



## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEOS LÍQUIDO Y LIOFILIZADO

Y. Irigoiti<sup>(1)</sup>, A.S. Navarro<sup>(1,2)</sup>, D.K. Yamul<sup>(3)</sup>

(1) *Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA, UNLP-CIC-CONICET), La Plata, Buenos Aires, Argentina*

(2) *Facultad de Ingeniería (UNLP), La Plata, Buenos Aires, Argentina.*

(3) *Departamento de Tecnología y Calidad de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, (UNICEN, CONICET), Tandil, Buenos Aires, Argentina.*

*e-mail: karim@biol.unlp.edu.ar*

### Resumen

El propóleo es un material resinoso producido por las abejas a partir de resinas recolectadas de distintos árboles. Su composición química y su actividad biológica dependen principalmente de la flora local, la región geográfica y el clima. Entre las propiedades que posee, la actividad antioxidante es una de las de mayor interés. Se cree que los compuestos polifenólicos, en particular los flavonoides, son los principales responsables de la misma. En este trabajo, se comparó el contenido de polifenoles (método de Folin-Ciocalteu), flavonoides (método del tricloruro de aluminio), la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS) y las características espectroscópicas (FT-IR y espectro UV-Vis), de un extracto etanólico de propóleos (EEP) (10% p/v) y del mismo extracto liofilizado y luego resuspendido en etanol (10% p/v). Los resultados mostraron que el EEP sin liofilizar presentó un contenido de polifenoles totales de  $420,00 \pm 14,14$  mg AG/g propóleos y de flavonoides de  $45,07 \pm 1,14$  mg quercetina/g propóleos, mientras que para el EEP liofilizado los valores fueron  $362,50 \pm 10,61$  mg AG/g propóleos y  $42,06 \pm 4,51$  mg quercetina/g propóleos, respectivamente. Respecto a la capacidad antioxidante, el EEP sin liofilizar mostró una  $EC_{50}$  de  $42,96$  mg propóleos/mg DPPH• en el ensayo de DPPH y un resultado de  $1,56 \pm 0,11$   $\mu$ mol trolox/mg propóleos en el de ABTS. En cambio, EEP liofilizado mostró valores de  $39,75$  mg propóleos/mg DPPH• (DPPH) y de ABTS de  $1,32 \pm 0,05$   $\mu$ mol trolox/mg propóleos, hallándose diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con los resultados del EEP sin liofilizar solamente en la determinación de polifenoles totales. Al analizar los resultados de las medidas espectroscópicas, se observó que los espectros UV-vis de ambas muestras presentaron un máximo de absorción a 290 nm, característico de propóleos. Por otro lado, no se observaron diferencias en los espectros FT-IR de las muestras analizadas. Los resultados obtenidos muestran que el proceso de liofilización no produjo cambios significativos en el contenido de flavonoides y en la actividad antioxidante con el ABTS. Sin embargo, en el caso de los polifenoles totales se obtuvieron valores menores para el extracto liofilizado. Las características espectroscópicas del extracto tampoco se vieron afectadas por la liofilización por lo que dicho proceso constituiría un método adecuado para su microencapsulación y conservación a largo plazo.

**Palabras clave:** Propóleos, Polifenoles, Flavonoides, Antioxidantes, Liofilización.

## 1. Introducción

Los propóleos o própolis son sustancias resinosas elaboradas por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de ciertas especies vegetales, que son transportadas al interior de la colmena y modificadas parcialmente con sus secreciones salivares.

Gracias a su contenido en aceites esenciales, el própolis suele ser aromático y en función de su origen botánico y de la época de recolección, difiere en color (de amarillo claro a castaño oscuro), sabor (amargo, ligeramente picante o insípido) y consistencia (Krell, 1996; Bracho, 2003). Se han encontrado más de 300 componentes en los propóleos, entre ellos, compuestos fenólicos, flavonoides, compuestos aromáticos, terpenos y aceites esenciales que presentan fuertes propiedades antioxidantes (Sudina y col., 1993).

Al igual que la miel, el própolis se conoce desde la más remota antigüedad y ha sido ampliamente utilizado por diferentes culturas con diversas finalidades, entre ellas en medicina (Krell, 1996; Burdock, 1998; Bracho, 2003). Con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterápicos, el própolis dejó prácticamente de utilizarse. Recientemente, se observa un resurgimiento en su uso y actualmente se investigan sus propiedades farmacológicas que varían de acuerdo con su origen botánico (Ledón, 1996).

