de compuestos fenólicos (flavonoides) depende de factores como el origen floral y geográfico. Por otra parte, durante la digestión *in vitro*, en cada una de las fases el contenido de flavonoides se fue modificando. Al final de digestión, los tratamientos SJ y SJ M fueron los más afectados con una reducción mayor al 98 %, T y T M presentaron una reducción de 91.6 %. La biodisponibilidad de los flavonoides totales de nuestros extractos al final de la digestión *in vitro* fue de 0.68 al 9.36 %. Por lo tanto, se puede deducir que el proceso de digestión afecta negativamente la biodisponibilidad de compuestos bioactivos (flavonoides) de los extractos de propóleos, por consiguiente, se podrían afectar sus propiedades funcionales. Es importante buscar alternativas para la protección de los compuestos bioactivos durante las condiciones gastrointestinales.

Tabla 5. Comportamiento de los flavonoides totales durante la digestión *in vitro* de diferentes extractos de propóleos.

Fase	Contenido de flavonoides totales (mg EQ/100 g)					
	T	T M	SP	SP M	SJ	SJ M
Ext	19523.2 ± 0.0 ^{aE}	18107.7 ± 108.8 ^{aD}	4152.32 ± 46.1 ^{aC}	3361.03 ± 39.5 ^{aB}	3237.9 ± 82.4 ^{aB}	2859.8 ± 82.4 ^{aA}
FG	1170.4 ± 0.0 ^{dA}	1258.3 ± 57.8 ^{cA}	741.8 ± 32.9 ^{bB}	670.4 ± 9.5 ^{bB}	340.6 ± 25.1 ^{bC}	412.1 ± 49.4 ^{bC}
FI	1345.2 ± 39.5 ^{cA}	1325.4 ± 39.5 ^{cA}	553.9 ± 0.0 ^{cB}	184.6 ± 30.2 ^{dD}	296.7 ± 0.0 ^{bC}	487.9 ± 11.4 ^{bB}
FIE	1628.7 ± 11.4 ^{bA}	1496.8 ± 11.4 ^{bB}	389.0 ± 11.4 ^{dC}	296.7 ± 0.0 ^{cD}	59.3 ± 0.0 ^{cE}	19.7 ± 0.0 ^{cF}

Diferentes letras minúsculas en las columnas representan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. Diferentes letras mayúsculas en las filas representan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. Ext = Extracto, FG= Fase Gástrica, FI= Fase Intestinal, FIE= Fase Intestinal después de Ebullición, T= Teotitlán de Flores Magón, Ultrasonido; T M = Teotitlán de Flores Magón, Maceración; SP= San Pedro Ocopetatillo, Ultrasonido; SP M = San Pedro Ocopetatillo, Maceración; SJ= San Jerónimo Tecóatl, Ultrasonido; SJ M = San Jerónimo Tecóatl, Maceración

7.3 Actividad antioxidante durante la digestión *in vitro*

La capacidad antioxidante (ABTS⁺) de los extractos fue mayor en los extractos obtenidos por maceración, con excepción de los tratamientos SJ y SJ M, donde no hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) debido al método de extracción. Los extractos de propóleos por el método ABTS⁺ y DPPH⁺ presentaron una fuerte actividad antioxidante, siendo de 8,333.2 a 16,530.2 y 13,368.3 a 20,706.4 mg EAG/100 g respectivamente (Tabla 6). Podemos observar que la actividad antioxidante está directamente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos (Tabla 4 y 5), y la diferencia significativa ($p \leq 0.05$) que presentan los extractos se debe principalmente al lugar de recolección de los propóleos (Gardini et al., 2018) y en algunos casos, al método de obtención. Por otra parte, se puede incrementar la actividad antioxidante de los extractos de propóleo, utilizando diversos métodos de purificación, siendo la centrifugación uno de los más efectivos (Graikini et al., 2019). Alrededor del mundo existen diversas investigaciones sobre las propiedades biológicas y caracterización de compuestos bioactivos en extractos de propóleos, con resultados muy prometedores. Los extractos obtenidos por el método asistido por ultrasonido presentan mejores propiedades biológicas que los extractos obtenidos por métodos tradicionales (Bakkaloglu et al., 2021; Ding et al., 2020) es por ello que, en los últimos años se ha convertido en el método más popular, en el área de la medicina, bioquímica, industria alimentaria, entre otros (Yuan et al., 2019). Por otra parte, el etanol es el mejor solvente de extracción, para la obtención de extractos de propóleos por ultrasonido (Cavalero et al., 2019). Sin embargo, durante la digestión *in vitro*, en la fase gástrica todos los extractos presentan una disminución en la actividad antioxidante: T 86 %, T M 89 %, SP 92 %, SP M 93 %, SJ 91 % y SJ M 91 %, esto podría indicar que las condiciones gástricas provocan algún tipo de hidrólisis o reacción con otros compuestos que afectan la capacidad antioxidante. Al final de la fase intestinal se ve un incremento de la capacidad antioxidante en todos los tratamientos, algunos de ellos presentan diferencia significativa ($p \leq 0.05$). En general, la capacidad antioxidante por DPPH⁺ es mayor que la capacidad antioxidante por ABTS⁺, en la fase gástrica hubo un incremento de la capacidad antioxidante por DPPH⁺ cercana al 50 %, probablemente por hidrólisis de compuestos fenólicos de mayor tamaño formando algunos de menor tamaño. Durante la digestión *in vitro*, la actividad antioxidante tanto por el método ABTS y DPPH se vio afectada significativamente, al igual que el contenido de compuestos fenólicos (fenoles totales y flavonoides). Al final de la digestión hubo una

disminución de la actividad antioxidante del 54.14 al 77.83 % para ABTS⁺ y del 84.21 al 98.09 % para DPPH⁺.

Tabla 6. Actividad antioxidante de extractos de propóleos y su comportamiento durante la digestión *in vitro*.

Fase	Actividad antioxidante ABTS ⁺ (mg EAG/100 g)					
	T	T M	SP	SP M	SJ	SJ M
Ext	8333.2 ± 355.7 ^{aA}	10793.8 ± 333.7 ^{aB}	14647.7 ± 578.0 ^{aC}	16530.2 ± 867.2 ^{aD}	13180.3 ± 933.8 ^{aC}	13002.4 ± 533.6 ^{aC}
FG	1133.4 ± 294.1 ^{aA}	1152.0 ± 462.8 ^{aA}	1126.0 ± 169.8 ^{aA}	1100.1 ± 222.3 ^{aA}	1100.1 ± 111.1 ^{aA}	1092.7 ± 128.3 ^{aA}
FI	3977.3 ± 607.6 ^{bA}	3779.7 ± 876.7 ^{bA}	3092.4 ± 3100.2 ^{bAB}	2827.4 ± 2964.5 ^{bB}	2899.3 ± 2358.4 ^{bB}	3856.0 ± 876.7 ^{aA}
FIE	3821.0 ± 2156 ^{bAB}	3812.0 ± 473.2 ^{bAB}	3996.2 ± 134.7 ^{bBC}	3663.8 ± 77.8 ^{bA}	4054.6 ± 473.2 ^{bBC}	4157.9 ± 1078.0 ^{bC}
Fase	Actividad antioxidante DPPH ⁺ (mg EAG/100 g)					
	T	T M	SP	SP M	SJ	SJ M
Ext	20706.4 ± 648.8 ^{bA}	18883.8 ± 1223.7 ^{bA}	19315.5 ± 299.5 ^{bA}	13368.3 ± 843.0 ^{bC}	17013.3 ± 83.0 ^{bB}	16773.5 ± 0.0 ^{bB}
FG	35817.7 ± 1438.8 ^{aAB}	39534.8 ± 2651.4 ^{aA}	29342.9 ± 1438.8 ^{bC}	38455.6 ± 1774.4 ^{aA}	36777.0 ± 1361.8 ^{aAB}	32580.3 ± 1648.4 ^{bBC}
FI	1471.9 ± 436.0 ^{aA}	3383.4 ± 0.0 ^{bB}	1203.4 ± 872.0 ^{bC}	1494.0 ± 251.7 ^{bC}	2366.1 ± 907.6 ^{bBC}	2656.7 ± 666.0 ^{bBC}
FIE	1813.8 ± 1572.0 ^{aA}	360.4 ± 251.0 ^{aA}	796.4 ± 666.0 ^{aA}	1232.4 ± 251.7 ^{aA}	2685.8 ± 1744.0 ^{aA}	1184.2 ± 755.2 ^{aA}

Diferentes letras minúsculas en las columnas representan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. Diferentes letras mayúsculas en las filas representan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. Ext = Extracto, FG= Fase Gástrica, FI= Fase Intestinal, FIE= Fase Intestinal después de Ebullición, T= Teotitlán de Flores Magón, Ultrasonido; T M = Teotitlán de Flores Magón, Maceración; SP= San Pedro Ocopetatillo, Ultrasonido; SP M = San Pedro Ocopetatillo, Maceración; SJ= San Jerónimo Tecóatl, Ultrasonido; SJ M = San Jerónimo Tecóatl, Maceración

7.4 Actividad antimicrobiana

En la figura 9, presenta la actividad antimicrobiana los seis extractos de propóleos obtenidos por ultrasonido y maceración, contra cuatro cepas patógenas. Cabe hacer mención, que la actividad antimicrobiana se evaluó en los extractos antes y al final de la digestión *in vitro*. Sin embargo, ningún tratamiento al final de la digestión *in vitro* simulada presentó actividad inhibitoria. Por otro lado, entre mayor concentración de extracto mayores halos de inhibición. La actividad inhibitoria está en función de los componentes del extracto, del lugar de procedencia del propóleo y en algunos casos por el método de extracción. Los tratamientos SP y SP M no presentaron actividad contra *S aureus*. La mayor inhibición para *S aureus* fue el tratamiento SJ, en este caso el tratamiento con ultrasonido fue mejor que la maceración (SJ M). Todos los tratamientos presentaron actividad inhibitoria para *C albicans*, además, esta cepa fue la que presentó los mayores halos de inhibición, por lo tanto, consideramos que estos extractos podrían ser una excelente fuente de compuestos bioactivos en la preparación de formulaciones para el control de infecciones urogenitales. Respecto a *E coli*, los tratamientos T y T M

presentaron la mayor actividad inhibitoria, seguido de los tratamientos SJ y SJ M, cabe hacer mención, que estos tratamientos no presentaron halos de inhibición en concentraciones menores a 270 y 135 mg/mL respectivamente, pudiéndose considerar como la concentración mínima inhibitoria. Además, los tratamientos SP y SP M no presentaron halos de inhibición en ninguna de las concentraciones evaluadas. Para *S typhimurium* todos los extractos presentaron halos de inhibición, siendo los más grandes los extractos obtenidos por maceración.

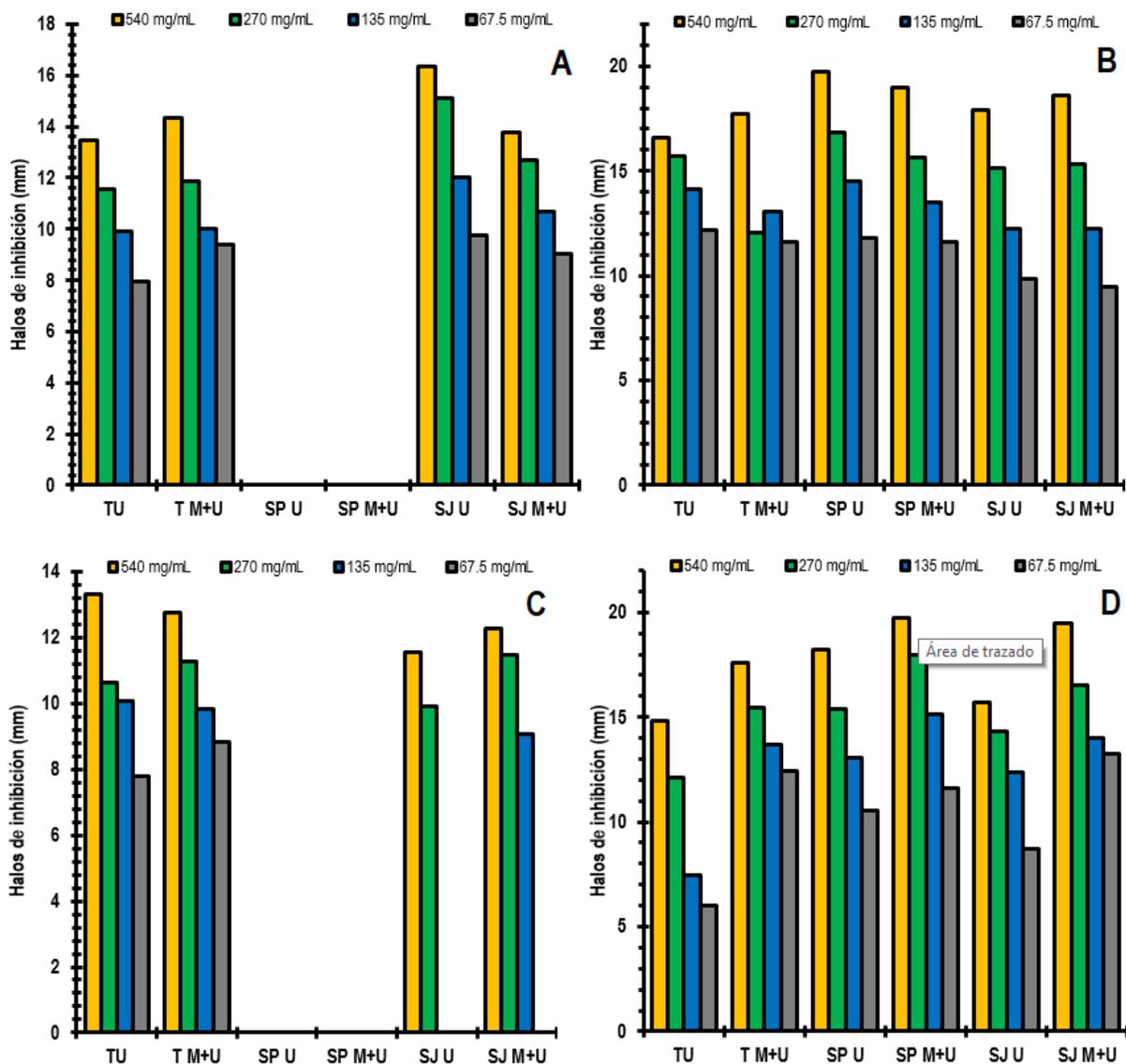


Figura 9. Actividad inhibitoria de extractos de propóleos contra diferentes cepas microbianas. A) *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709), B) *Candida albicans* (ATCC 1023), C) *Escherichia coli* (ATCC 25922) y D) *Salmonella typhimurium* (ATCC 43971).

Como se ha podido observar la actividad antimicrobiana de los extractos evaluados es variable y su efecto depende principalmente del lugar de procedencia más que por el método de extracción. Se ha propuesto que la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos es por dos vías: 1) Efecto directo sobre el microorganismo, afectando la permeabilidad de la membrana celular, la disrupción de membrana celular, disminución de la producción de ATP y disminución de la movilidad y 2) Estimulación del sistema inmunológico, activando las defensas naturales del organismo (Anjum et al., 2019; Przybulek y Karpiński, 2019). Existen diversos trabajos sobre la actividad antimicrobiana del propóleo, dichas investigación varían de acuerdo al tipo de microorganismo a evaluar (bacterias, mohos, levaduras, protozoos y virus), condiciones de extracción (método, temperatura, tipo de solvente, relación o proporción de solvente, etc.), así como del lugar de procedencia del propóleo (Shehata et al., 2020). Los extractos obtenidos por ultrasonido presentan actividad antimicrobiana contra cepas de; *S. aureus*, *E. coli*, *C. krusei*, *C. glaucosporioides*, *M. mucedo* y *A. solani*, siendo el ultrasonido un excelente medio para la obtención de extractos de propóleos (Pobiega et al., 2019). Los propóleos provenientes de Chile presentan actividad antibacteriana con cepas de *S. mutans*, además disminuye la formación de biopelículas (Veloz et al., 2019). Rivero-Cruz et al. (2020) mencionan que el propóleo proveniente de Guanajuato, México, presenta excelente actividad antibacteriana contra patógenos orales (*S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis* y *P. gingivalis*). Por último, se considera que los propóleos analizados, podrían ser utilizados en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas afecciones a la salud.

A continuación, se hace la descripción de los resultados de la etapa 2 de la presente investigación.

7.5 Obtención de extractos por ultrasonido

En la tabla 7, se muestran los resultados del contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de los extractos de propóleos, obtenidos por ultrasonido. El contenido de fenoles totales fue de 33,239.87 mg EAG/100 g para el extracto propóleos de Teotitlán de Flores Magón (T), de 32,836.30 mg EAG/100 g para San Pedro Ocopetatillo (SP) y de 32,582.44 mg EAG/100 g para San Jerónimo Tecoaht (SJ). Hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los extractos de propóleo de T y

SJ, esto podría deberse al tipo de vegetación y ubicación geográfica de los municipios, no se encontró diferencia entre SP y SJ. Peixoto et al. (2022) reportan un rango de 17,360 a 26,220 mg EAG/100 g en extractos de propóleos de dos regiones de Portugal, Ozdal et al. (2019) reportan valores máximos de 19,969.9 mg EAG/100 g en muestras de propóleos provenientes de diferentes regiones de Turquía, dichos resultados son inferiores a los nuestros. Por otra parte, Shakoury et al. (2022) reportan 40,200 mg EAG/100 g de extracto de propóleo provenientes de Irán, estos resultados son mayores a los nuestros, los autores refieren que el tamaño de partícula del propóleo influye durante el proceso de extracción, entre más pequeño sea el tamaño de partícula mejor interacción con el solvente y por lo tanto mayores rendimientos. El propóleo verde de Brasil presenta un alto contenido de compuestos fenólicos (31,640 a 53,390 mg EAG/100 g), la extracción asistida por ultrasonido mejora el rendimiento (Cavalaro et al., 2019). Rivero-Cruz et al., (2020) determinaron el contenido de fenoles totales en extracto etanólicos de propóleos provenientes del estado de Guanajuato, México, reportan un rango de 16,760 a 24,630 mg EAG/100 g, dichos resultados son inferiores a los que se estudiaron en esta investigación.