La incorporación de pequeñas cantidades de componentes con funciones especiales en los alimentos puede influenciar en gran medida las características nutricionales, calidad, costo y aceptabilidad del producto terminado. Sin embargo, la utilización de estos compuestos activos frecuentemente requiere propuestas innovadoras debido a su sensibilidad hacia algunos factores físicos o químicos a los que se encontrarán expuestos. Estos factores pueden estar relacionados con la pérdida de su funcionalidad biológica, degradación química o alteraciones durante el procesamiento o almacenamiento. Debido a su fracción de ácido fenólico volátil y su solubilidad en alcohol, los propóleos presentan un sabor fuerte y desagradable y un olor característico que generalmente altera las características sensoriales de los alimentos (Thomson 1990; Banskota y col., 2001; Da Silva y col., 2011). Por esta razón, la aplicación de propóleos a los alimentos es aún limitada. El proceso de liofilización podría volver al producto mucho más sencillo y viable a la hora de su inclusión a distintos alimentos. Sin

embargo, debería asegurarse que dicho proceso no altere las propiedades de los propóleos.

El objetivo de este trabajo fue liofilizar un EEP y evaluar su actividad antioxidante y sus características espectroscópicas, antes y después del proceso de secado.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Materia prima, obtención del EEP y liofilización**

Se utilizó un propóleos recogido por mallas colocadas en colmenas del centro-este de la provincia de Buenos Aires. Las muestras se conservaron refrigeradas y al abrigo de la luz para prevenir su oxidación natural. Para la obtención del extracto, se pesaron 100 g del propóleos bruto, el cual se congeló a -15°C durante 12 h, luego de disgregarlo y molerlo en mortero hasta obtener un polvo. Luego se adicionaron 900 mL de alcohol etílico de 96°; se conservó durante tres días en estufa a 40 °C, agitando media hora cada día. Al cuarto día se colocó a 0 °C durante 2 h, y luego se filtró. Se completó a volumen final de 1000 mL con alcohol etílico de 96°, obteniéndose un EEP 10% (p/v).

Una vez obtenido el extracto, se procedió a la liofilización del mismo. Se colocaron 20 mL del EEP en cajas de petri de vidrio que se secaron en estufa de vacío vacuum oven Li Tekvo modelo DZF-6030A (Li Tekvo Instruments, Minhang District, Shanghai, China) a 40 °C y presión reducida, para eliminar el etanol. Luego, las placas se colocaron durante 24 h en freezer a -80°C (Thermo 700 Series, Forma ULT Freezer, U.S.A.), para luego liofilizarlo en un equipo LAB4C-Raficor (Argentina), durante 48 h. Una vez obtenido el polvo del extracto liofilizado, el mismo se conservó en frascos color caramelo dentro de un desecador para protegerlos de la luz y la humedad.

### **2.2. Determinación de la actividad antioxidante**

#### **2.2.1. Polifenoles totales**

La determinación de polifenoles totales en los extractos se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu tal como se describe en la norma IRAM-INTA 15935-2. El contenido total de polifenoles se expresó como mg equivalente de ácido gálico (AG)/g propóleos.

#### **2.2.2. Flavonoides totales por el método del tricloruro de aluminio**

Para la determinación se siguió la metodología de la norma IRAM-INTA 15935-2 modificada, ya que en nuestro trabajo se empleó etanol, en lugar de metanol. El contenido total de flavonoides se expresó como mg equivalente de quercetina/g propóleos.

### **2.2.3. Eliminación de radicales libres por DPPH**

La actividad antirradical o antioxidante fue determinada usando el radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH<sup>•</sup>) como radical libre siguiendo el protocolo de Brand Williams y col. (1995). La actividad anti-radical fue definida como la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH<sup>•</sup> en un 50% (Concentración eficiente = EC<sub>50</sub> expresada como mg antioxidante por mg DPPH<sup>•</sup>).

### **2.2.4. Capacidad inhibitoria del radical ABTS**

El ensayo de capacidad antioxidante se llevó a cabo mediante el método ABTS mejorado, según lo descrito por Re y col. (1999). Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/mg propóleos.

## **2.3. Análisis espectroscópico**

### **2.3.1. Espectro FT-IR**

Se realizó la determinación por espectroscopía FTIR sobre los EEP (liofilizado y sin liofilizar), con un equipo Thermo Fisher Scientifics Nicolet S10 FT-IR Spectrometer (EE.UU). Se realizaron 64 barridos por muestra y por duplicado en la región de (4000-650)  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.3.2. Espectro UV-Vis**

Las muestras se procesaron de acuerdo a la norma IRAM-INTA 159352, obteniéndose EEP estandarizados a partir de los cuales se trazaron los espectrogramas UV, registrando las absorbancias entre 240 y 420 nm por duplicado en un espectrofotómetro Shimadzu, UV-mini 1240 (Japón).

## **2.4. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se evaluaron a través del programa InfoStat (versión 2014, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se realizó análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó el test de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0,05$ ) para la comparación de medias.

## **3. Resultados y Discusión**

### **3.1. Determinación de la actividad antioxidante**

En la **Tabla 1** se muestran los valores obtenidos en los ensayos con los extractos de propóleos antes y después de liofilizar.

**Tabla 1.** Actividad antioxidante de extractos etanólicos de propóleos sin liofilizar (EEP) y liofilizado (EEPL). AG: ácido gálico, Q: quercetina, T: Trolox.

	Polifenoles totales (mg AG/g propóleos)	Flavonoides totales (mg Q/g propóleos)	EC <sub>50</sub> (mg propóleos/mgDPPH)	ABTS ( $\mu$ mol T/mg propóleos)
EEP	420,00 $\pm$ 14,14 <sup>a</sup>	45,07 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	42,96 <sup>a</sup>	1,56 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
EEPL	362,50 $\pm$ 10,61 <sup>b</sup>	42,06 $\pm$ 4,51 <sup>a</sup>	39,75 <sup>a</sup>	1,32 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>

Diferentes letras (a-b) indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05)

### Polifenoles totales por Folin-Ciocalteu

Los compuestos fenólicos son un grupo de sustancias capaces de captar radicales libres formando estructuras estables. De allí su importancia como compuestos antioxidantes presentes en los alimentos y que estarían contribuyendo a un mayor poder nutricional del ser humano. (Busch y col., 2017). Los resultados en la **Tabla 1** indican una disminución del contenido de polifenoles en la muestra liofilizada. Estas diferencias podrían explicarse teniendo en cuenta que algunos polifenoles podrían cambiar su estructura durante el proceso de liofilización, disminuyendo así su capacidad antioxidante. Busch y col. (2017) encontraron, en propóleos provenientes del Noreste de la provincia de Buenos Aires (Argentina), valores de fenoles totales de 866 mg AG/g de propóleos. Chaillou y col. (2009) estudiaron propóleos provenientes de Santiago del Estero (Argentina) y reportaron valores entre 42-253 mg AG/g de propóleos. Lozina y col.(2010) analizaron propóleos de diferentes regiones de Chaco, Corrientes, Santiago del Estero y Mendoza (Argentina), obteniendo valores entre 1,43-288,21 mg AG/g propóleos. Estos resultados indican una gran dispersión en los valores del contenido de polifenoles totales lo cual es un resultado esperado debido a que la composición del propóleos depende del origen botánico y geográfico.

### Flavonoides totales por el método del tricloruro de aluminio

Los flavonoides, junto a los ácidos fenólicos y sus ésteres, son actualmente considerados los principales componentes bioactivos del propóleos. Los resultados en la Tabla 1 indican que la liofilización no afectó el contenido de flavonoides de la muestra. Lozina y col. (2010) obtuvieron valores entre 0,12 y 30,39 mg quercetina/g propóleos. Bruschi y col. (2003), prepararon y caracterizaron micropartículas de gelatina

conteniendo propóleos provenientes de diversas regiones de Brasil, mediante secado “spray” (por aspersión) e informaron un contenido de flavonoides que varió entre 19,8-34,1 mg quercetina/g propóleos. Los resultados del presente trabajo se encuentran dentro del rango de valores obtenidos por los autores mencionados, no encontrándose diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) luego de someterlo al proceso de liofilización.