Tabla 7. Contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de extractos de propóleos provenientes de tres municipios de la cañada oaxaqueña.

Extracto	Fenoles mg EAG/100 g	Flavonoides mg EQ/100 g	ABTS ⁺ mg EAG/100 g	DPPH ⁺ mg EAG/100 g
T	33,239.87 ± 132.87 ^a	20,595.78 ± 276.86 ^a	8,694.37 ± 87.15 ^c	21,661.21 ± 789.19 ^a
SP	32,836.30 ± 446.06 ^{ab}	5,517.70 ± 997.13 ^b	14,318.40 ± 94.67 ^a	19,836.83 ± 513.26 ^b
SJ	32,582.44 ± 300.11 ^b	3,675.11 ± 17.75 ^c	14,012.89 ± 86.65 ^b	21,635.51 ± 513.26 ^a

Diferentes letras minúsculas en las columnas representan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. T = Extracto de propóleo de Teotitlán de Flores Magón, SP= Extracto de propóleo de San Pedro Ocopetatlillo, SJ= Extracto de propóleo de San Jerónimo Tecoaht

El contenido de flavonoides fue de 3,675.1 a 20,595.7 mgEQ/100 g (Cuadro 7), se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en todos los extractos. El mayor contenido lo presentó el extracto (T) y el menor contenido lo presentó el extracto (SJ). En la actualidad se han reportado alrededor de 140 flavonoides: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonas, dihidroflavonoles, isodihidroflavonas, etc., estos representan cerca del 50% del peso de los propóleos y están relacionados directamente con la actividad antimicrobiana (Kasote et al., 2022; Giampieri et al., 2022; Hossain et al., 2022). El contenido

de flavonoides totales en propóleos de Portugal es de 4,390 a 6,790 mgEQ/100 g (Peixoto et al., 2022). Ozdal et al. (2019) reportan valores de 3,073 a 29,175 mgEQ/100 g en muestras de propóleos de diferentes regiones geográficas de Turquía, algunos resultados similares a los nuestros y en algunas muestras superiores. Es importante enfatizar que los propóleos son ricos en compuestos bioactivos siendo los polifenoles y flavonoides los más abundantes, el contenido y composición depende de diversos factores, tales como; vegetación, tipo de floración, especie de abejas, época del año, zona geográfica y condiciones climáticas (Kasote et al., 2022; Mountford-McAuley et al., 2021).

La capacidad antioxidante (ABTS⁺) presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en los tres extractos (T, SP y SJ), con valores de 8,694.3, 14,318.4 y 14,012.8 mg EAG/100 g respectivamente (Cuadro 7). Para DPPH⁺ los resultados fueron de 21,661.2, 19,836.8 y 21,635.5 mg EAG/100 g para los extractos T, SP y SJ respectivamente (Tabla 7). Los resultados para DPPH⁺ son superiores a los de ABTS⁺, esto podría deberse principalmente a la composición fitoquímica de los propóleos, a la solubilidad de los compuestos químicos y polaridad de los solventes utilizados (Hossain et al., 2022). Okińczyc et al. (2021) reportan una actividad antioxidante (DPPH⁺) máxima de 6447 mg EAG/100 g en propóleos provenientes de Euro-Asia, estos autores enfatizan que los flavonoides no están directamente relacionados con esta propiedad, sin embargo, nuestros resultados pueden estar los compuestos fenólicos (fenoles totales, flavonoides y entre otros fenólicos no flavonoides). Rivero-Cruz et al. (2020) refieren que México es un país megadiverso, por lo tanto, produce una gran variedad de propóleos, sin embargo, hace falta realizar estudios que validen o corroboren sus propiedades funcionales. Los propóleos de México son una fuente importante de compuestos bioactivos con excelente actividad antioxidante (Hernández et al., 2018).

7.6. Caracterización y estabilidad de emulsiones

7.6.1 Eficiencia de emulsión

Con base a la cuantificación de fenoles totales, la eficiencia de las emulsiones, con 5 % de extractos de propóleos, fue del 87.8 % para la emulsión con propóleos de Teotitlán de Flores Magón (ET), del 94.3 % para la emulsión con propóleos de San Pedro Ocopetatillo (ESPT) y del 97.8 % de eficiencia

para la emulsión con propóleos de San Jerónimo Tecoalt (ESJ), estos resultados evidencian una excelente eficiencia al momento de elaborar las emulsiones. Actualmente, hay poca o nula información científica relacionada con la elaboración de emulsiones de propóleos similares a nuestras formulaciones. Seibert et al. (2019) reportan nanoemulsiones con el 1 % de extracto propóleos y 5% de aceite de maíz, en nuestras formulaciones utilizamos 5 % de extracto de propóleo y 5 % de aceite esencial de naranja, cabe hacer mención que estos autores no analizaron la eficiencia de emulsión. Las emulsiones dobles de propóleos, con etilcelulosa presenta una eficiencia de emulsión del 80.3 % (Paulo et al., 2021). Sin embargo, hay algunas publicaciones relacionadas con la encapsulación y nanoencapsulación de propóleos, utilizando diferentes polímeros. Shakoury et al. (2022) reportan una eficiencia de encapsulación del 64.3 al 84 %, en nanopartículas de propóleos con proteína de suero. Durante el proceso de encapsulado de propóleo rojo de Brasil, la temperatura de secado, disminuyo un 37 % el contenido de fenoles totales, por lo tanto, se obtuvo una eficiencia máxima de encapsulación del 63 % (Saliba et al., 2023). Ligarda-Samanez et al. (2023) reportan baja eficiencia de encapsulación (20.93 al 58.64 %), cuando se utiliza maltodextrinas, goma tara y almidón nativo modificado de papa, como material de pared, en encapsulación por secado por aspersion. Por otra parte, la utilización de proteína de arroz y chícharo, presentan excelente eficiencia en la elaboración de nanoencapsulados con propóleos (90.2 y 89.25 % respectivamente), estos resultados son muy similares a los nuestros (Jansen-Alves et al., 2018).

7.6.2 Tamaño de partícula

En la figura 10, se muestran los resultados del tamaño de gota de emulsiones que contiene 5 % de extracto de propóleo proveniente de tres municipios de la cañada oaxaqueña. El tamaño de gota oscilo entre los 322.5 a 463.9 nm, por esta razón no podemos definir las como nanoemulsiones (se le conoce como nanoemulsión a las dispersiones, monodispersas con un tamaño de gota entre 20 a 200 nm) Seibert et al. (2019) reportan tamaños de gota menos a 65.2 nm en emulsiones de propóleos, utilizando aceite de maíz y 1% de extracto de propóleo. Ligarda-Samanez et al. (2023) reportan un tamaño de partícula máximo de 430.8 nm en microencápsulados de propóleos con una mezcla de maltodextrinas, gomas tara y almidón modificado de papa. El uso de ovoalbúmina como material de pared, genera microcápsulas de 6.72 a 6.87 μm , estos valores son superiores a los nuestros (Jansen-

Alves et al., 2023). Datos similares son reportando por Baysan et al. (2021) (1.42 a 52.75 μm , utilizando una mezcla de carbohidratos y proteínas) enfatizan que el material de pared juega un papel importante en el tamaño de partícula, así como las condiciones de secado de las microcápsulas de propóleos. Por otra parte, Paulo et al. (2021) menciona que la cantidad de extracto de propóleo no se relaciona con el tamaño de partícula, sin embargo, las condiciones de elaboración de las emulsiones (Tipo de emulsificantes, tiempo de emulsión, velocidad de emulsión, tiempo y velocidad de evaporación del solvente, tipo de solvente, etc.) influyen directamente (Syukri et al., 2021).

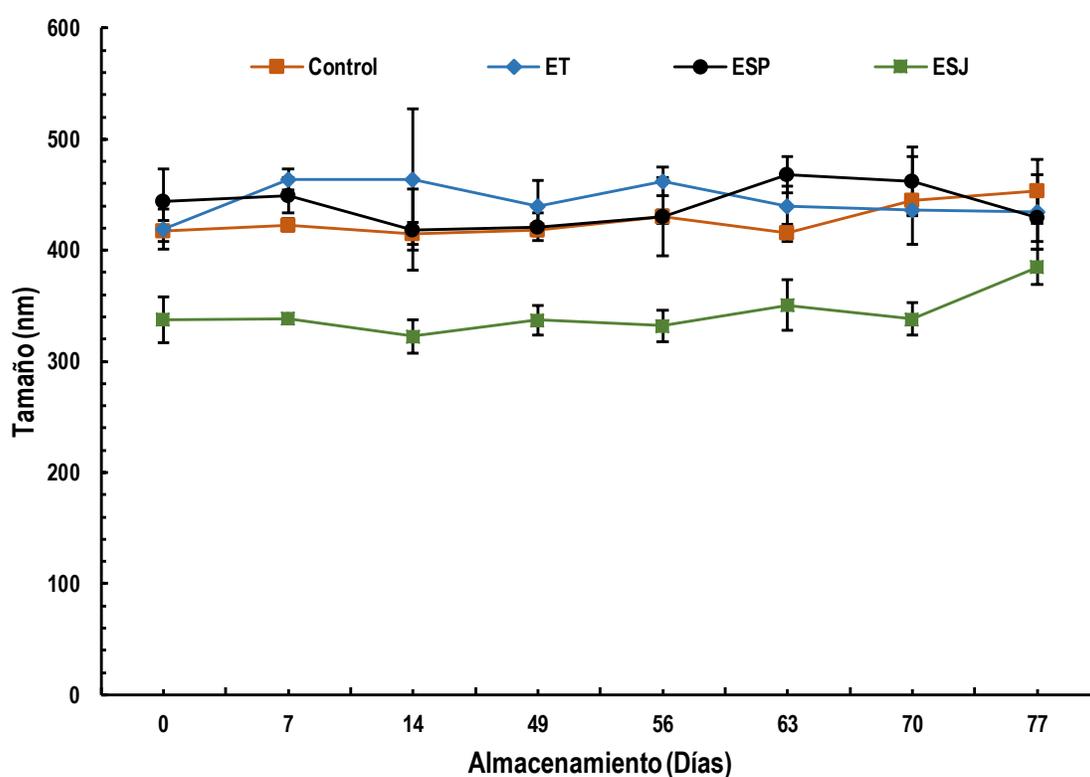


Figura 10. Estabilidad del tamaño de gota (nm) de emulsiones con extracto de propóleos, durante su almacenamiento durante 77 días a 4 °C.

7.6.3 Potencial Zeta

En la figura 11, se presentan los resultados del potencial Z de las emulsiones que contiene 5% de extracto de propóleo proveniente de tres municipios de la cañada oaxaqueña. Al final del

almacenamiento no hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto el potencial Z, los valores para el Control, ET, ESP y ESJ fueron de -31.5, -31.0, -28.2 y -29.6 mV respectivamente. Se considera que una emulsión es estable, siempre y cuando su potencial Z sea superior a ± 30 mV (Syukri et al., 2021; Seibert et al., 2019), los autores, reportan valores de -11.53 a -12.77 mV, dichos valores reflejan baja estabilidad de sus emulsiones. Con base al potencial Z (-27.2 a -38.7 mV) las microcápsulas de propóleo, con maltodextrinas, goma tara y almidón modificado, se consideran de estabilidad media (Ligarda-Samanez et al., 2023). Sin embargo, Shakoury et al. (2022) consideran que las nanocápsulas de propóleo con proteína de suero soy más estables con valores de +27.5 a -24.61 mV. Valores bajos de potencial Z (-6.16 a 0.42 mV) en microencapsulados de propóleo utilizando proteínas como material de protección, puede atribuirse a la deficiente formación de enlaces cruzados, debido a la deficiente desnaturalización de las proteínas durante el proceso de encapsulado (Baysan et al., 2021). Por lo tanto, podemos afirmar que estas emulsiones presentan buena estabilidad durante 77 días de almacenamiento a 4°C.

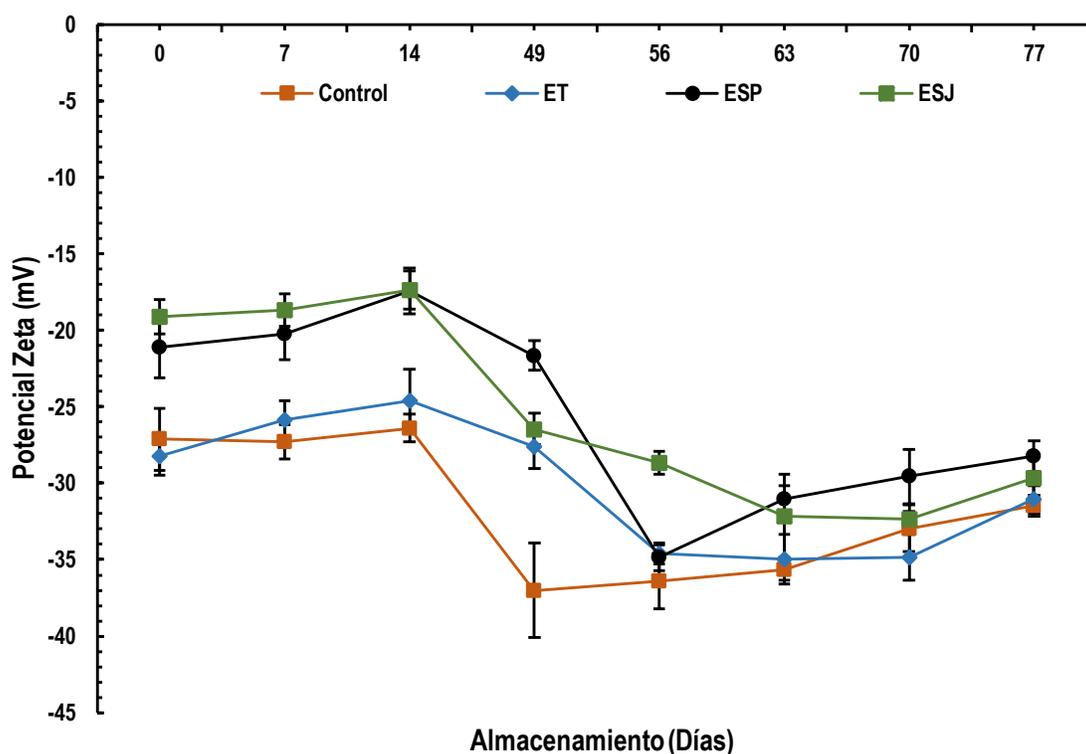


Figura 11. Potencial Z (mV) de emulsiones con extracto de propóleos, durante su almacenamiento durante 77 días a 4 °C.

7.6.4 Conductividad eléctrica

En la figura 12, se muestran los resultados de la conductividad eléctrica de emulsiones que contiene 5% de extracto de propóleo proveniente de tres municipios de la cañada oaxaqueña. El control al día 0 tuvo una conductividad eléctrica de 22.7 y al final del almacenamiento fue de 30.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$, la emulsión ET de 23.7 a 28.4 $\mu\text{S}/\text{cm}$, ESP de 22.4 a 28.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y ESJ 31.63 a 39.4 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Se observa que conforme pasan los días de almacenamiento hay un incremento en la conductividad eléctrica. Seibert et al. (2019) reporta valores de conductividad eléctrica de 36.47 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en nanoemulsiones de propóleos al 1 %.

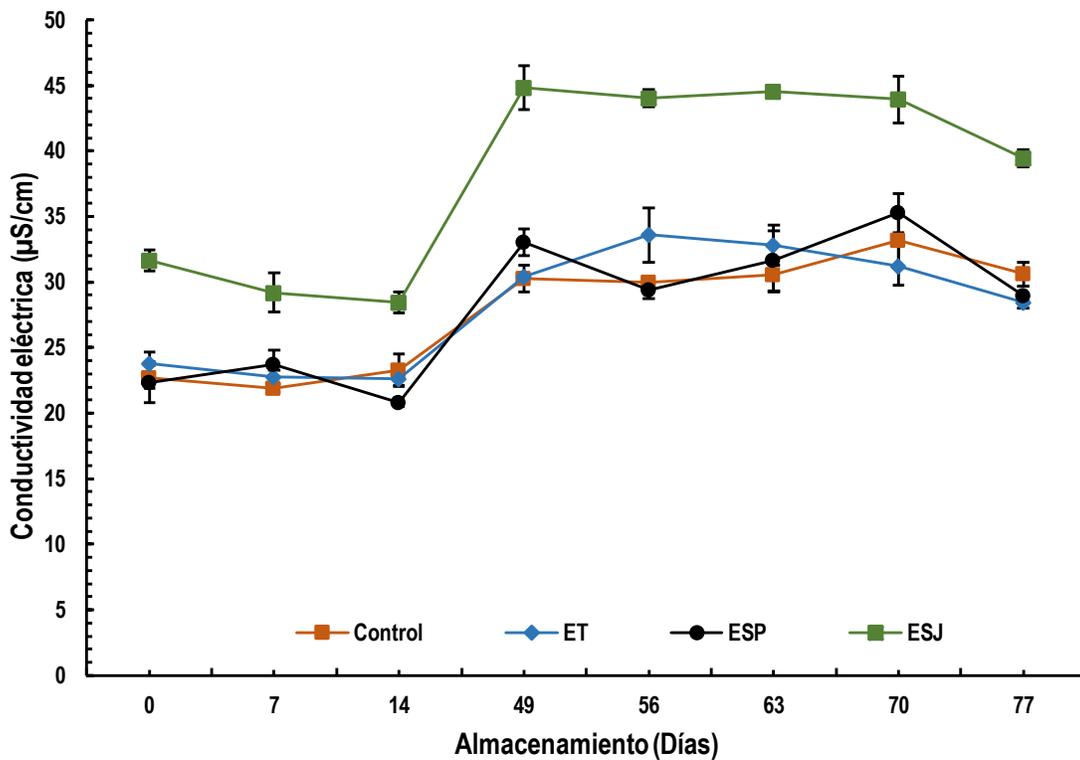


Figura 12. Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) de emulsiones con extracto de propóleos, durante su almacenamiento durante 77 días a 4 °C.