### **Eliminación de radicales libres por DPPH**

A partir de los datos experimentales se calculó la concentración de antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial del radical al 50% ( $EC_{50}$ ). Este parámetro ha sido empleado para comparar el poder antioxidante de distintas sustancias (Brand-Williams y col., 1995; Sánchez-Moreno y col., 1998 y Schlesier y col., 2002). Al comparar la actividad antirradical entre el EEP sin liofilizar y el liofilizado (**Tabla 1**) no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) en la  $EC_{50}$  de ambos extractos, lo que indicaría que el proceso de liofilización no afecta el poder antioxidante del extracto. Ciertos compuestos con actividad antioxidante podrían cambiar su estructura durante el proceso de liofilización, modificando así su capacidad antioxidante.

### **Capacidad inhibitoria del radical ABTS**

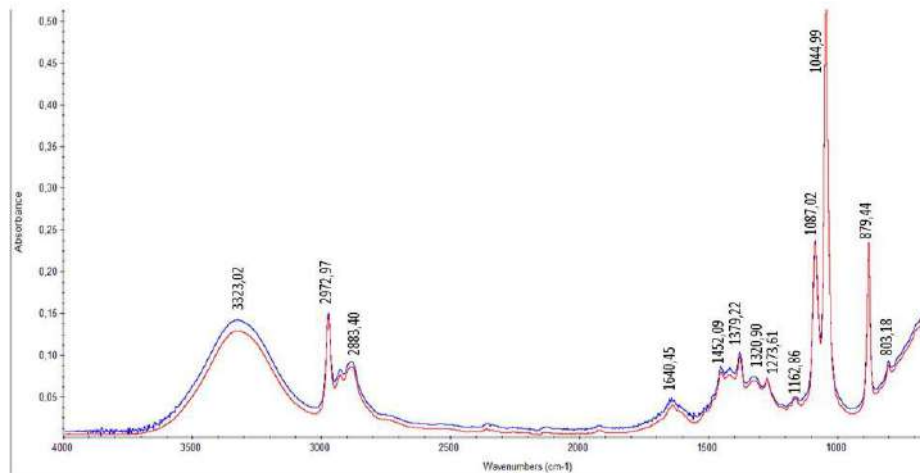
Los resultados de la **Tabla 1** muestran que no existen diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) en la capacidad inhibitoria del radical ABTS entre ambos extractos. Estos valores son similares a los encontrados por otros autores. Fangio y col. (2019) reportaron valores para los extractos de propóleos estudiados provenientes de la provincia de Buenos Aires (Argentina), que van desde 0,84 a 1,68  $\mu\text{mol Trolox/ mg propóleos}$ . Estos valores son similares a los reportados por Rodríguez y col. (2012) (0,74-1,92  $\mu\text{mol Trolox/mg propóleos}$ ).

## **3.2. Análisis espectroscópicos**

### **3.2.1. FTIR**

Se asume que los cambios espectrales de un propóleos analizado están directamente ligados a una modificación en su composición química. Debido a la variedad de especies de árboles de las que las abejas recolectan las resinas, cada región produce mezclas complejas de compuestos que a su vez producen espectros únicos, los cuales se consideran como “huellas digitales” individuales (Hacura, 2006; Yan-Weny col., 2008; Cai y col., 2012).

La **Fig. 1** muestra los espectros FTIR de las dos muestras de propóleos analizadas. Al comparar los espectros de ambos extractos, no se observaron diferencias en las señales de IR, por lo que se puede inferir que el proceso de liofilización no modificó la composición química de los extractos.



**Figura 1.** Espectros de FTIR de EEP sin liofilizar (—) y liofilizado (—).

En la **Tabla 2** se observa un resumen de las principales señales obtenidas experimentalmente y su comparación con datos de literatura. Como se aprecia, las principales señales se corresponden entre sí, tan solo con ligeros desplazamientos, lo cual es probable que se relacione con la presencia de diferentes tipos de fenoles y flavonoides en los extractos. Es importante mencionar que en los resultados experimentales no se encontró la señal de alargamiento de enlaces C=C de flavonoides y otros aromáticos alrededor de los 1500 cm<sup>-1</sup>. Si bien Fangio y col. (2019) reportaron esta señal al igual que Yan-Wen y col. (2008), Delgado Aceves y col. (2015) tampoco la reportaron. Probablemente, de la variedad de flavonoides y polifenoles de los extractos analizados ninguno sea activo en el IR para el alargamiento del enlace aromático.