7.7 Comportamiento de compuestos bioactivos durante la digestión *in vitro* de las emulsiones

7.7.1 Fenoles totales

En la tabla 8, se presentan los resultados del contenido de fenoles totales durante la digestión *in vitro* simulada de las emulsiones con 5 % de extractos de propóleos, desde el día 0 a los 77 días de almacenamiento a 4 °C. Durante la fase gástrica (GP) el contenido de fenoles totales al día cero fue de 1,488.7 a 1,531.8 mg GAE/100 g, no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre las emulsiones con 5% de extracto de propóleos, a los 77 días de almacenamiento a 4 °C el contenido de fenoles totales fue de 1,310.3 a 1,428.7 mg GAE/100 g tampoco se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) estos resultados indican que el contenido de fenoles totales no se vio afectado por las condiciones gástricas. Durante la fase intestinal (PI) al día 0, se aprecia un incremento en el contenido de fenoles totales (1,509.3 a 1,769.9 mg GAE/100 g), sin embargo, se encontró diferencia significativa ($p\leq 0.05$). Un comportamiento similar se observó al día 77 de almacenamiento a 4 °C, donde el contenido de fenoles totales fue de 1,566.3 a 1,815.1 mg GAE/100 g. La digestión *in vitro* simulada es considerado un ensayo de modelo útil para conocer el comportamiento durante la digestión *in vitro* humana, a pesar que pueden influir otros factores (Ozidal et al., 2019). Las condiciones gastrointestinales tales como el pH y el contenido de enzimas, pueden reaccionar con los compuestos fenólicos, provocando una disminución asociada a la isomerización e hidrolisis de los compuestos (Saliba et al., 2023). Las emulsiones aceite-agua empleadas en la protección de extractos liposolubles, presentan mejor biodisponibilidad, debido a la alta solubilidad de estos compuestos (Lara-Abia et al., 2023). Turkut et al. (2019) reportan una disminución del 87 al 91 % de disminución de los compuestos fenólicos en extractos de propóleos durante la digestión gastrointestinal. Jansen-Alves et al. (2023) reportan una reducción de compuestos fenólicos durante la fase gástrica de microcápsulas con extractos de propóleos, esto posiblemente por el ataque enzimático que sufren las proteínas utilizadas como material de pared. La biodisponibilidad de compuestos fenólicos en nanocápsulas con extracto de propóleo rojo de Brasil, se vio afectada entre un 45 al 80 % durante la digestión *in vitro* (Alencar et al., 2023). Por lo antes mencionado, podemos afirmar que la emulsión ayuda a proteger a los compuestos bioactivos y por consiguiente mejor biodisponibilidad de los compuestos.

Tabla 8. Contenido de fenoles totales y flavonoides totales durante la digestión *in vitro* simulada de emulsiones con extractos de propóleos.

Trat.	Fenoles mg GAE/100 g		Flavonoides mg QE/100 g	
	Día 0	Día 77	Día 0	Día 77
GPET	1488.73 ± 37.42 ^{abA}	1428.76 ± 17.05 ^{abA}	1196.14 ± 35.10 ^{aB}	1107.45 ± 32.50 ^{aB}
GPESP	1531.83 ± 18.73 ^{abA}	1409.04 ± 108.32 ^{abA}	263.20 ± 3.95 ^{bcdB}	243.68 ± 3.66 ^{bcdB}
GPESJ	1512.65 ± 17.29 ^{abA}	1310.39 ± 72.42 ^{abA}	215.96 ± 3.04 ^{cdB}	199.95 ± 2.82 ^{dB}
PIET	1650.41 ± 122.13 ^{abA}	1599.67 ± 25.66 ^{abA}	926.91 ± 85.92 ^{abcB}	979.99 ± 90.84 ^{abB}
PIESP	1769.99 ± 10.61 ^{aA}	1815.72 ± 11.32 ^{aA}	252.76 ± 1.87 ^{bcdB}	320.68 ± 2.37 ^{bcdB}
PIESJ	1509.35 ± 39.77 ^{abA}	1566.33 ± 54.81 ^{abA}	165.53 ± 5.60 ^{dB}	218.77 ± 7.39 ^{cdB}

Diferentes letras minúsculas en las columnas representan una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. Diferentes letras mayúsculas en las filas representan una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. GPET = Fase gástrica emulsión con extracto de propóleo de Teotitlán de Flores Magón, GPESP = Fase gástrica emulsión con extracto de propóleo de San Pedro Ocopetatlillo, GPESJ = Fase gástrica emulsión con extracto de propóleo de San Jerónimo Tecoaht, PIET = Fase intestinal emulsión con extracto de propóleo de Teotitlán de Flores Magón, PIESP = Fase intestinal emulsión con extracto de propóleo de San Pedro Ocopetatlillo, PIESJ = Fase intestinal emulsión con extracto de propóleo de San Jerónimo Tecoaht.

7.7.2 Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales en las emulsiones al día 0, después de la digestión gástrica fue de 215.9 a 1,196.1 mg QE/100 g de emulsiones con 5 % de extracto de propóleos, presentando diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en las emulsiones ET con ESP y ESJ (Tabla 8), esto debido principalmente por la composición y lugar de procedencia de los propóleos. A los 77 días de almacenamiento a 4 °C el contenido de flavonoides totales durante la fase gástrica (GP), no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el día 0 y al final del tiempo de almacenamiento, en este caso, se puede decir que los flavonoides no se ven afectados por las condiciones gástricas, así como el tiempo de almacenamiento. Wojtunik-Kulesza et al. (2020) refieren que durante la acción enzimáticas intestinal, podría haber un incremento de los compuestos bioactivos. Durante la fase intestinal (PI) en el día 0, se aprecia un comportamiento similar al de los fenoles totales, con una pequeña disminución del contenido de flavonoides totales. La emulsión ESJ presento el menor contenido (165.5 mg QE/100 g), además presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con ET y ESP. Al final del almacenamiento (77 días a 4 °C) no hubo diferencia significativa con los valores de la fase gástrica, esto podría indicarnos que las condiciones intestinales no afectan a los flavonoides de las emulsiones que contienen 5% de extracto de propóleos, provenientes de tres municipios de la cañada oaxaqueña. Al final de la digestión gastrointestinal se incrementó del 15 al 17 % la bioaccesibilidad de los flavonoides presentes en

propóleos rojo de Brasil nanoencapsulados (Alencar et al., 2023). Ozdal et al. (2019) reportan un aumento en el contenido de flavonoides totales en extractos de propóleos al final de la digestión intestinal. Por otra parte, Yesiltas et al. (2014) mencionan que después de la digestión gastrointestinal de extractos de propóleos, la bioaccesibilidad de los flavonoides totales se reduce hasta 0.2 %. Por lo antes mencionado, se deduce que las emulsiones realizadas cumplen con la función de proteger a los flavonoides de las condiciones gastrointestinales hasta 77 días de almacenamiento a 4 °C.

7.8 Actividad antioxidante durante la digestión *in vitro* de las emulsiones

En la tabla 9, se presentan los resultados sobre la actividad antioxidante (ABTS⁺ y DPPH⁺), durante la digestión *in vitro* de emulsiones con 5 % de extracto de propóleos provenientes de tres municipios de la cañada oaxaqueña. Durante la fase gástrica se observó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las emulsiones, asociada principalmente al lugar de procedencia de los propóleos, la emulsión con menor actividad antioxidante por el método ABTS⁺ la presentó la emulsión TGET con 407.8 ± 6.4 mg GAE/100 g, además se observa que al final del almacenamiento (77 días a 4 °C) no hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para cada una de las emulsiones, dicho comportamiento es similar al del contenido de fenoles totales (Tabla 8). Por otra parte, la actividad antioxidante por el método DPPH⁺ fue mayor que ABTS⁺, por lo que no se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en ninguna de las emulsiones, en la fase gástrica e intestinal, este comportamiento se presentó al día 0 hasta los 77 días de almacenamiento a 4 °C, por lo tanto se deduce que durante la digestión *in vitro* simulada los compuestos responsables de la actividad antioxidante no se ven afectados por las condiciones gástricas e intestinales, y que durante este tiempo las emulsiones permanecen estables. La actividad antioxidante en extractos de propóleo rojo de Brasil, microencapsulados disminuyó significativamente durante la digestión gastrointestinal simulada (Saliba et al., 2023), dichos resultados son muy similares a los reportado por Alencar et al. (2023), en encapsulados con extracto de propóleo rojo de Brasil, con diferentes materiales de pared. Por otra parte, Gomes et al. (2023) refieren que las microcápsulas con extracto de propóleo rojo de Brasil (diferente material de pared y tres métodos de encapsulación) presentan buena biodisponibilidad y la actividad antioxidante (ABTS⁺) no se vio afectada después 108 días de almacenamiento. Es importante destacar, que existen pocas investigaciones relacionadas con la estabilidad (tiempo de almacenamiento) de emulsiones con extractos de propóleos, así como, su

evaluación de la actividad antioxidante durante la digestión *in vitro* simulada. Por lo antes mencionado, se verifica que la actividad antioxidante de emulsiones con 5 % de extracto de propóleos proveniente de tres municipios de la cañada oaxaqueña permaneció estable hasta 77 días de almacenamiento a 4 °C.

Tabla 9. Actividad antioxidante durante la digestión *in vitro* simulada de emulsiones con extractos de propóleos.

Trat.	ABTS ⁺ mg GAE/100 g		DPPH ⁺ mg GAE/100 g	
	Día 0	Día 77	Día 0	Día 77
TGET	407.85 ± 6.45 ^{bcA}	367.72 ± 26.42 ^{cA}	850.30 ± 46.33 ^{aB}	853.69 ± 68.02 ^{aB}
TGESP	610.49 ± 14.55 ^{aA}	570.86 ± 19.60 ^{abA}	703.75 ± 42.55 ^{aB}	706.69 ± 64.77 ^{aB}
TGESJ	704.98 ± 14.68 ^{aA}	658.84 ± 3.42 ^{aA}	757.18 ± 49.40 ^{aB}	740.61 ± 68.02 ^{aB}
TIET	383.83 ± 12.20 ^{cA}	435.62 ± 3.82 ^{bcA}	1004.62 ± 45.53 ^{aB}	873.49 ± 74.73 ^{aB}
TIESP	649.25 ± 29.75 ^{aA}	560.51 ± 25.33 ^{abA}	685.21 ± 23.33 ^{aB}	747.56 ± 48.16 ^{aB}
TIESJ	669.92 ± 30.15 ^{aA}	570.40 ± 151.84 ^{abA}	831.53 ± 29.48 ^{aB}	820.67 ± 49.74 ^{aB}

Diferentes letras minúsculas en las columnas representan una diferencia significativa ($P < 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. Diferentes letras mayúsculas en las filas representan una diferencia significativa ($P < 0.05$) con una comparación de medias por la prueba de Tukey. GPET = Fase gástrica emulsión con extracto de propóleo de Teotitlán de Flores Magón, GPESP = Fase gástrica emulsión con extracto de propóleo de San Pedro Ocopetatlillo, GPESJ = Fase gástrica emulsión con extracto de propóleo de San Jerónimo Tecoalt, PIET = Fase intestinal emulsión con extracto de propóleo de Teotitlán de Flores Magón, PIESP = Fase intestinal emulsión con extracto de propóleo de San Pedro Ocopetatlillo, PIESJ = Fase intestinal emulsión con extracto de propóleo de San Jerónimo Tecoalt.

8. Conclusiones

El uso del ultrasonido en la elaboración de extractos etanólicos de propóleos, puede ser una excelente opción, debido a que proporciona mejores rendimientos, e incrementa su actividad biológica.

La digestión *in vitro*, reduce considerablemente el contenido de compuestos bioactivos de los extractos analizados; fenoles totales y flavonoides totales, por consiguiente, las propiedades funcionales también se vieron afectadas: actividad antioxidante y actividad antimicrobiana.

En la actividad antimicrobiana los halos de inhibición dependen principalmente de la concentración y el lugar de procedencia de los propóleos.

Los extractos de propóleos de los tres municipios de la cañada oaxaqueña, obtenidos por ultrasonido presentaron alto contenido de compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides totales), así como, excelente actividad antioxidante.

Los resultados muestran que la composición de compuestos bioactivos de los propóleos está en función del tipo de vegetación, floración, zona geográfica y factores climáticos.

Con base al contenido de fenoles totales, el proceso de emulsión fue excelente, con una eficiencia de emulsión 87.8 al 97.8%. Por otra parte, durante el almacenamiento (77 días a 4°C) las emulsiones presentaron muy buena estabilidad respecto al tiempo, con un tamaño de gota de 322.5 a 463.9 nm, un potencial Zeta de -31.5, -31.0 a -28.2 mV y una conductividad eléctrica de 22.7 a 30.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Durante la digestión *in vitro* simulada de las emulsiones con 5% de extracto puro de propóleos, el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y la actividad antioxidante no presentó diferencia significativa durante los 77 días de almacenamiento a 4°C. Por lo tanto, el proceso de emulsión cumplió la función de proteger a los compuestos bioactivos y por consiguiente su actividad biológica.

9. Bibliografía

- Afra, B., Mohammadi, M., Soleimani, M., & Mahjub, R. (2020). Preparation, Statistical Optimization, In Vitro Characterization and In Vivo Pharmacological Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles Encapsulating Propolis Flavonoids: A Novel Treatment for Skin Edema. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(7):1163-1176. doi:10.1080/03639045.2020.1779286.
- Ahangari, Z., Naseri, M., & Vatandoost, F. (2018). Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iranian Endodontic Journal*, 13(3):285–292. doi.org/10.22037/iej.v13i3.20994.
- Alencar, S.M., Sartori, A.G.O., Dag, D., Batista, P.S., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., & Kong, F. (2023). Dynamic gastrointestinal digestion/intestinal permeability of encapsulated and nonencapsulated Brazilian red propolis: Active compounds stability and bioactivity. *Food Chemistry*, 411. 135469. doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135469.
- Alenezi, S.S., Natto, M.J., Igoli, J.O., Gray, A.I., Fearnley, J., Fearnley, H., de Koning, H.P., & Watson, D.G. (2020). Novel flavanones with anti-trypanosomal activity isolated from Zambian and Tanzanian propolis samples. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, 14, 201–207. doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.10.011.
- Alvear, M., Santos, E., Cabezas, F., Pérez-SanMartín, A., Lespinasse, M., & Veloz, J. (2021). Geographic Area of Collection Determines the Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Three Extracts of Chilean Propolis. *Plants*, 10. 1543. doi.org/10.3390/plants10081543.
- Alencar, S.M., Sartori, A.G.O., Dag, D., Batista, P.S., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., & Kong, F. (2023). Dynamic gastrointestinal digestion/intestinal permeability of encapsulated and nonencapsulated Brazilian red propolis: Active compounds stability and bioactivity. *Food Chemistry*, 411. 135469. doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135469.
- Aminimoghadamfarouj, N., & Nematollahi, A. (2017). Propolis Diterpenes as a Remarkable Bio-Source for Drug Discovery Development: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1290. doi.org/10.3390/ijms18061290.
- Anjum, S.I., Ullah, A., Khan, K.A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M.A., Tahir, M., Ansari, M.J., Ghramh, H.A., Adgaba, N., & Dash, C.K. (2019). Composition and functional properties of

- propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7):1695–1703. doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants [Standardization of propolis extract and identification of principal constituents]. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49(6), 462–468.
- Aytekin, A. A., Tanrıverdi, S.T., Aydın Köse, F., Kart, D., Eroğlu, İ., & Özer, Ö. (2020). Propolis Loaded Liposomes: Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Journal of Liposome Research*, 30:1–26. doi:10.1080/08982104.2019.1599012.
- Bakkaloglu, Z., Arıcı, M., & Karasu, S. (2021). Optimization of ultrasound-assisted extraction of turkish propolis and characterization of phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activity. *Food Science and Technology*, 41(3):687–695. doi.org/10.1590/fst.14520.
- Bamidele., O.O., & Emmambux, M.N. (2020). Encapsulation of bioactive compounds by “extrusion” technologies: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(18):3100-318. doi.org/10.1080/10408398.2020.1793724.
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, 8. 28. doi.org/10.1186/1752-153X-8-28.
- Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: a review, *Journal of Apicultural Research*, 60(5): 734-743. doi.org/10.1080/00218839.2021.1901426.
- Bayram, N.E., & Gercek, Y.C. (2017). Major constituents of diferent propolis samples. *Jorunal of Biological Chemistry*. 45(4): 581-584.
- Bayram, N.E., Sorkun, K., Öz, G.C., Salih, B., & Topcu, G. (2018). Chemical characterization of 64 propolis samples from Hakkari Trukey. *Records of Natural Products*, 12(6):569-581. doi.org/10.25135/rnp.78.16.12.585.
- Baysan, U., Bastioğlu, A.Z., Coşkun, N.Ö., Takma, D.K., Balçık, E.Ü., Sahin-Nadeem, H., & Koç, M. (2021). The effect of coating material combination and encapsulation method on propolis powder properties. *Powder Technology*, 384: 332–34. doi:10.1016/j.powtec.2021.02.018.
- Bertoni, S., Albertini, B., & Passerini, N. (2019). Spray congealing: An emerging technology to prepare solid dispersions with enhanced oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Molecules*, 24(19). 3471. doi.org/10.3390/ molecules24193471.

- Bouchelaghem, S. (2022). Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4):1936–46. doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.063.
- Boufadi, Y. M., Van Antwerpen, P., Chikh Alard, I., N`eve, J., Djennas, N., Riazi, A., & Soubhye, J. (2017). Antioxidant effects and bioavailability evaluation of propolis extract and its content of pure polyphenols. *Journal of Food Biochemistry*, 42(1). e12434. doi.org/10.1111/jfbc.12434.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santis, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., & Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion, *Nature protocols*, 14(4):991–1014. doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1.
- Cavalaro, R.I., Cruz, R.G.D., Dupont, S., de Moura Bell, J.M.L.N., & Vieira, T.M.F.S. (2019). In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food Chemistry*: X, 40, 100054. doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100054.
- Chan, G.C., Cheung, K.W., & Sze, D.M. (2013). The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 44(3), 262–273. doi.org/10.1007/s12016-012-8322-2.
- Chang, X., Feng, W., He, L., Chen, X., & Liang, L. (2020). Fabrication and characterisation of whey protein isolate-propolis-alginate complex particles for stabilising α -tocopherol-contained emulsions. *International Dairy Journal*, 109.104756. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104756.
- Cheng, L.K., O'Grady, G., Du, P., Egbuji, J.U., Windsor, J.A., & Pullan, A. J. (2010). Gastrointestinal system. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 2(1):65–79. doi.org/10.1002/wsbm.19.
- Chong, F.C & Chua, L.S. (2020). Effects of Solvent and pH on Stingless Bee Propolis in Ultrasound-Assisted Extraction. *AgriEngineering*, 2(2):308-316. doi.org/10.3390/agriengineering2020020.
- Chou, T.H., Nugroho, D.S., Chang, J.Y., Cheng, Y.S., Liang, C.H., & Deng, M.J. (2021). Encapsulation

- and Characterization of Nanoemulsions Based on an Anti-oxidative Polymeric Amphiphile for Topical Apigenin Delivery. *Polymers*, 13(7). 1016. doi.org/10.3390/polym13071016.
- Cui, J., Duan, X., Ke, L., Pan, X., Liu, J., Song, X., Ma, W., Zhang, W., Liu, Y., & Fan, Y. (2022). Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: A review. *Fitoterapia*, 157, 105106. doi.org/10.1016/j.fitote.2021.105106.
- Dantas, S.R.P., Machado, B.A.S., Barreto, G.A., Costa, S.S., Andrade, L.N., Amaral, R.G., Carvalho, A.A., Paldilha, F.F., Barbosa, J D. V., & Emsza-Guez, M.A. (2017) Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS ONE*. 12(3): e0172585. doi.org/10.1371/journal.pone.0172585.
- De Alencar, S.M., Sartori, A.G.O., Dag, D., Batista, P.S., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., & Kong, F. (2023). Dynamic gastrointestinal digestion/intestinal permeability of encapsulated and nonencapsulated Brazilian red propolis: Active compounds stability and bioactivity. *Food Chemistry*, 411. 135469. doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135469.
- De Mélo, S.I.S., Costa, G.L.M.A., Rocha, O.A.M., da Costa, L.P., Tada, D.B., Franceschi, E., & Padilha, F.F. (2020). Encapsulation of Red Propolis in Polymer Nanoparticles for the Destruction of Pathogenic Biofilms. *AAPS PharmSciTech*, 21(2). doi:10.1208/s12249-019-1576-8.
- Dias, D.R., Botrel, D.A., Fernandes, R.V.D.B., & Borges, S.V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, 13:31–37. doi.org/10.1016/J.COFS.2017.02.001.
- Ding, Q., Sheikh, A.R., Gu, X., Li, J., Xia, K., Sun, N., Wu, R.A., Luo, L., Zhang, Y., & Ma, H. (2020). Chinese Propolis: Ultrasound-assisted enhanced ethanolic extraction, volatile components analysis, antioxidant and antibacterial activity comparison. *Food Science & Nutrition*, 9(1): 313–330. doi.org/10.1002/fsn3.1997.
- Ding, S., Serra, C.A., Vandamme, T.F., Yu, W., & Anton, N. (2019). Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *Journal of Controlled Release*, 295:31-49. doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.037.
- Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., Denis, S., Ferrua, M., Havenaar, R., Lelieveld, J., Mackie, A.R., Marzorati, M., Menard, O., Minekus, M., Miralles, B., Recio, I., & Van den Abbeele, P. (2019). Can dynamic in vitro digestion systems mimic the

- physiological reality?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10):1546–1562. doi.org/10.1080/10408398.2017.1421900.
- Eghbal, N. and Choudhary, R. (2018). Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *LWT Food Science and Technology*, 90:254–264. doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.036.
- El Menyiy, N., Bakour, M., El Ghouizi, A., El Guendouz, S., & Lyoussi, B. (2021). Influence of Geographic Origin and Plant Source on Physicochemical Properties, Mineral Content, and Antioxidant and Antibacterial Activities of Moroccan Propolis. *International Journal of Food Science*, 5570224. doi.org/10.1155/2021/5570224.
- El-aziz, E.A.E.; Elgayar, S.F., Mady, F.M., Abourehab, M.A.S., Hasan, O.A., Reda, L.M., & Alaaeldin, E. (2021). The Potential of Optimized Liposomes in Enhancement of Cytotoxicity and Apoptosis of Encapsulated Egyptian Propolis on Hep-2 Cell Line. *Pharmaceutics*, 13. 2184. doi.org/10.3390/pharmaceutics13122184.
- El-Sakhawy, M. (2023) Propolis harvesting and extraction. *Egyptian Journal of Chemmistry*, 66(1): 313-321. doi.org/10.21608/EJCHEM.2022.122043.5469.
- Espino-Manzano, S.O., León-López, A., Aguirre-Álvarez, G., González-Lemus, U., Prince, L., Campos-Montiel, R.G. (2020). Application of Nanoemulsions (W/O) of Extract of *Opuntia oligacantha* C.F. Först and Orange Oil in Gelatine Films. *Molecules*, 25(15). 3487. doi:10.3390/molecules25153487
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10):510-523. doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003.
- Favaro-Trindade, C.S., de Matos Junior, F.E., Okuro, P.K., Dias-Ferreira, J., Cano, A., Severino, P., Zielinska, A., & Souto, E.B. (2021). Encapsulation of Active Pharmaceutical Ingredients in Lipid Micro/Nanoparticles for Oral Administration by Spray-Cooling. *Pharmaceutics*, 13. 1186. doi.org/10.3390/pharmaceutics13081186.
- Fernandes-Silva, C.C., Teixeira, E.W., Alves, M.L.T.M.F., Negri, G., Salatino, M.L.F., & Salatino, A. (2020). Propolis obtained in a clearing inside the Atlantic Forest in Ubatuba (São Paulo state, Brazil): essential oil and possible botanical origin. *Journal of Apicultural Research*, 60(5): 853-861. doi:10.1080/00218839.2020.1797994.

- Figueiredo, J.A., Silva, C.R.P., Souza Oliveira, M.F., Norcino, L.B., Campelo, P.H., Botrel, D.A., & Borges, S.V. (2022). Microencapsulation by spray chilling in the food industry: Opportunities, challenges, and innovations. *Trends in food science & technology*, 120:274–287. doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.026.
- Funakoshi-Tago, M., Okamoto, K., Izumi, R., Tago, K., Yanagisawa, K., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Kasahara, T., & Tamura, H. (2015). Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. *International immunopharmacology*, 25(1):189–198. doi.org/10.1016/j.intimp.2015.01.012.
- Garcia, R.C., de Oliveira, N.T.E., Camargo, S.C., Pires, B.G., de Oliveira C.A.L., Teixeira, R.A., & Pickler, M.A. (2013). Honey and propolis production, hygiene and defense behaviors of two generations of Africanized honey bees. *Scientia Agricola*, 70(2):74–81. doi.org/10.1590/S0103-90162013000200003.
- Gardini, S., Bertelli, D., Marchetti, L., Graziosi, R., Pinetti, D., Plessi, M., & Marcazzan, G.L. (2018). Chemical composition of Italian propolis of different ecoregional origin. *Journal of Apicultural Research*, 57(5): 639-647. doi.org/10.1080/00218839.2018.1494911.
- Giampieri, F., Quiles, J.L., Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T.Y., Orantes-Bermejo, F.J., Álvarez-Suarez, J.M., & Battino, M.A. (2022). Bee Products: An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70, 6833 - 6848. doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05822.
- Gomes, S.A.H., Mazzocato, M.C., Saliba, A.S.M.M., Alencar, S.M., & Favaro-Trindade, C.S. (2023). Evaluation of the release, stability and antioxidant activity of Brazilian red propolis extract encapsulated by spray-drying, spray-chilling and using the combination of both techniques. *Food Research International*, 164. 112423. doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112423.
- Gonçalves, A., Estevinho, B.N., & Rocha, F. (2021). Methodologies for simulation of gastrointestinal digestion of different controlled delivery systems and further uptake of encapsulated bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 114:510-520. doi:10.1016/j.tifs.2021.06.007.
- González-Búrquez, M.J., González-Díaz, F.R., García-Tovar, C.G., Carrillo-Miranda, L., Soto-Zárate, C.I., Canales-Martínez, M.M., Penieres-Carrillo, J.G., Cruz-Sánchez, T.A., Fonseca-Coronado, S. (2018). Comparison between In Vitro Antiviral Effect of Mexican Propolis and

- Three Commercial Flavonoids against Canine Distemper Virus. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 7092416. doi.org/10.1155/2018/7092416.
- González-Martín, M.I., Escuredo, O., Revilla, I., Vivar-Quintana, A.M., Coello, M.C., Riocerezo, C.P., & Moncada, G.W. (2015). Determination of the Mineral Composition and Toxic Element Contents of Propolis by Near Infrared Spectroscopy. *Sensors*, 15(11):27854–27868. doi.org/10.3390/s151127854.
- Graikini, D., Papachristoforou, A., & Mourtzinou, I. (2019). Comparison of qualitative characteristics of propolis extracts using different purification methods. *Journal of Apicultural Research*, 58(5): 792–799. doi.org/10.1080/00218839.2019.1653813.
- Graikou, K., Popova, M., Gortzi, O.I., Bankova, V., & Chinou, I. (2016). Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type?. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 261-267. doi:10.1016/j.lwt.2015.08.025.
- Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., & Bucić-Kojić, A. (2020). Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. *Antioxidants*, 9, 923. doi.org/10.3390/antiox9100923.
- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., & Ferreira, I.C.F.R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173:501–513. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.057.
- Hernández, Z.M.S., Abraham, J.M. del R., Cerón, G.A., Ozuna, L.C., Gutiérrez, C.A.J., Segoviano, G.J. de J.N., & Ávila, R.F. (2018). Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Science and Technology*, 38(2), 210–215. doi.org/10.1590/fst.29916.
- Hodel, K.V.S., Machado, B.A.S., Santos, N.R., Costa, R.G., Menezes-Filho, J.A., & Umsza-Guez, M.A. (2020). Metal Content of Nutritional and Toxic Value in Different Types of Brazilian Propolis. *The Scientific World Journal*, 4395496. doi:10.1155/2020/4395496.
- Hodges, C.R.L., Delaplane, K.S., & Brosi, B.J. (2019). Textured Hive Interiors Increase Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Propolis-Hoarding Behavior. *Journal of Economic Entomology*, 112(2):986–990. doi.org/10.1093/jee/toy363.
- Hossain, R., Quispe, C., Khan, R.A., Saikat, A.S.M., Ray, P., Ongalbek, D., Yeskaliyeva, B., Jain, D., Smeriglio, A., Trombetta, D., Kiani, R., Kobarfard, F., Mojangani, N., Saffarian, P., Ayatollahi, S. A., Sarkar, C., Islam, M.T., Keriman, D., Uçar, A., Martorell, M., Sureda, A., Pntus, G., Butnariu,

- M., Shaeifi-Rad, A., & Cho, W.C. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese Medicine*, 17(1), 100. doi.org/10.1186/s13020-022-00651-2.
- Huang, S., Zhang, C.P., Wang, K., Li, G.Q., & Hu, F.L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610–19632. doi.org/10.3390/molecules191219610.
- Hudz, N., Korytniuk, O., Yezerska, O., Motyka, O., Turkina, V., Korytniuk, R., & Wieczorek, P.P. (2020). Evaluation of the total flavonoid content and antimicrobial activity of the tinctures of propolis of Ukrainian origin. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 77, 897–907.
- Irgoiti, Y., Navarro, A., Yamul, D., Libonatti, C., Tabera, A., & Basualdo, M. (2021). The use of propolis as a functional food ingredient: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 297–306. doi:10.1016/j.tifs.2021.06.041.
- Ismail, T.N.N.T., Sulaiman, S.A., Ponnuraj, K.T., Man, C.N., & Hassan, N.B. (2018). Chemical constituents of Malaysian *Apis mellifera* propolis. *Sains Malaysiana*, 47(1):117–122. doi.org/10.17576/jsm-2018-4701-14.
- Jansen-Alves, C., Fernandes, K.F., Crizel-Cardozo, M.M., Krumreich, F.D., Borges, D.D., & Zambiasi, R.C. (2018). Borges, C.D., & Zambiasi, R.C. (2023). Microencapsulation of Propolis in Protein Matrix Using Spray Drying for Application in Food Systems. *Food and Bioprocess Technology*, 11(7): 1422-1436. 1–5. doi.org/ 10.1007/s11947-018-2115-4.
- Jansen-Alves, C., Victoria, F.N., Borges, C.D., & Zambiasi, R.C. (2023). Encapsulation of propolis extract in ovalbumin protein particles: characterization and in vitro digestion. *Natural Product Research*, 1–5. doi.org/10.1080/14786419.2023.2214945.
- Jia, Z., Dumont, M.J., & Orsat, V. (2016). Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*, 15:87–104. doi.org/10.1016/j.fbio.2016.05.007.
- Kale, S.N., & Deore, S.L. (2017). Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8 (1):39-47. doi:10.5530/srp.2017.1.8.
- Kasote, D., Bankova, V., & Viljoen, A.M. (2022). Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. *Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 21(6), 1887–1911. doi.org/10.1007/s11101-022-09816-1.

- Kekeçoğlu, M., Eroğlu, N., Kambur, M., & Uçak, M. (2020). The Relationships Between Propolis Collecting Capability and Morphometric Features of Some Honey Bee Races and Ecotypes in Anatolia. *Journal of Agricultural Sciences*, 26 (1):71-77. doi.org/10.15832/ankutbd.447319.
- Keskin, M., Keskin, Ş., & Kolaylı, S. (2019). Preparation of alcohol free propolis-alginate microcapsules, characterization and release property. *LWT - Food Science and Technology*, 108:89–96. doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.036.
- Kiziltas, H., & Erkan, C. (2021). The effects of different beehives on propolis production and quality. *Food Science and Technology*, 41(4), 877-883. doi.org/10.1590/fst.20120.
- Kwon, M.J., Shin, H.M., Perumalsamy, H., Wang, X., & Young-Joon, A. (2019). Antiviral effects and possible mechanisms of action of constituents from Brazilian propolis and related compounds. *Journal of Apicultural Research*, 59(4):413-425. doi:10.1080/00218839.2019.1695715.
- Lara-Abia, S., Lobo, G., Pérez-Pascual, N., Welti-Chanes, J., & Cano, M.P. (2023). Improvement in the Stability and Bioaccessibility of Carotenoid and Carotenoid Esters from a Papaya By-Product Using O/W Emulsions. *Foods*, 12. 2654. doi.org/10.3390/foods12142654.
- Letullier, C., Manduchet, A., Dlalal, N., Hugou, M., Georgé, S., Sforcin, J.M., & Cardinault, N. (2019). Comparison of the antibacterial efficiency of propolis samples from different botanical and geographic origins with and without standardization. *Journal of Apicultural Research*, 59(1):19-24. doi:10.1080/00218839.2019.1681117.
- Li, C., Yu, W., Wu, P., & Chen, X.D. (2020). Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 96:114–126. doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015.
- Ligarda-Samanez, C.A., Choque-Quispe, D., Moscoso-Moscoso, E., Huamán-Carrión, M.L., Ramos-Pacheco, B.S., Peralta-Guevara, D.E., Cruz, G.D.I., Martínez-Huamán. E.L., Arévalo-Quijano, J.C., Muñoz-Saenz, J.C., Muñoz-Melgarejo, M., Muñoz-Saenz, D.M., & Aroni-Huamán, J. (2022). Obtaining and Characterizing Andean Multi-Floral Propolis Nanoencapsulates in Polymeric Matrices. *Foods*, 11(20):3153. doi.org/10.3390/foods11203153.
- Ligarda-Samanez, C.A., Choque-Quispe, D., Moscoso-Moscoso, E., Huamán-Carrión, M.L., Ramos-Pacheco, B.S., De la Cruz, G., Arévalo-Quijano, J.C., Muñoz-Saenz, J.C., Muñoz-Melgarejo, M., Quispe-Quezada, U.R., Gutiérrez-Gómez, E., Luciano-Alipio, R., Zamalloa-Puma, M.M., Álvarez-López, G.J., & Sucari-León, R. (2023). Microencapsulation of Propolis and Honey