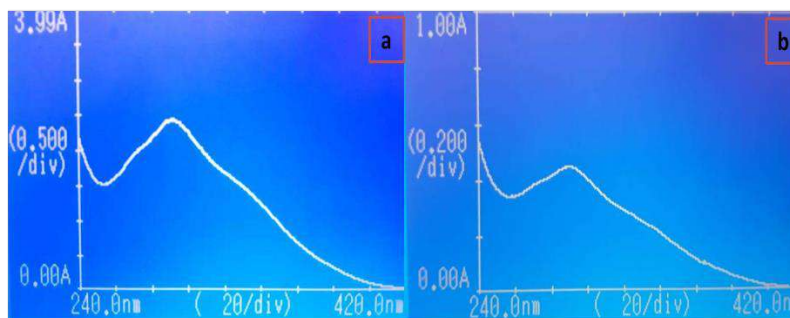
**Tabla 2.** Principales señales de FTIR para el EEP sin liofilizar y liofilizado y su comparación con los datos de la literatura (Yan-Wen y col., 2008).

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> ) (literatura)	Frecuencia (cm <sup>-1</sup> ) (experimental)	Tipo de señal	Tipo de enlace	Asignación
3335	3323	Alargamiento	O-H y N-H	Hidroxilos y aminas
2917	2973	Alargamiento asimétrico	C-H	Grupos CH <sub>2</sub> de saturación
2849	2883	Alargamiento simétrico	C-H	Hidrocarburos
1699	1640	Flexión asimétrica	C=O	Lípidos, flavonoides y aminoácidos
1661	1640	Alargamiento y flexión	C-O y C-OH	Lípidos y alcoholes terciarios
1513		Vibración	C=C	Flavonoides y anillos aromáticos
1450	1379	Vibración de flexión	C-H de grupos CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub> aromáticos	Flavonoides y anillos aromáticos
1359	1379	Flexión	C-H	grupo CH <sub>3</sub> de flavonoides
1269		Flexión	O-H y C-CO	Hidrocarburos
1088	1087	Alargamiento	C-C y C-OH	Flavonoides y grupos alcohólicos secundarios
1043	1045	Alargamiento y flexión	=C-O-C, C-C y C-OH	Grupos alcohólicos primarios
881	879	Estiramiento simétrico	C-C-O	Alcoholes primarios y secundarios

### 3.2.2. Espectroscopía UV-Vis.

Los polifenoles y flavonoides constituyentes del propóleo son los responsables de sus propiedades espectroscópicas en la región del UV-Vis. Los polifenoles presentan una banda intensa de absorción entre 280 y 330 nm (Catalin Mot y col., 2010) y los flavonoides generalmente muestran un primer máximo entre 240 y 285 nm y otra banda a 300 nm (Fabris y col., 2013). A fin de caracterizar espectrofotométricamente el EEP se realizaron los espectros de absorbancia en el UV de las muestras con y sin tratamiento de liofilización (**Fig. 2**). Se observa que el máximo de absorción se encuentra entre 280-310 nm para ambos extractos.





**Figura 2.** Espectros UV-Vis de EEP **a)** sin liofilizar y **b)** liofilizado

Isla y col. (2005) y Fangio y col. (2019) reportaron una banda intensa de absorción a 290 nm para EEP del norte argentino y de la provincia de Buenos Aires, respectivamente. Por otro lado, Liviu y col. (2013), distinguieron tres tipos de EEP sobre la base de su espectro UV-Vis: (i) aquellos con  $\lambda_{\text{máx}}$  320 nm, (ii) aquellos con una meseta entre 320 y 395 nm, y (iii) aquellos con  $\lambda_{\text{máx}}$  295 nm, siendo todos los EEP analizados en el presente estudio clasificados en esta última categoría.

#### 4. Conclusiones

Ambos extractos no mostraron diferencias en el contenido de flavonoides, pero sí en el contenido de polifenoles totales el cual resultó menor en la muestra liofilizada. En cuanto a la determinación de la actividad antioxidante los ensayos de ABTS y DPPH no mostraron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los extractos. Los perfiles espectroscópicos (UV-Vis y FT-IR) fueron similares para ambas muestras lo que indicaría, con estas técnicas, que no hubo cambios en la composición química de los extractos.