- Using Mixtures of Maltodextrin/Tara Gum and Modified Native Potato Starch/Tara Gum. *Foods*, 12. 1873. doi.org/10.3390/foods12091873.
- Lipin, A.A., & Lipin, A.G. (2022). Prediction of coating uniformity in batch fluidized-bed coating process. *Particuology*, 61:41-46. doi.org/10.1016/j.partic.2021.03.010.
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107: 423–436. doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055.
- Mahamat, A., Nyemb, J., Gade, I., Ngenge, A., Talla, E., Céline, H., Sophie, L. & Mbafor, J. (2020). A New fatty acid and some triterpenoids from propolis of Nkambe (North-West Region, Cameroon) and evaluation of the antiradical scavenging activity of their extracts. *Open Chemistry*, 18(1):239-243. doi.org/10.1515/chem-2020-0016.
- 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. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00315.
- Marcillo-Parra, V., Tupuna-Yerovi, D.S., González, Z., & Ruales, J. (2021). Encapsulation of bioactive compounds from fruit and vegetable by-products for food application – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 116:11–23. doi:10.1016/j.tifs.2021.07.009.
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2015). Propolis: a new frontier for wound healing?. *Burns & Trauma*. 3(1):9. doi:10.1186/s41038-015-0010-z.
- Milinčić, D.D., Salević-Jelić, A.S., Kostić, A.Ž., Stanojević, S.P., Nedović, V., & Pešić, M.B. (2023). Food nanoemulsions: how simulated gastrointestinal digestion models, nanoemulsion, and food matrix properties affect bioaccessibility of encapsulated bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 6:1–23. doi.org/10.1080/10408398.2023.2195519.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, K.D.J., Menard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies,

- W., & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food— An international consensus. *Food & Function*, 5, 1113–1124. doi:10.1039/c3fo60702j.
- Mirzamani, S.S., Bassiri, A.R., Tavakolipour, H., Azizi, M.H., & Kargozari, M. (2021). Survival of fluidized bed encapsulated *Lactobacillus acidophilus* under simulated gastrointestinal conditions and heat treatment during bread baking. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15:5477-5484. doi:10.1007/s11694-021-01108-0.
- Montero-Recalde, M., Mira, J.C., Avilés-Esquivel, D., Pazmiño-Miranda, P., & Erazo-Gutiérrez, R. (2018). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(2):588-593. doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14520.
- Mouhoubi-Tafinine, Z., Ouchemoukh, S., & Tamendjari, A. (2016). Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products*. 88:85–90. doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.033.
- Mountford-McAuley, R., Prior, J., & McCormick, A.C. (2021). Factors affecting propolis production. *Journal of Apicultural Research*. doi:10.1080/00218839.2021.1938456.
- Nada, A.A., Nour, I.H., Metwally, A.M., Asaad, A.M., Eldin, S.M.S., & Ibrahim, R.S. (2022). An integrated strategy chemical, biological and palynological standardization of bee propolis. *Microchemical Journal*, 18, 107923. doi.org/10.1016/j.microc.2022.107923.
- Nainu, F., Masyita, A., Bahar, M.A., Raihan, M., Prova, S.R., Mitra, S., Emran, T.B., & Simal-Gandara, J. (2021). Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties. *Antibiotics*, 10, 822. doi.org/10.3390/antibiotics10070822.
- Nandre, V.S., Bagade, A.V., Kasote, D.M., Lee, J.H.J., Kodam, K.M., Kulkarni, M.V., & Ahmad, A. (2021). Antibacterial activity of Indian propolis and its lead compounds against multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of Herbal Medicine*, 29, 100479. doi:10.1016/j.hermed.2021.100479.
- Narsaiah, K., Jha, S.N., Wilson, R.A., Mandge, H.M., & Manikantan, M.R. (2014). Optimizing microencapsulation of nisin with sodium alginate and guar gum. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12):4054–4059. doi.org/10.1007/s13197-012-0886-6.

- Nichitoi, M.M., Josceanu, A.M., Isopescu, R.D., Isopencu, G.O., Geana, E.I., Ciucure, C.T., & Lavric, V. (2021). Polyphenolics profile effects upon the antioxidant and antimicrobial activity of propolis extracts. *Scientific Reports*, 11(1), 20113. doi.org/10.1038/s41598-021-97130-9.
- [NOM] Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017. Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5500103&fecha=06/10/2017#gsc.tab=0 (Ultimo acceso 20 de junio de 2022)
- Nowak, D., & Jakubczyk, E. (2020). The freeze-drying of foods—the characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. *Foods*, 9(10), 1488. doi.org/10.3390/foods9101488.
- Okińczyc, P., Widelski, J., Szperlik, J., Żuk, M., Mroczek, T., Skalicka-Woźniak, K., Sakipova, Z., Widelska, G., & Kuś, P.M. (2021). Impact of Plant Origin on Eurasian Propolis on Phenolic Profile and Classical Antioxidant Activity. *Biomolecules*, 11(1), 68. doi.org/10.3390/biom11010068.
- Osés, S.M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muiño, M.A., López-Díaz, T.M., & Sancho, M.T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, 196:1215–1223. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.050.
- Ożarowski, M., Karpiński, T.M., Alam, R., & Łochyńska, M. (2022). Antifungal Properties of Chemically Defined Propolis from Various Geographical Regions. *Microorganisms*, 10(2): 364. doi.org/10.3390/microorganisms10020364.
- Ozidal, T., Ceylan, F.D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E.O., & Capanoglu, E. (2019). Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International*, 122:528–536. doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.028.
- Pant, K., Thakur, M., Chopra, H.K., & Nanda, V. (2022). Encapsulated bee propolis powder: Drying process optimization and physicochemical characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 155, 12956. doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112956.
- Pasupuleti, V.R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S.H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1259510. doi.org/10.1155/2017/1259510.

- Paulo, F., Paula, V., Estevinho, L.M., & Santos, L. (2021). Propolis microencapsulation by double emulsion solvent evaporation approach: Comparison of different polymeric matrices and extract to polymer ratio. *Food and Bioproducts Processing*, 127:408-425. doi:10.1016/J.FBP.2021.03.019.
- Peixoto, M., Freitas, A.S., Cunha, A., Oliveira, R., & Almeida-Aguiar, C. (2022). Mixing Propolis from Different Apiaries and Harvesting Years: Towards Propolis Standardization? *Antibiotics*, 11. 1181. doi.org/10.3390/antibiotics11091181.
- Pimentel-González, D.J., Jiménez-Alvarado, R., Hernández-Fuentes, A.D., Figueira, A.C., Suarez-Vargas, A., & Campos-Montiel, R.G. (2015). Potentiation of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Artisanal Honeys Using Specific Heat Treatments. *Journal of Food Biochemistry*, 40(1):47–52. doi:10.1111/jfbc.12186.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 83: 53–62. doi:10.1016/j.tifs.2018.11.007.
- Przybyłek, I., & Karpiński, T.M. (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules*, 24(11): 2047. doi:10.3390/molecules24112047.
- Qiao, J., Wang, Y., Zhang, Y., Kong, L., & Zhang, H. (2023). Botanical Origins and Antioxidant Activities of Two Types of Flavonoid-Rich Poplar-Type Propolis. *Foods*, 12, 2304. doi.org/10.3390/foods12122304.
- Rababah, T.M., Al-Omoush, M., Brewer, S., Alhamad, M., Yang, W., Alrababah, M., Al-Ghzawi, A.A., Al-U'datt, M. Ereifej, K., Alsheyab, F., Alsheyab, F., Esoh, R., & Almajwal, A. (2013). Total phenol, antioxidant activity, flavonoids, anthocyanins and color of honey as affected by floral origin found in the arid and semiarid Mediterranean areas. *Journal of Food Processing Preservation*, 38:1119–1128. doi:10.1111/jfpp.12071.
- Ramnath, S., Venkataramgowda, S., & Singh, C. (2015). Chemical composition of bee propolis collected from different regions in India by GCMS analysis. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 30(1):1319–1328.
- Refaat, H., Mady, F.M., Sarhan, H.A., Rateb, H.S., & Alaaeldin, E. (2020). Optimization and Evaluation of Propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. *International Journal of Pharmaceutics*, 592. 120028. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.120028.

- Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., & Askari, G. (2019). Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology*, 38: 235-258. doi:10.1080/07373937.2019.1653906.
- Ribeiro, V.P., Mejia, J.A.A., Rodrigues, D.M. Alves, G.R., Pinheiro, A.M.F., Tanimoto, M.H., Bastos, J.K., & Ambrósio, S.R. (2023). Brazilian Brown Propolis: An Overview About Its Chemical Composition, Botanical Sources, Quality Control, and Pharmacological Properties. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33, 288–299. doi.org/10.1007/s43450-023-00374-x.
- Ripari, N., Sartori, A.A., Honorio, M.S., Conte, F.L., Tasca, K.I., Santiago, K.B., & Sforcin, J.M. (2021). Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73(3):281–299. doi.org/10.1093/jpp/rgaa067
- Rivero-Cruz, J.F., Granados-Pineda, J., Pedraza-Chaverri, J., Pérez-Rojas, J.M., Kumar-Passari, A., Diaz-Ruiz, G., & Rivero-Cruz, B.E. (2020). Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic Extract of Mexican Brown Propolis. *Antioxidants*, 9(1). 70. doi.org/10.3390/antiox9010070.
- Salatino, A., & Salatino, M.L.F. (2021). Scientific note: often quoted, but not factual data about propolis composition. *Apidologie*, 52, 312–314. doi.org/10.1007/s13592-020-00821-x.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F., & Negri, G. (2021). How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis?. *Apidologie*, 52(6), 1075–1097. doi.org/10.1007/s13592-021-00889-z.
- Salatnaya, H., Widodo, W.D., Winarno., & Fuah, A.M. (2020). The Influence of Environmental Factors on the Activity and Propolis Production of *Tetragonula laeviceps*. *Jurnal Ilmu Produksi Dan Teknologi Hasil Peternakan*, 8(2), 67-71. doi.org/10.29244/jipthp.8.2.67-71.
- Saliba, A.S.M.C., Quirino, D.J.G., Favaro-Trindade, C.S., Sartori, A.O., Massarioli, A.P., Lazarini, J.G., Silva, A.P.S., & Alencar, S.M. (2023). Effects of simulated gastrointestinal digestion/epithelial transport on phenolics and bioactivities of particles of brewer's spent yeasts loaded with Brazilian red propolis. *Food Research International*, 173, 113345. doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113345.
- Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A.M. (2017). Chemical composition of honey. *En Bee Products - Chemical and Biological Properties* (pp. 43-82). Springer International Publishing. doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_3.

- Sartori, A.G.O., Spada, F.P., Ribeiro, V.P., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., Bastos, J.K., & Alencar, S.M. (2021). An insight into the botanical origins of propolis from permanent preservation and reforestation areas of southern Brazil. *Scientific Reports*, 11:1-8. doi:10.1038/s41598-021-01709-1.
- Sato, T., Mello, D., Vasconcellos, L., Valente, A.J.M., & Borges, A. (2020). Chitosan-Based Coacervate Polymers for Propolis Encapsulation: Release and Cytotoxicity Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12):4561. doi.org/10.3390/ijms21124561.
- Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, K.H., & Reichling, J. (2010). Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds, *Phytotherapy Research*, 24:S20-S28. doi:10.1002/ptr.2868.
- Seibert, J.B., Bautista-Silva, J.P., Amparo, T.R., Petit, A., Pervier, P., Dos Santos Almeida, J.C., Azevedo, M.C., Silveira, B.M., Brandão, G.C., de Souza, G.H.B., de Medeiros Teixeira, L.F., & Dos Santos, O.D.H. (2019). Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. *Food chemistry*, 287:61–67. doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.078.
- Seraglio, S.K.T., Schulz, M., Gonzaga, L.V., Fett, R., & Costa, A.C.O. (2021). Current status of the gastrointestinal digestion effects on honey: A comprehensive review. *Food Chemistry*, 357. 129807. doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129807.
- Shakoury, N., Aliyari, M.A., Salami, M., Emam-Djomeh, Z., Vardhanabhuti, B., & Moosavi-Movahedi, A.A. (2022). Encapsulation of propolis extract in whey protein nanoparticles. *LWT - Food Science and Technology*, 158. 113138. doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113138.
- Shehata, M.G., Ahmad, F.T., Badr, A.N., & Masry, S.H. (2020). El-Sohaimy, S.A. Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions. *Annals of Agricultural Science*, 65(2):209–217. doi.org/10.1016/j.aos.2020.12.001.
- Siheri, W., Alenezi, S., Tusiimire, J., & Watson, D.G. (2017). The Chemical and Biological Properties of Propolis. *Bee Products - Chemical and Biological Properties*, 137–178. doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_7.
- Silva, D.R.P., Machado, B.A.S., Barreto, G.A., Costa, S.S., Andrade, L.N., Amaral, R.G., Carvalho, A. A., Padilha, F.F., Barbosa, J.D.V., & Umsza-Guez, M.A. (2017). Antioxidant, antimicrobial,

- antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS ONE*. 12(3): e0172585.
- Silva, J.C., Rodrigues, S., Feás, X., & Estevinho, L.M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5): 1790–1795. doi:10.1016/j.fct.2012.02.097.
- Sime, D., Atlabachew, M., Redi-Abshiro, M., & Zewde, T. (2015). Total phenols and antioxidant activities of natural honeys and propolis collected from different geographical regions of Ethiopia. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 29(2):163-172. doi:10.4314/bcse.v29i2.1.
- Soleimanifard, M., Feizy, J., & Maestrelli, F. (2021). Nanoencapsulation of propolis extract by sodium caseinate-maltodextrin complexes. *Food and Bioproducts Processing*, 128:177–185. doi:10.1016/j.fbp.2021.05.005.
- Soltani, E., Mokhnache, K., & Charef, N. (2020). Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Ethanolic and Aqueous Algerian Propolis Extracts (Region of Serdj el ghoul). *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 10(1):1. doi.org/10.22270/jddt.v10i1.3797.
- Soltani, E.K., Zaim, K., Mokhnache, K., Haichour, N., Mezaache-Aichour, S., Charef, N., & Zerroug, M.M. (2021). Polyphenol Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous Algerian Propolis Extracts. *Phytothérapie*, doi.org/0.3166/phyto-2021-0282.
- Sonawane, S.H., Bhanvase, B.A., Sivakumar, M., & Potdar, S.B. (2020). Current overview of encapsulation. *Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System*, 1–8. doi:10.1016/b978-0-12-819363-1.00001-6.
- Soós, A., Bódi, E., Várallyay, S., Molnár, S., & Kovács, B. (2019). Mineral content of propolis tinctures in relation to the extraction time and the ethanol content of the extraction solvent. *LWT*, 111:719–726. doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.090.
- Souza, E.A., Zaluski, R., Veiga, N., & Orsi, R.O. (2016). Effects of seasonal variations and collection methods on the mineral composition of propolis from *Apis mellifera* Linnaeus Beehives. *Brazilian Journal of Biology*, 76(2):396–401. doi.org/10.1590/1519-6984.16714.
- Sun, G.W., Qiu, Z.D., Wang, W.N., Sui, X., & Sui, D.J. (2016). Flavonoids Extraction from Propolis Attenuates Pathological Cardiac Hypertrophy through PI3K/AKT Signaling Pathway. Evidence-

- Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 2016, 6281376. doi.org/10.1155/2016/6281376.
- Šuran, J., Cepanec, I., Mašek, T., Radić, B., Radić, S., Gajger, I.T., & Vlainić, J. (2021). Propolis Extract and Its Bioactive Compounds— From Traditional to Modern Extraction Technologies. *Molecules*, 26. 2930. doi.org/10.3390/molecules26102930.
- Syukri, Y., Fitria, A., Hanifah, S., & Idrati, M. (2021). Development of New Indonesian Propolis Extract-Loaded Self-emulsifying: Characterization, Stability and Antibacterial Activity. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 11(1):120–129. doi.org/10.34172/apb.2021.013.
- Timilsena, Y.P., Haque, Md.A., & Adhikari, B. (2020). Encapsulation in the Food Industry: A Brief Historical Overview to Recent Developments. *Food and Nutrition Sciences*, 11:481-508. doi.org/10.4236/fns.2020.116035.
- Tlak, G.I., Pavlović, I., Bojić, M., Kosalec, I., Srećec, S., Vlainić, T., & Vlainić, J. (2017). Components responsible for antimicrobial activity of propolis from continental and Mediterranean regions in Croatian. *Czech Journal of Food Sciences*, 35(5):376-385. doi: 10.17221/103/2017-CJFS.
- Tomazzoli, M.M., Zeggio, A.R.S., Neto, R.D.P., Specht, L., Costa, C., Rocha, M., Yunes, R.A., & Maraschin, M. (2020). Botanical source investigation and evaluation of the effect of seasonality on Brazilian propolis from *Apis mellifera* L. *Scientia Agricola*, 77(6). doi.org/10.1590/1678-992X-2018-0258.
- Tosic, S., Stojanovic, G., Mitic, S., Pavlovic, A., & Alagic, S. (2017). Mineral composition of selected Serbian propolis samples. *Journal of Apicultural Science*. 61(1): 5-15. doi.org/10.1515/jas-2017-0001.
- Turcatto, A.P., Lourenço, A.P., & De Jong, D. (2018). Propolis consumption ramps up the immune response in honey bees infected with bacteria. *Apidologie*, 49(3), 287–296. doi.org/10.1007/s13592-017-0553-z.
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E.S., & Velioglu, Y.S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, 95(4):653–657. doi:10.1016/j.foodchem.2005.02.004.
- Turkut, G.M., Er, M. & Degirmenci, A. (2019). Evaluating Bioactivity and Bioaccessibility Properties of Turkish Propolis Extracts Prepared with Various Solvents. *Journal of Apitherapy and Nature*, 2(1):7-11. doi: 10.35206/jan.577616.

- Veiga, R.S., De Mendonça, S., Mendes, P.B., Paulino, N., Mimica, M.J., Lagareiro Netto, A.A., Lira, I. S., López, B.G., Negrão, V., & Marcucci, M.C. (2017). Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4):911–920. doi.org/10.1111/jam.13400.
- Veloz, J.J., Alvear, M., & Salazar, L.A. (2019). Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. *BioMed Research International*, 7602343. doi.org/10.1155/2019/7602343
- Vinceković, M., Viskić, M., Jurić, S., Giacometti, J., Kovačević, D.B., Putnik, P., Donsi, F., Barba, F.J., & Jambrak, A.R. (2017). Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. *Trends in Food Science & Technology*, 69:1-12. doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.001.
- Wang, B., Akanbi, T.O., Agyei, D., Holland, B.J., & Barrow, C.J. (2018). Coacervation technique as an encapsulation and delivery tool for hydrophobic biofunctional compounds. In *Role of materials science in food bioengineering. Handbook of Food Bioengineering*, (pp. 235–261). Elsevier. doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3.00007-3.
- Wieczorek, P.P., Hudz, N., Yezerska, O., Horčínová-Sedláčková, V., Shanaida, M., Korytniuk, O., & Jasicka-Misiak, I. (2022). Chemical Variability and Pharmacological Potential of Propolis as a Source for the Development of New Pharmaceutical Products. *Molecules*, 27. 1600. doi.org/10.3390/molecules27051600.
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols- A non-systematic review. *Nutrients*, 12(5). 1401. doi.org/10.3390/nu12051401.
- Yesiltas, B., Capanoglu, E., Firatligil-Durmus, E., Sunay, A.E., Samanci, T., & Boyacioglu, D. (2014). Investigating the in-vitro bioaccessibility of propolis and pollen using a simulated gastrointestinal digestion System. *Journal of Apicultural Research*, 53(1):101–108. doi:10.3896/IBRA.1.53.1.10
- Yuan, Y., Zheng, S., Zeng, L., Deng, Z., Zhang, B., & Li, H. (2019). The Phenolic Compounds, Metabolites, and Antioxidant Activity of Propolis Extracted by Ultrasound-Assisted Method. *Journal of Food Science*, 84(12):3850–3865. doi.org/10.1111/1750-3841.14934.

- Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., & Lobaccaro, J.A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 214–222. doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005.
- Zhang, R., Hoffmann, T., & Tsotsas, E. (2020). Novel Technique for Coating of Fine Particles Using Fluidized Bed and Aerosol Atomizer. *Processes*, 8(12). 1525. doi.org/10.3390/pr8121525.
- Zheng, Y.Z., Deng, G., Liang, Q. Chen, D.F., Guo, R., & Lai, R.C. (2017). Antioxidant Activity of Quercetin and Its Glucosides from Propolis: A Theoretical Study. *Scientific Reports*, 7. 7543. doi.org/10.1038/s41598-017-08024-8.
- Zulhendri, F., Chandrasekaran, K., Kowacz, M., Ravalia, M., Kripal, K., Fearnley, J., & Perera, C.O. (2021). Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review. *Foods*, 10(6). 1360. doi.org/10.3390/foods10061360.

10. Anexos



Article

Bioactive Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Propolis Extracts during In Vitro Digestion

Lucio González-Montiel, Ana Cristina Figueira, Gabriela Medina-Pérez,
Fabián Fernández-Luqueño, Gabriel Aguirre-Álvarez, Elizabeth Pérez-Soto,
Sergio Pérez-Ríos and Rafael G. Campos-Montiel

Special Issue

[Advances in Bee Products and Its Processing Technology](#)

Edited by

Dr. Xiaoming Fang, Dr. Hong-Wei Xiao, Dr. Yi Li and Dr. Hongcheng Zhang



<https://doi.org/10.3390/app12157892>

Article

Bioactive Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Propolis Extracts during In Vitro Digestion

Lucio González-Montiel ^{1,2}, Ana Cristina Figueira ³, Gabriela Medina-Pérez ¹, Fabián Fernández-Luqueño ⁴, Gabriel Aguirre-Álvarez ¹, Elizabeth Pérez-Soto ¹, Sergio Pérez-Ríos ¹ and Rafael G. Campos-Montiel ^{1,*}

- ¹ Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Rancho Universitario s/n Km.1 C.P., Tulancingo 43760, Mexico
² Instituto de Tecnología de los Alimentos, Universidad de la Cañada, Teotitlán de Flores Magón 68540, Mexico
³ Research Centre for Tourism, Sustainability and Well-Being (CinTurs), Department of Food Engineering, Institute of Engineering, University of the Algarve, Campus da Penha, 8005-139 Faro, Portugal
⁴ Sustainability of Natural Resources and Energy Programs, Cinvestav-Salttilo, Ramos Ariepe 25900, Mexico
 * Correspondence: rcampos@uaeh.edu.mx



Citation: González-Montiel, L.; Figueira, A.C.; Medina-Pérez, G.; Fernández-Luqueño, F.; Aguirre-Álvarez, G.; Pérez-Soto, E.; Pérez-Ríos, S.; Campos-Montiel, R.G. Bioactive Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Propolis Extracts during In Vitro Digestion. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 7892. <https://doi.org/10.3390/app12157892>

Academic Editors: Xiaoming Fang, Hong-Wei Xian, Yi Li and Hongcheng Zhang

Received: 24 June 2022
 Accepted: 2 August 2022
 Published: 6 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The objective of this research was to determine the content of total phenols, total flavonoids, and the antioxidant and antimicrobial activity of the ethanolic extracts of propolis obtained by two methodologies during in vitro digestion. Ethanolic extracts of propolis were obtained by ultrasound and maceration and the yield and content of the bioactive compounds, as well as their antimicrobial and antioxidant activity, were evaluated. Yields higher than those reported in other investigations (71.6%) were obtained. The highest content of phenols and flavonoids in the ethanolic extracts was 34,406.6 mg GAE/100 g in propolis from San Pedro, obtained by maceration (SP M), and 19,523.2 mg QE/100 g in propolis from Teotitlán, obtained by ultrasound (TU), respectively, being higher than what is established in Mexican regulations. The antioxidant and antimicrobial activity of the extracts was not affected by the method of obtaining. At the end of the in vitro digestion there was an 80% loss of the phenolic content and a 90% loss of the flavonoid content. Therefore, antioxidant activity was affected. On the other hand, ultrasound improves the obtaining of bioactive compounds. In vitro digestion decreases the content of bioactive compounds; therefore, their functional properties are affected. Thus, it is important to consider technologies that allow extracts to be protected from in vitro digestion conditions.

Keywords: propolis; phenolic compounds; flavonoid; ultrasound; maceration; microbial inhibition

1. Introduction

The word propolis is derived from the Greek, “pro” meaning “at the entrance of” and “polis” meaning “city”; it is a substance produced by bees in order to protect the bee’s larvae, honey stores and combs from microbial infections [1,2]. According to the Mexican Official Standard [3], propolis is the natural product produced by the bees. It consists of resinous substances collected and processed by forage bees from the vegetation surrounding the apiary. With a resinous appearance, its color can vary depending on its floral origin and range from red, reddish-yellow, dark-yellow, brownish-green, brown or black, with a bitter and slightly spicy flavor. Bees produce propolis to use it as a thermal insulation material, sealing cracks present in the hive. This helps to control humidity and temperature inside the hive, soften the internal walls and protect the hive against microbial infections, as well as to mummify dead bees inside the hive [4].

Propolis is composed of 50% resins and vegetable balm, 30% beeswax, 5% pollen and 10% essential oils, among other organic compounds, mainly primary and secondary plant metabolites, such as amino acids, vitamins, minerals, phenolic compounds, terpenoids, tannins and alkaloids [5]. Nearly 300 chemical compounds have been identified. These compounds are not necessarily present in all propolis, because their presence depends

mainly on the botanical and geographical origin, the species of bee and the harvest season, as well as of various environmental factors [6–8]. In general, propolis contains flavonoids, terpenes, phenols and their esters, sugars, alcohols, ketones, hydrocarbons, amino acids, vitamins and minerals [7].

Since ancient times, propolis has been used in traditional medicine for the treatment of various conditions in human and animal health. Today propolis is consumed in various parts of the world, due to its health benefits, among which are antiseptics, antimicrobials (antibacterial, antifungal, antiprotozoal and antiviral), spasmolytics, anti-inflammatories, anesthetics, antioxidants, antidiabetic, antiulcer, antimutagenic, anticancer, immunomodulatory and antihepatotoxic, in addition, it is excellent for the treatment of skin burns and oral health care [9–11]. Phenolic compounds are those mainly responsible for antioxidant activity, due to their ability to capture free radicals with the formation of more stable molecules [2]. Furthermore, flavonoids and phenolic acids exert a strong antimicrobial activity [12–14]. For many years, tincture has been the traditional way to use propolis (alcohol extraction); however, in order to obtain a pure propolis extract, various extraction methodologies have been developed [4]. Ultrasound-assisted extraction is one of the most promising methods due to extraction time, yield and profitability [15]. On the other hand, ultrasound can be an excellent alternative for the decrystallization of honey, without affecting quality parameters [16]. In addition to reducing the size of the crystals and the content of products of the Maillard reaction, the honeys treated with the ultrasound increase the content of bioactive compounds, consequently, an improvement in their functional properties, mainly due to the liberation of bioactive compounds from the crystallized honey matrix [17].

The aim of the present investigation was to determine the content of phenols and flavonoids and the antioxidant and antimicrobial activities of ethanolic extracts of propolis obtained by ultrasound or maceration in a simulated *in vitro* digestion.

2. Materials and Methods

2.1. Propolis Samples

Three samples of propolis from hives *Apis mellifera*, from the Mazatec area belonging to the Oaxaqueña Cañada were used: Teotitlán de Flores Magón (18°07'57" N, 97°04'20" O), San Jerónimo Tecóatl (18°10'00" N, 96°55'00" O) and San Pedro Ocopetatlillo (18°12'00" N, 96°55'00" O), Oaxaca (Table 1). Propolis collection was performed with the support of the following beekeeper organizations: "Miel Nectar Mazateco" and "Sociedad de Apicultores de Eloxochitlán". The samples were collected directly from the apiary, in hermetically sealed containers protected from light, and stored at −30 °C until use.

Table 1. Origin and conditions for obtaining propolis extracts.

Sample	Origin	Treatment	Time
T U	Teotitlán de Flores Magón	Ultrasound	30 min
T M	Teotitlán de Flores Magón	Maceration	17 days
SP U	San Pedro Ocopetatlillo	Ultrasound	30 min
SP M	San Pedro Ocopetatlillo	Maceration	17 days
SJ U	San Jerónimo Tecóatl	Ultrasound	30 min
SJ M	San Jerónimo Tecóatl	Maceration	17 days

T U = Teotitlán de Flores Magón, Ultrasound; T M = Teotitlán de Flores Magón, Maceration; SP U = San Pedro Ocopetatlillo, Ultrasound; SP M = San Pedro Ocopetatlillo, Maceration; SJ U = San Jerónimo Tecóatl, Ultrasound; SJ M = San Jerónimo Tecóatl, Maceration.

2.2. Obtaining Extracts/Extraction Methods/Preparation of Extracts

The extracts were obtained/prepared according to Osés et al. [18], with some modifications. Frozen propolis (−30 °C) was ground with the help of a mill (Jiawanshun, Model HC-2000Y, China). From the powdered propolis 6 treatments were prepared (Table 1). In all treatments, the solvent used was 85% ethanol, in a 1:30 *v/v* ratio, at a temperature of 20 °C. Ultrasounds were applied at a frequency of 42 kHz in an ultrasonic bath (Branson 3510,

Mexico). The maceration was carried out with magnetic stirring at 200 rpm. Subsequently, the extracts were centrifuged at $18,510 \times g$ for 15 min at 4°C . The liquid extracts were concentrated in a rotary evaporator at 40°C (Büchi R-215, Switzerland). For the total evaporation of the extraction medium, the extracts were placed in a vacuum oven at 40°C . The dry extracts were stored at 4°C , in glass containers protected against light, until use.

2.3. In Vitro Digestibility of Propolis Extracts

The in vitro simulation of the gastrointestinal digestion of the extracts was performed according to Minekus et al. [19], with some modifications. Digestion was divided into two stages: (a) Gastric phase; a solution of 20 mg/mL dry extract in 80% ethanol was prepared, later this solution was diluted (1:5 *v/v*) with distilled water, and the solution adjusted to pH 2 with 6 M HCl, 20 mL of gastric fluid (40,000 units of porcine pepsin in 0.3 M CaCl_2 in 0.1 M HCl) were added, and the mixture was incubated in a water bath at 37°C , with agitation, for 120 min. (b) Intestinal phase, the pH was adjusted to 7 with 0.5 M NaHCO_3 , then 10% pancreatic fluid was added (0.4 g of pancreatin and 2.5 g of bile salts in 100 mL of 0.1 M NaHCO_3), the mixture was incubated in a water bath at 37°C , with agitation, for 120 min. Finally, the mixture was heated to boiling for 4 min in order to inactivate the enzymes. Four samples were taken during the digestion: from the initial extract, at the end of the gastric phase, at the end of the intestinal phase and after boiling. All samples were centrifuged at $18,510 \times g$ for 10 min at 4°C with a centrifuge (Hermle, Z 36 HK, Gosheim, Germany) and they were later kept in refrigeration until analysis. Total phenols, flavonoids, antioxidant activity with the reagent 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^+) and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^+) and antimicrobial activity were further determined.

2.4. Determination of Bioactive Compounds

2.4.1. Quantification of Total Phenolic Compounds

Phenols were quantified according to the Folin–Ciocalteu method described by Rababah et al. [20], with some modifications: a dilution of propolis extract (1:1000 *w/v*) was made using 85% ethanol, it was homogenized until complete solubility using a Vortex, then the extracts were centrifuged at $18,510 \times g$ for 15 min at 4°C (Hermle, Z 36 HK, Gosheim, Germany). For this assay, 0.3 mL of the supernatant were taken in a test tube and mixed with 1.5 mL of Folin–Ciocalteu 0.2 N reagent, incubated for 8 min at room temperature and in the absence of light. Then 1.2 mL of 0.7 M Na_2CO_3 were added, they were homogenized and incubated at room temperature for 120 min in the absence of light. Absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer (Jenway 6715, Ware, UK), against a water blank. The total phenolic content was determined from a gallic acid standard curve (0 to 100 mg/L). The amount of total phenols was expressed as mg equivalents of gallic acid (mg GAE/100 g propolis extract), according to the following equation. All samples were analyzed in triplicate.

$$\text{Total phenolic compounds (mg GAE/100 g)} = (\text{GAC} \times \text{V} \times \text{DF} \times 100) / (\text{weight of the sample (g)})$$

where:

GAC = Gallic acid concentration from the standard curve (mg/mL);

V = Volume of sample (mL);

DF = Sample dilution factor.

2.4.2. Total Flavonoid Quantification

The total flavonoid content was determined according to the Dowd method adapted by Arvouet-Grand et al. [21] with some modifications: a dilution of propolis extract (1:1000 *w/v*) was made using pure methanol, it was homogenized until complete solubility using a Vortex, then the extracts were centrifuged at $18,510 \times g$ for 15 min at 4°C (Hermle, Z 36 HK, Gosheim, Germany). A solution of 2% aluminum chloride (AlCl_3) in methanol was prepared. For this assay, 2 mL of the supernatant with 2 mL of AlCl_3 were placed in a

test tube, homogenized and left to stand at room temperature for 20 min in the absence of light. The absorbance was measured at 415 nm in a spectrophotometer (Jenway 6715, Ware, UK) using methanol as a blank. Quercetin was used for the elaboration of the standard curve (0 to 100 mg/L). The total content of flavonoids was expressed in equivalent mg of quercetin/100 g of propolis extract (mg QE/100 g of propolis extract), according to the following equation. All samples were analyzed in triplicate.

$$\text{Total flavonoids (mg QE/100 g)} = (\text{QC} \times \text{V} \times \text{DF} \times 100) / (\text{weight of the sample (g)})$$

where:

QC = Quercetin concentration from the standard curve (mg/mL);

V = Volume of sample (mL);

DF = Sample dilution factor.

2.5. Antioxidant Activities

2.5.1. ABTS Free Radical Inhibition Activity

The antioxidant activity was determined using the chromogenic compound 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) according to Pimentel-González et al. [22]. A dilution of propolis extract (1:1000 *w/v*) was made using 85% ethanol, it was homogenized until complete solubility using a vortex, then the extracts were centrifuged at $18,510 \times g$ for 15 min at 4 °C (Hermle, Z 36HK, Gosheim, Germany). Of 7 mM ABTS stock solution (36 mg of ABTS reagent), 20 mL was prepared by adjusting to 10 mL with distilled water and 10 mL of 2.45 mM potassium persulfate (5.83 mg of potassium persulfate in 10 mL of distilled water) was added. To generate the ABTS^{•+} free radicals, the mixture was kept under magnetic stirring for 24 h in total darkness. Before starting the reading of the samples, the ABTS^{•+} reagent was standardized at an absorbance of 0.7 ± 0.01 using 20% ethanol. An amount of 0.2 mL of the supernatant with 2 mL of standardized ABTS^{•+} was placed in a test tube, homogenized and left to stand at room temperature for 6 min in the absence of light. The samples were read at 734 nm in a spectrophotometer (Jenway 6715). Gallic acid was used to prepare the standard curve (0 to 100 mg/L) and 20% ethanol was used as a blank. Antioxidant activity was expressed as mg equivalents of gallic acid in 100 g of extract, according to the following equation. All samples were analyzed in triplicate.

$$\text{Antioxidant activity (mg GA/100 g)} = (\text{GA} \times \text{V} \times \text{DF} \times 100) / (\text{Sample weight (g)})$$

where:

GA = Gallic acid concentration from the standard curve (mg/mL);

V = Sample volume (mL);

DF = Sample dilution factor.