#### Referencias

- Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001; 15(7):561-571.
- Bracho J.C. Calidad de propóleos de origen argentino. I Propiedades organolépticas. *Vida Apícola* 2003. Ed 20.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., y Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie*, 28, 25-30.
- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *FoodChemToxicol* 1998;36(4):347-363.
- Bruschi, M. L., Cardoso, M. L. C., Lucchesi, M. B., & Gremi-ao, M. P. D. (2003). Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: Preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 264, 45e55.
- Busch, V. M., Pereyra-Gonzalez, A., Segatin, N., Santagapita, P. R., PoklarUlrih, N., Buera, M. P. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. *LWT-Food Sci Technol*, 2017, 75, 227-235

- Cai, R., S. Wang, Y. Meng, Q. Meng and W. Zhao. 2012. Rapid quantification of flavonoids in propolis and previous study for classification of propolis from different origins by using near infrared spectroscopy. *Analytical Methods* 4:2388-2395.
- Cătălin Moț A., Silaghi-Dumitrescu R., Costel S., (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 516–522.
- Chaillou, L., & Nazareno, M. (2009). Chemical variability in propolis from Santiagodel Estero, Argentina, related to the arboreal environment as the sources of resins. *Journal of Science Food Agriculture*, 89, 978-983.
- Da Silva, F. C., Favaro-Trindade, C. S., de Alencar, S. M., Thomazini, M. and Balieiro, J. C. C. 2011. Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis. *J. Api. Prod. Api. Med. Sci.* 3, 94–100
- Delgado-Aceves, M.; Andrade-Ortega, J.A.; Ramírez-Barragán, C.A. Physical-chemical description of propolis collected in La Primavera forest, Zapopan, Jalisco state. *Rev. Mex. Cienc. For.* 2015, 6, 74–87
- Fabris, S., Bertelle, M., Astafyeva, O., Gregoris, E., Zangrando, R., Gambaro, A., Stevanato, R. (2013). Antioxidant properties and chemical composition relationship of European and Brazilian propolis. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 46–51. doi:10.4236/pp.2013.41006
- Fangio M. F., Orallo D. E., Gende L. B., Churio M. S., 2019. Chemical characterization and antimicrobial activity against *Paenibacillus* larvae of propolis from Buenos Aires province, Argentina, *Journal of Apicultural Research*, DOI:10.1080/00218839.2019.1601318
- Hacura, A. and B. Zimmicka. 2006. An Investigation of Molecular Structure and Dynamics of Crude Beeswax by Vibrational Spectroscopy. *Polish Journal of Environmental Studies* 15 (4A):112-114.
- Krell R. Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin* N°. 124. Rome 1996.
- Ledón, N. (Abril de 1996). Efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico del propoleo rojo colectado en Cuba. *Cubana Farm*, 30. La Habana. Recuperado el 24 de Mayo de 2014, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003475151996000100008&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475151996000100008&lng=es&nrm=iso)
- Liviu, A. M., Dezmiorean, D. S., & Bobis, O. (2013). Important developments in Romanian propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, ID 159392, 1–9. doi:10.1155/2013/159392
- Lozina L. A., Peichoto M. E., Acosta O. C., Granero G. E., 2010. Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)* Lat. Am. J. Pharm. 29 (1): 102-10.
- Norma IRAM 15935-2. Disponible en URL [www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1197&io=7859](http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1197&io=7859)
- ReR., Pellegrini N., Proteggente A, Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26(9-10): 1231-1237
- Rodríguez, Y., Sánchez-Catalán, F., Rojano, B., Durango, D., Gil, J., & Marín-Loaiza, J. (2012). Physicochemical characterization and evaluation of antioxidant activity of propolis Collected in the Atlantic Department, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15, 303–311.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270–276.
- Schlesier K., Harwat M., Böhm V. y Bitsch R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36, 2, 177-187.
- Sudina, G.F., Mirzoeva, O. K., Pushkareva, M. A., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V. and Varfolomeev, S.D. 1993. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* 329, 21–24
- Thomson, W. 1990. Propolis. *Med. J. Aust.* 153, article 654, 11–12
- Yan-Wen, W., S. Su-Qin, J. Zhao, Y. Li and Q. Zhou. 2008. Rapid discrimination of extracts of Chinese propolis and poplar buds by FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 883-884:48-54.