2.5.2. DPPH Free Radical Inhibition Activity

The antioxidant activity of DPPH (radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) was determined according to Turkmen et al. [23]. The propolis extract was diluted (1:1000 *w/v*) using methanol, homogenized until complete solubility using a vortex, then the extracts were centrifuged at $18,510 \times g$ for 15 min at 4 °C (Hermle, Z 36 HK, Gosheim, Germany). One hundred mL of a stock solution of 0.2 mM DPPH (7.9 mg of DPPH were dissolved and adjusted to 100 mL with 80% methanol) was prepared to generate DPPH[•] free radicals, and the mixture was kept under magnetic stirring for 2 h in total darkness. Before starting the reading of the extracts, the DPPH[•] reagent was standardized to an absorbance of 0.7 ± 0.01 using 80% methanol. Two and half mL of the standardized DPPH[•] reagent was added to 0.5 mL of the supernatant, and they were incubated for 1 h in the absence of light. Samples were read at 517 nm with a spectrophotometer (Jenway 6715, Ware, UK), and methanol was used as a blank. The antioxidant activity was expressed as mg equivalents of gallic acid in 100 g of extract, according to the following equation. All samples were analyzed in triplicate.

$$\text{Antioxidant activity (mg GA/100 g)} = (\text{GA} \times \text{V} \times \text{DF} \times 100) / (\text{Sample weight (g)})$$

where:

GA = Gallic acid concentration from the standard curve (mg/mL);

V = Sample volume (mL);

DF = Sample dilution factor

2.6. Antimicrobial Activity of Propolis Extracts

Four microbial strains were used: *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 43971) and *Candida albicans* (ATCC 1023). The strains were activated in a tube with 10 mL of Müller Hinton broth and incubated at 37 °C for 24 h. This operation was performed a total of three times. Finally, the turbidity of the microorganisms was standardized at 0.5 on the McFarland scale (1×10^8 CFU/mL).

The antibacterial activity was determined by the agar diffusion technique per well [24]. One mL of the microbial suspension adjusted to 0.5 in the McFarland scale was placed in a Petri dish and 20 mL of Müller–Hinton agar was added, the inoculum was homogenized and allowed to solidify, then the wells were made with a sterile punch (5 mm). From the pure extract, different dilutions (540 mg, 270 mg, 135 mg and 67.5 mg/mL) were prepared using dimethyl sulfoxide (DMSO) as diluent. Twenty-five µL of each of the concentrations, negative control (DMSO) and positive control (An antifungal–antibiotic solution (100×), consisting of 10,000 units of penicillin, 10 mg of streptomycin and 25 µg of amphotericin B per mL (Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V. A5955)) were placed in the wells. The boxes were incubated at 37 °C for 24 h. All analyses were performed in triplicate. For inhibitory activity, the diameter of the inhibition halos (mm) was measured with a vernier calliper.

2.7. Analysis of Results

A completely randomized design was used. The results are expressed as the mean ± standard deviation. When ANOVA had significant differences ($p \leq 0.05$), Tukey's technique of comparison of means was used. All analyses were performed using the Statgraphics Centurion XVI software version 16.1.11 (Stat Point Technologies, Inc., The Plains, VA, USA).

3. Results

3.1. Obtaining the Extracts

Performance/Yield

In general, the extraction method did not influence the yield of the extracts; however, the place of origin of the propolis does influence the yield. This could be due to the type of vegetation in which the bees collect the propolis. On the other hand, very high yields were obtained, ranging from 63.84 to 71.59% (Figure 1). The propolis from San Jerónimo Tecoaht was the one that presented the highest yield (71.34 to 71.54%), in addition there was no significant difference ($p \leq 0.05$) in the extraction method. On the other hand, the propolis from San Pedro Ocopetatillo was the one with the lowest yield (63.84–66.05%), and, again, the extraction method did not influence the yield.

3.2. Behavior of Bioactive Compounds during In Vitro Digestion

3.2.1. Total Phenols

Table 2 shows the content of total phenols in the propolis extracts, as well as in the different stages of in vitro digestion: gastric phase (GP), intestinal phase (IP) and intestinal phase after boiling (IPB). In general, no significant differences ($p < 0.05$) were found in the content of total phenols in the different propolis extracts and production methods. The content of phenolic compounds was from 30,824.9 to 34,406.6 mg GAE/100 g. There was a significant difference in the TU and TM propolis, with the ultrasound treatment having a higher phenol content (33,433.3 mg GAE/100 g). However, the treatments SP U and SP M and SJ U and SJ M were not affected by the method of acquisition. Therefore, the use of

ultrasound can be an excellent option for obtaining propolis extracts, reducing the time it takes to acquire them.

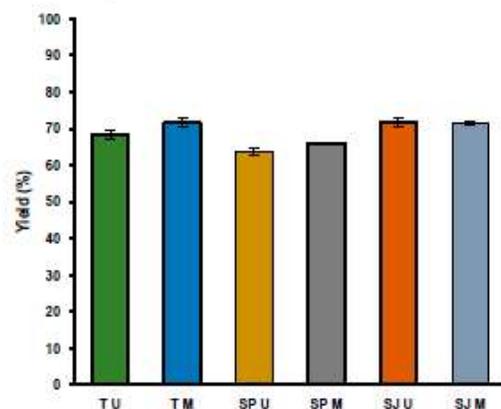


Figure 1. Yield in propolis extracts, from three places and two extraction methods. (T U = Teotitlán de Flores Magón, Ultrasound; T M = Teotitlán de Flores Magón, Maceration; S P U = San Pedro Ocopetatlillo, Ultrasound; S P M = San Pedro Ocopetatlillo, Maceration; S J U = San Jerónimo Tecóatl, Ultrasound; S J M = San Jerónimo Tecóatl, Maceration).

Table 2. Behavior of total phenols during the in vitro digestion of different propolis extracts.

Phase	Total Phenolic Content (mg GAE/100 g)					
	TU	TM	SPU	SPM	SJU	SJM
Ext	33,433.3 ± 293.9 ^{aA}	31,642.4 ± 1110.0 ^{aB}	33,316.5 ± 178.4 ^{aA}	34,406.6 ± 116.7 ^{aA}	31,253.1 ± 233.5 ^{aB}	30,824.9 ± 526.6 ^{aB}
GP	7262.6 ± 189.9 ^{bB,C}	6946.7 ± 321.1 ^{bA}	6921.9 ± 87.5 ^{bA,B}	7476.7 ± 58.3 ^{bC}	7447.5 ± 87.5 ^{bC}	7291.8 ± 73.4 ^{bB,C}
IP	7572.8 ± 245.2 ^{bA,B}	7245.8 ± 88.1 ^{bA}	7187.4 ± 245.2 ^{bA}	7315.9 ± 88.1 ^{bC,A}	7374.3 ± 123.0 ^{bA}	8098.4 ± 455.5 ^{bB}
IPB	7273.8 ± 157.9 ^{bA}	7495.8 ± 420.4 ^{bA}	6958.5 ± 20.2 ^{bA}	7180.4 ± 0.0 ^{cA}	7472.4 ± 438.1 ^{bA}	8208.2 ± 72.9 ^{bB}

Different lowercase letters in the columns represent a significant difference ($p < 0.05$) with a comparison of means using Tukey's test. Different capital letters in the rows represent a significant difference ($p < 0.05$) with a comparison of means using Tukey's test. Ext = Extract, GP = Gastric Phase, IP = Intestinal Phase, IPB = Intestinal Phase after Boiling. T U = Teotitlán de Flores Magón, Ultrasound; T M = Teotitlán de Flores Magón, Maceration; S P U = San Pedro Ocopetatlillo, Ultrasound; S P M = San Pedro Ocopetatlillo, Maceration; S J U = San Jerónimo Tecóatl, Ultrasound; S J M = San Jerónimo Tecóatl, Maceration.

During in vitro digestion (GP), there was a decrease of around 80% in the content of total phenols in all treatments. This could indicate that the acid pH or pepsin may directly affect these compounds. However, in the next stage of digestion (IP and IPB) the phenols remained constant. The phenol content at the end of the digestion was from 6958.5 to 8208.2 mg GAE/100 g.

3.2.2. Total Flavonoids

The propolis extracts from TU (Teotitlán de Flores Magón), presented the highest content of flavonoids with a range of 18,107.7 to 19,523.2 mg QE/100 g, followed by the extracts from SP (San Pedro Ocopetatlillo) with 3361.0 to 4152.3 mg QE/100 g and the extracts with the lowest content were those from SJ (San Jerónimo Tecóatl) with 2859.8 to 3237.9 mg QE/100 g (Table 3). All the extracts obtained by ultrasound have the highest content of flavonoids. In general, during in vitro digestion, the flavonoid content was modified in each of the phases. At the end of the digestion, the treatments SJ U and SJ M were the most affected with a reduction greater than 98%, and TU and TM presented a reduction of 91.6%. Therefore, we can deduce that the digestion process negatively affects the bioavailability of bioactive compounds (flavonoids) of propolis extracts, therefore its functional properties could be affected.

Table 3. Behavior of total flavonoids during the in vitro digestion of different propolis extracts.

Phase	Total Flavonoid Content (mg QE/100 g)					
	T U	T M	SP U	SP M	SJ U	SJ M
Ext	19,523.2 ± 0.0 ^{aE}	18,107.7 ± 108.8 ^{aD}	4152.3 ± 46.1 ^{aC}	3361.0 ± 39.5 ^{aB}	3237.9 ± 82.4 ^{aB}	2859.8 ± 82.4 ^{aA}
GP	1170.4 ± 0.0 ^{dA}	1258.3 ± 57.8 ^{cA}	741.8 ± 32.9 ^{bB}	670.4 ± 9.5 ^{bB}	340.6 ± 25.1 ^{bC}	412.1 ± 49.4 ^{bC}
IP	1345.2 ± 39.5 ^{cA}	1325.4 ± 39.5 ^{cA}	553.9 ± 0.0 ^{cB}	184.6 ± 30.2 ^{dD}	296.7 ± 0.0 ^{bC}	487.9 ± 11.4 ^{bB}
IPB	1628.7 ± 11.4 ^{bA}	1496.8 ± 11.4 ^{bB}	389.0 ± 11.4 ^{dC}	296.7 ± 0.0 ^{cD}	59.3 ± 0.0 ^{cE}	19.7 ± 0.0 ^{cF}

Different lowercase letters in the columns represent a significant difference ($p < 0.05$) with a comparison of means using Tukey's test. Different capital letters in the rows represent a significant difference ($p < 0.05$) with a comparison of means using Tukey's test. Ext = Extract, GP = Gastric Phase, IP = Intestinal Phase, IPB = Intestinal Phase after Boiling, T U = Teotitlán de Flores Magón, Ultrasound; T M = Teotitlán de Flores Magón, Maceration; SP U = San Pedro Ocopetatlillo, Ultrasound; SP M = San Pedro Ocopetatlillo, Maceration; SJ U = San Jerónimo Tecóatl, Ultrasound; SJ M = San Jerónimo Tecóatl, Maceration.

3.3. Antioxidant Activity during In Vitro Digestion

The antioxidant capacity (ABTS) of the extracts was higher in the extracts obtained by maceration, with the exception of the SJ U and SJ M treatments, where there is no significant difference ($p \leq 0.05$) due to the extraction method (Table 4). However, during in vitro digestion in the gastric phase, all extracts showed a decrease in antioxidant activity: TU 86%, TM 89%, SP U 92%, SP M 93%, SJ U 91% and SJ M 91%. This could indicate that the gastric conditions cause some type of hydrolysis or reaction with other compounds that affects the antioxidant capacity. At the end of the intestinal phase, an increase in antioxidant capacity is seen in all treatments, with some of them showing a significant difference ($p \leq 0.05$). In general, the antioxidant capacity by DPPH is greater than the antioxidant capacity by ABTS. In the gastric phase there was an increase in the antioxidant capacity by DPPH of close to 50%, probably due to the hydrolysis of larger phenolic compounds, forming some smaller ones. However, at the end of the intestinal phase there was again a reduction in antioxidant capacity, which could affect the functional properties of the propolis extracts.

Table 4. Antioxidant activity of propolis extracts and their behavior during in vitro digestion.

Phase	ABTS (mg GAE/100 g)					
	T U	T M	SP U	SP M	SJ U	SJ M
Ext	8333.2 ± 355.7 ^{aA}	10,793.8 ± 333.7 ^{aB}	14,647.7 ± 578.0 ^{aC}	16,530.2 ± 867.2 ^{aD}	13,180.3 ± 933.8 ^{aC}	13,002.4 ± 533.6 ^{aC}
GP	1133.4 ± 294.1 ^{cA}	1152.0 ± 462.8 ^{cA}	1126.0 ± 169.8 ^{cA}	1100.1 ± 222.3 ^{dA}	1100.1 ± 111.1 ^{dA}	1092.7 ± 128.3 ^{dA}
IP	3977.3 ± 607.6 ^{bA}	3779.7 ± 876.7 ^{bA}	3092.4 ± 3100.2 ^{bA/B}	2827.4 ± 2964.5 ^{cB}	2899.3 ± 2358.4 ^{cB}	3856.0 ± 876.7 ^{cA}
IPB	3821.0 ± 2156 ^{bA/B}	3812.0 ± 473.2 ^{bA/B}	3996.2 ± 134.7 ^{bB/C}	3663.8 ± 77.8 ^{bA}	4054.6 ± 473.2 ^{bB/C}	4157.9 ± 1078.0 ^{bC}
DPPH antioxidant activity (mg GAE/100 g)						
Ext	20,706.4 ± 648.8 ^{bA}	18,883.8 ± 1223.7 ^{bA}	19,315.5 ± 299.5 ^{bA}	13,368.3 ± 843.0 ^{bC}	17,013.3 ± 83.0 ^{bB}	16,773.5 ± 0.0 ^{bB}
GP	35,817.7 ± 1438.8 ^{aA/B}	39,534.8 ± 2651.4 ^{aA}	29,342.9 ± 1438.8 ^{bC}	38,455.6 ± 1774.4 ^{aA}	36,777.0 ± 1361.8 ^{aA/B}	32,580.3 ± 1648.4 ^{aB/C}
IP	1471.9 ± 436.0 ^{cA}	3383.4 ± 0.0 ^{cB}	1203.4 ± 872.0 ^{cC}	1494.0 ± 251.7 ^{cC}	2366.1 ± 907.6 ^{cB/C}	2656.7 ± 666.0 ^{cB/C}
IPB	1813.8 ± 1572.0 ^{dA}	360.4 ± 251.0 ^{cA}	796.4 ± 666.0 ^{cA}	1232.4 ± 251.7 ^{cA}	2685.8 ± 1744.0 ^{cA}	1184.2 ± 755.2 ^{dA}

Different lowercase letters in the columns represent a significant difference ($p < 0.05$) with a comparison of means using Tukey's test. Different capital letters in the rows represent a significant difference ($p < 0.05$) with a comparison of means using Tukey's test. Ext = Extract, GP = Gastric Phase, IP = Intestinal Phase, IPB = Intestinal Phase after Boiling, T U = Teotitlán de Flores Magón, Ultrasound; T M = Teotitlán de Flores Magón, Maceration; SP U = San Pedro Ocopetatlillo, Ultrasound; SP M = San Pedro Ocopetatlillo, Maceration; SJ U = San Jerónimo Tecóatl, Ultrasound; SJ M = San Jerónimo Tecóatl, Maceration.

3.4. Antimicrobial Activity

Figure 2 shows the antimicrobial activity of the six propolis extracts obtained by ultrasound and maceration against four pathogenic strains. It should be mentioned that the antimicrobial activity was evaluated in the extracts before and at the end of in vitro digestion. However, no treatment at the end of the simulated in vitro digestion showed inhibitory activity. On the other hand, the higher the concentration of extract, the greater the halos of inhibition. The inhibitory activity is a function of the components of the extract, the place of origin of the propolis and in some cases of the extraction method. The SP U

and SP M treatments did not present activity against *S. aureus*. The greatest inhibition for *S. aureus* was the SJ U treatment. In this case, the ultrasound (SJ U) treatment was better than the maceration (SJ M). All treatments presented inhibitory activity for *C. albicans*. In addition, this strain was the one that presented the highest inhibition halos; therefore, we consider that these extracts could be an excellent source of bioactive compounds in the preparation of formulations for control of urogenital infections. Regarding *E. coli*, the TU and TM treatments presented the highest inhibitory activities, followed by the SJ U and SJ M treatments. It is worth mentioning that these treatments did not present inhibition halos at concentrations lower than 270 and 135 mg/mL, respectively, being able to be considered as the minimum inhibitory concentration. In addition, the SP U and SP M treatments did not present inhibition halos at any of the concentrations evaluated. For *S. typhimurium*, all the extracts presented halos of inhibition, the largest being the extracts obtained by maceration. Finally, we consider that the analysed propolis can be used in traditional medicine for the treatment of various health conditions.

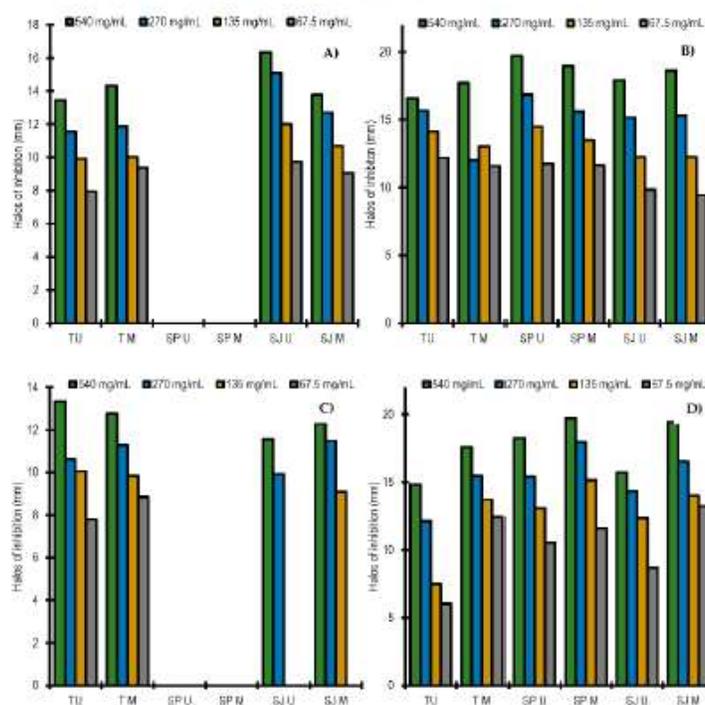


Figure 2. Inhibitory activity of propolis extracts against different microbial strains. (A) *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709), (B) *Candida albicans* (ATCC 1023), (C) *Escherichia coli* (ATCC 25922) and (D) *Salmonella typhimurium* (ATCC 43971).

4. Discussion

In general, raw propolis is not used in the preparation of food or medicine due to its composition. Extracts are its most common form, and it is important to consider that the performance of the extracts is variable due to different factors, such as the extraction method (maceration, Soxhlet, ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction, supercritical fluids with CO₂ and high pressure), the nature of the solvent (according to its polarity; low, medium or high), ratio or proportion of solvent and time and tempera-

ture of extraction [4,15]. Our extracts presented a yield of 63.8 to 71.5%, being higher than the 2.57 to 22.67% [25] and 18.2% [26] of various propolis simples.

According to the Official Mexican Standard, propolis marketed in Mexico must have a minimum of 5000 mg EGA/100 g of phenolic compounds [3]. The propolis analysed had a total phenol content of 30,824.9 to 34,406.6 mg EGA/100 g, thus complying with Mexican regulations. In addition, these results are higher than those reported in ethanolic extracts of propolis from China (8934.3 to 20,178.6 mg EGA/100 g). These extracts were obtained with ultrasounds, and the difference in the content of total phenols could be related to the type of vegetation from which the bees collected the propolis and the collection season, as well as various environmental factors [27,28]. Ethanolic extracts (70%) of propolis from Turkey have a very variable total phenol content, ranging from 2748 to 19,970 mg EGA/100 g. The authors mention that this variability is associated with the geographical origin of the propolis. In addition, these values are lower than ours [29]. On the other hand, aqueous extracts of propolis from Algeria have a total phenol content of 9688.3 to 45,883.3 mg EGA/100 g, the variation was mainly due to the place of origin of the propolis [30]. On the other hand, there are various methods for the purification of extracts, which can influence the content of bioactive compounds. In the elaboration of propolis extracts from Greece, four purification methods were used, obtaining a total phenol content of 11,385 to 29,811 mg EGA/100 g, centrifugation being the most effective method [31]. The total phenolic content in ethanolic extracts of propolis from Turkey was 25,000 mg EGA/100 g. However, at the end of *in vitro* digestion only 8.9% were bioavailable. It should be noted that *in vitro* digestion was performed in crude propolis [29], thus the low bioavailability of phenols could be due to acid conditions and possible isomerization reactions of the phenolic compounds during the digestion process [32]. The bioavailability of our extracts at the end of digestion was 20.88 to 26.62%.

The range of total flavonoids in our extracts was from 2859 to 19,523 mg EQ/100 g of propolis. These results are higher than those proposed by the Mexican regulations (min. 500 mg EQ/100 g). Various investigations report a total flavonoid content of 3823 to 4745 mg EQ/100 g [31]; 304.7 to 527.3 mg EQ/100 g [30]; 16,622 to 51,977 mg EQ/100 g [27]; 1100 to 15,000 mg EQ/100 g [7]; 4946.5 mg EQ/100 g [33]; and 55,758 mg EQ/100 g [26]. As we can see, the flavonoids' content is highly variable; therefore, biological activity could vary. As mentioned above, the composition of phenolic compounds (flavonoids) depends on factors, such as floral and geographical origin. However, for the biological properties of the extracts to be preserved, it is important to assess the bioavailability at the end of the digestion. The bioavailability of total flavonoids from our extracts at the end of *in vitro* digestion ranged from 0.68 to 9.36%. Therefore, it is important to look for alternatives for the protection of bioactive compounds during gastrointestinal conditions.

The propolis extracts presented strong antioxidant activity, using the ABTS and DPPH methods, ranging from 8333.2 to 16,530.2 and 13,368.3 to 20,706.4 mg EGA/100 g, respectively. We can observe that the antioxidant activity is directly related to the content of phenolic compounds (Tables 2 and 3), and the significant difference ($p \leq 0.05$) that the extracts present is mainly due to the place of collection of the propolis [8] and, in some cases, to the method of obtaining. On the other hand, the antioxidant activity of propolis extracts can be increased using various purification methods, centrifugation being one of the most effective [31]. Around the world there are several investigations on the biological properties and characterization of bioactive compounds in propolis extracts with very promising results. The extracts obtained by the ultrasound-assisted method have better biological properties than the extracts obtained by traditional methods [27,34], which is why, in recent years, it has become the most popular method in the areas of medicine, biochemistry, food industry, among others [35]. On the other hand, ethanol is the best extraction solvent for obtaining propolis extracts by ultrasounds [36]. During *in vitro* digestion, the antioxidant activity by both the ABTS and DPPH methods was significantly affected, as was the content of phenolic compounds (total phenols and flavonoids). At the end of the digestion there was a decrease in antioxidant activity from 77.83% for ABTS and from 98.09% for DPPH.

As we have been able to observe, the antimicrobial activity of the evaluated extracts is variable, and its effect depends mainly on the place of origin rather than on the extraction method. It has been proposed that the antimicrobial activity of propolis extracts acts in two ways: (1) Direct effect on the microorganism, affecting the permeability of the cell membrane, cell membrane disruption, decreased ATP production and decreased mobility and (2) the stimulation of the immune system, activating the body's natural defenses [7,37]. There are various works available on the antimicrobial activity of propolis. These investigations vary according to the type of microorganism to be evaluated (bacteria, molds, yeasts, protozoa and viruses), extraction conditions (method, temperature, type of solvent, ratio or proportion of solvent, etc.), as well as the place of origin of the propolis [38]. The extracts obtained by ultrasounds have antimicrobial activity against the strains of *S. aureus*, *E. coli*, *C. krusei*, *C. glaucosporioides*, *M. mucedo* and *A. solani*, ultrasounds being an excellent means of obtaining propolis extracts [39]. Propolis from Chile has antibacterial activity with strains of *S. mutans* and also decreases the formation of biofilms [39]. Rivero et al. [40] mentions that propolis from Guanajuato, Mexico, has an excellent antibacterial activity against oral pathogens (*S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis* and *P. gingivalis*).

5. Conclusions

The use of ultrasound in the production of ethanolic extracts of propolis can be an excellent option, since it provides better yields and increases its biological activity. In vitro digestion considerably reduces the content of bioactive compounds in the extracts analysed total phenols and total flavonoids thus, the antioxidant activity and antimicrobial activity. In what concerns the antimicrobial activity, the inhibition halos depend mainly on the concentration and the place of origin of the propolis.

Author Contributions: Investigation, L.G.-M.; writing—original draft, A.C.E.; writing—review and editing, G.M.-P.; validation, F.F.-L.; data curation, G.A.-A.; visualization, E.P.-S.; formal analysis, S.P.-R.; supervision, R.G.C.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially funded by FCT—Foundation for Science and Technology (UIDB/04020/2020).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Aminmoghadamfarouj, N.; Nematollahi, A. Propolis Diterpenes as a Remarkable Bio-Source for Drug Discovery Development: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1290. [CrossRef]
2. Zabaoui, N.; Fouache, A.; Trousson, A.; Baron, S.; Zellagui, A.; Lahouel, M.; Lobaccaro, J.A. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chem. Phys. Lipids* **2017**, *207*, 214–222. [CrossRef] [PubMed]
3. Norma Oficial Mexicana (NOM). NOM-003-SAG/GAN-2017. Propóleos, Producción y Especificaciones para su Procesamiento. 2017. Available online: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5500103&fecha=06/10/2017#gsc.tab=0 (accessed on 20 June 2022).
4. Šuran, J.; Cepanec, I.; Mašek, T.; Radić, B.; Radić, S.; Tlak Gajger, I.; Vlarić, J. Propolis Extract and Its Bioactive Compounds from Traditional to Modern Extraction Technologies. *Molecules* **2021**, *26*, 2930. [CrossRef] [PubMed]
5. Huang, S.; Zhang, C.P.; Wang, K.; Li, G.Q.; Hu, F.L. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* **2014**, *19*, 19610–19632. [CrossRef] [PubMed]
6. Do Nascimento, T.G.; dos Santos Arruda, R.E.; da Cruz Almeida, E.T.; dos Santos Oliveira, J.M.; Basilio-Júnior, I.D.; de Moraes Porto, I.C.C.; Rodrigues Sabino, A.R.; Tonholo, J.; Gray, A.; Edrada Ebel, R.E.; et al. Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18293. [CrossRef]
7. Anjum, S.I.; Ullah, A.; Khan, K.A.; Attaullah, M.; Khan, H.; Ali, H.; Bashir, M.A.; Tahir, M.; Ansari, M.J.; Ghramh, H.A.; et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *7*, 1695–1703. [CrossRef]
8. Gardini, S.; Bertelli, D.; Marchetti, L.; Graziosi, R.; Pinetti, D.; Plessi, M.; Marcuzzan, G.L. Chemical composition of Italian propolis of different ecoregional origin. *J. Agric. Res.* **2018**, *57*, 639–647. [CrossRef]
9. Zülhendri, F.; Chandrasekaran, K.; Kowacz, M.; Ravalía, M.; Kripal, K.; Fearnley, J.; Perera, C.O. Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review. *Foods* **2021**, *10*, 1360. [CrossRef]
10. Martinotti, S.; Ranzato, E. Propolis: A new frontier for wound healing? *Burns Trauma* **2015**, *3*, 9. [CrossRef]

11. Pasupuleti, V.R.; Sammugam, L.; Ramesh, N.; Gan, S.H. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1259510. [\[CrossRef\]](#)
12. Przybyłek, I.; Karpiniński, T.M. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* **2019**, *24*, 2047. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Ahmed, S.; Sulaiman, S.A.; Baig, A.A.; Ibrahim, M.; Liaqat, S.; Fatima, S.; Jabeen, S.; Shamim, N.; Othman, N.H. Honey as a potential natural antioxidant medicine: An insight into its molecular mechanisms of action. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 8367846. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Nishio, E.K.; Ribeiro, J.M.; Oliveira, A.G.; Andrade, C.G.T.J.; Proni, A.E.; Kobayashi, R.K.T.; Nakazato, G. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21641. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Bankova, V.; Trusheva, B.; Popova, M. Propolis extraction methods: A review. *J. Apic. Res.* **2021**, *60*, 734–743. [\[CrossRef\]](#)
16. Quintero-Lira, A.; Ángeles Santos, A.; Aguirre-Álvarez, G.; Reyes-Munguia, A.; Almaraz-Buendia, L.; Campos-Montiel, R.G. Effects of liquefying crystallized honey by ultrasound on crystal size, 5-hydroxymethylfurfural, colour, phenolic compounds and antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 619–626. [\[CrossRef\]](#)
17. Peláez-Acero, A.; Cobos-Velasco, J.E.; González-Lemus, U.; Espino-Manzano, S.O.; Aguirre-Álvarez, G.; González-Montiel, L.; Figueira, A.C.; Campos-Montiel, R.G. Bioactive compounds and antibacterial activities in crystallized honey liquefied with ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **2021**, *76*, 105619. [\[CrossRef\]](#)
18. Osés, S.M.; Pascual-Maté, A.; Fernández-Muñoz, M.A.; López-Díaz, T.M.; Sancho, M.T. Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem.* **2016**, *196*, 1215–1223. [\[CrossRef\]](#)
19. Minekus, M.; Alvinger, M.; Alvito, P.; Balance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—An international consensus. *Food Funct.* **2014**, *6*, 1113–1124. [\[CrossRef\]](#)
20. Rababah, T.M.; Al-Omouh, M.; Brewer, S.; Alhamad, M.; Yang, W.; Alrababah, M.; Al-Ghazawi, A.A.; U'datt, M.; Ereifej, K.; Alsheyab, F.; et al. Total phenol, antioxidant activity, flavonoids, anthocyanins and color of honey as affected by floral origin found in the arid and semiarid Mediterranean areas. *J. Food Process Preserv.* **2013**, *38*, 1119–1128. [\[CrossRef\]](#)
21. Arvouet-Grand, A.; Vennat, B.; Pourrat, A.; Legret, P. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants [Standardization of propolis extract and identification of principal constituents]. *J. Pharm. Belg.* **1994**, *49*, 462–468.
22. Pimentel-González, D.J.; Jiménez-Alvarado, R.; Hernández-Fuentes, A.D.; Figueira, A.C.; Suarez-Vargas, A.; Campos-Montiel, R.G. Potentiation of bioactive compounds and antioxidant activity in artisanal honeys using specific heat treatments. *J. Food Biochem.* **2015**, *40*, 47–52. [\[CrossRef\]](#)
23. Turkmen, N.; Sari, F.; Poyrazoglu, E.S.; Velioglu, Y.S. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chem.* **2006**, *95*, 653–657. [\[CrossRef\]](#)
24. Montero-Recalde, M.; Mira, J.C.; Avilés-Esquivel, D.; Pazmiño-Miranda, P.; Erazo-Gutiérrez, R. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Investig. Vet. Peru.* **2018**, *29*, 588–593. [\[CrossRef\]](#)
25. Bayram, N.E.; Sorkun, K.; Öz, G.C.; Salih, B.; Topçu, G. Chemical Characterization of 64 Propolis Samples from Hakkari, Turkey. *Rev. Nat. Prod.* **2018**, *12*, 569–581. [\[CrossRef\]](#)
26. Soltani, E.; Mokhnache, K.; Charef, N. Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Ethanolic and Aqueous Algerian Propolis Extracts (Region of Serdj el ghoul). *J. Dmg Deliv. Ther.* **2020**, *10*, 1–4. [\[CrossRef\]](#)
27. Ding, Q.; Sheikh, A.R.; Gu, X.; Li, J.; Xia, K.; Sun, N.; Wu, R.A.; Luo, L.; Zhang, Y.; Ma, H. Chinese Propolis: Ultrasound-assisted enhanced ethanolic extraction, volatile components analysis, antioxidant and antibacterial activity comparison. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *9*, 313–330. [\[CrossRef\]](#)
28. Mountford-McAuley, R.; Prior, J.; Clavijo-McCormick, R. Factors affecting propolis production. *J. Apic. Res.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
29. Ozdal, T.; Ceylan, F.D.; Eroglu, N.; Kaplan, M.; Olgun, E.O.; Capanoglu, E. Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Int. Food Res.* **2019**, *122*, 528–536. [\[CrossRef\]](#)
30. Soltani, E.K.; Zaim, K.; Mokhnache, K.; Haichour, N.; Mezache-Aichour, S.; Charef, N.; Zerroug, M.M. Polyphenol Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous Algerian Propolis Extracts. *Phytotherapie* **2021**, *19*, 408–415. [\[CrossRef\]](#)
31. Graikini, D.; Papachristoforou, A.; Mourtzinou, I. Comparison of qualitative characteristics of propolis extracts using different purification methods. *J. Apic. Res.* **2019**, *58*, 792–799. [\[CrossRef\]](#)
32. Turkut, G.M.; Er, M.; Degirmenci, A. Evaluating Bioactivity and Bioaccessibility Properties of Turkish Propolis Extracts Prepared with Various Solvents. *J. Apith. Nat.* **2019**, *2*, 7–11. [\[CrossRef\]](#)
33. Mouhoubi-Tafnine, Z.; Ouchemouk, S.; Tamendjari, A. Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *88*, 85–90. [\[CrossRef\]](#)
34. Bakkaloglu, Z.; Anci, M.; Karasu, S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of turkish propolis and characterization of phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activity. *Food Sci. Technol.* **2021**, *41*, 687–695. [\[CrossRef\]](#)
35. Yuan, Y.; Zheng, S.; Zeng, L.; Deng, Z.; Zhang, B.; Li, H. The Phenolic Compounds, Metabolites, and Antioxidant Activity of Propolis Extracted by Ultrasound-Assisted Method. *J. Food Sci.* **2019**, *84*, 3850–3865. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Cavalaro, R.I.; da Cruz, R.G.; Dupont, S.; De Moura Bell, J.M.L.N.; de Souza Vieira, T.M.F. In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from Green Propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food Chem. X* **2019**, *4*, 100054. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

37. Shehata, M.G.; Ahmad, E.T.; Badr, A.N.; Masry, S.H.; El-Sohaimy, S.A. Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions. *Ann. Agric. Sci.* **2020**, *65*, 209–217. [[CrossRef](#)]
38. Pobiega, K.; Kraśniewska, K.; Derewiaka, D.; Gniewosz, M. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 5386–5395. [[CrossRef](#)]
39. Veloz, J.J.; Alvear, M.; Salazar, L.A. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 7602343. [[CrossRef](#)]
40. Rivero-Cruz, J.F.; Granados-Pineda, J.; Pedraza-Chaverri, J.; Pérez-Rojas, J.M.; Kumar-Passari, A.; Díaz-Ruiz, G.; Rivero-Cruz, B.E. Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic Extract of Mexican Brown Propolis. *Antioxidants* **2020**, *9*, 70. [[CrossRef](#)]