

**Actividad antioxidante de extractos etanólicos, aceites esenciales de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. y propóleos de *Melipona beecheii* Bennett**

Antioxidant activity of ethanolic extracts and essential oils from *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. and propolis from *Melipona beecheii* Bennett

Leydi Fonte Carballo<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2167-4288>

Jacqueline Aparecida Takahashi<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8831-1609>

Maykelis Díaz Solares<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8149-2948>

Denise Sande Santos<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4289-3279>

Norma Patricia Durán Osorio<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2711-6842>

Aura María Blandón Osorio<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1971-9675>

Inelvis Castro Cabrera<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6914-9175>

Yudit Lugo Morales<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0193-1440>

Nancy Altunaga Pérez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6888-9246>

<sup>1</sup>Universidad de Matanzas, Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. Matanzas, Cuba

<sup>2</sup>Universidad Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, Instituto de Ciencia Exactas. Belo Horizonte, Brazil

\* Autor para la correspondencia: [leydi.fonte@ihatuey.cu](mailto:leydi.fonte@ihatuey.cu)

## RESUMEN

**Introducción:** la *Gliricidia sepium* es un árbol forrajero, multipropósito y melífero, de interés para la medicina natural. Además, la elaboración de propóleos a partir de exudados de diversas plantas constituye una fuente de compuestos bioactivos.

**Objetivo:** evaluar la actividad antioxidante de extractos etanólicos y aceites esenciales obtenidos de *Gliricidia sepium* y propóleos de *Melipona beecheii*.

**Métodos:** se prepararon extractos etanólicos de flores y corteza de *G. sepium* en el momento de su floración y aceites esenciales a partir de propóleos y flores de la planta. Se

determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante total y el poder reductor férrico de cada uno de los extractos y aceites. Los datos fueron analizados mediante un Análisis de Varianza simple. Se empleó el paquete estadístico Infostat versión Libre. Para la comparación de las medias se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan, para un nivel de significación de  $P < 0,05$ .

**Resultados:** el aceite esencial de propóleos fue el más activo en cuanto al ensayo de capacidad antioxidante total. La cantidad total de fenoles detectados en las muestras osciló entre los rangos comprendidos de 37,9 a 116,3 mg de ácido gálico/g de material seco. Por otra parte, los valores de flavonoides se mantuvieron entre los 7,51  $\mu\text{g/g}$  y 13,18  $\mu\text{g/g}$ . El mayor porcentaje de reducción de los iones férricos (95,2 %) lo alcanzó el aceite esencial de propóleos, mientras que el de flores de *G. sepium* obtuvo un 82,2 %.

**Conclusiones:** en los cuatro ensayos biológicos realizados se evidencia que los propóleos, en sus dos presentaciones, tanto en extracto etanólico como en aceite esencial, mostraron los mejores resultados. Por lo cual podría convertirse en un buen candidato a ser utilizado en las ramas de la industria y la medicina en Cuba.

**Palabras clave:** *Gliricidia sepium*; propóleos; aceites esenciales; antioxidante; fenoles; flavonoides.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Gliricidia sepium* is a multi-purpose melliferous forage tree of interest to natural medicine. Production of propolis from exudates of various plants is a source of bioactive compounds.

**Objective:** Evaluate the antioxidant activity of ethanolic extracts and essential oils obtained from *Gliricidia sepium* and propolis from *Melipona beecheii*.

**Methods:** Ethanolic extracts were obtained from *G. sepium* flowers and bark during the flowering season and from propolis and flowers from the plant. Determination was made of total flavonoids and phenols, total antioxidant capacity and ferric reducing power of each of the extracts and oils. Data were analyzed by simple analysis of variance. Use was made of Infostat statistics package, free version. Comparison of means was conducted by Duncan's multiple range test with a significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** The propolis essential oil was the most active in the total antioxidant capacity test. The total amount of phenols detected in the samples ranged between 37.9 and 116.3 mg of gallic acid / g of dry material, whereas the content of flavonoids ranged between

7.51 µg/g and 13.18 µg/g. Ferric ion reducing percentage was highest for the propolis oil (95.2%) and 82.2% for the *G. sepium* flower oil.

**Conclusions:** In the four biological assays conducted propolis obtained the best results, both as ethanolic extract and as essential oil. It could therefore become a good candidate for use in Cuban industry and medicine.

**Key words:** *Gliricidia sepium*, propolis, essential oils, antioxidant, phenols, flavonoids

Recibido: 25/01/2018

Aceptado: 11/02/2019

## Introducción

La *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. está catalogada como un árbol multipropósito por las utilidades que presenta de acuerdo con su fenotipo, su composición química y las condiciones edafoclimáticas bajo las cuales se desarrolla. Existen investigaciones que evalúan las propiedades medicinales, como el uso de extractos de diferentes partes de la planta con capacidad inhibitoria en el desarrollo microbiano.<sup>(1)</sup>

Por otro lado, el propóleo es un material resinoso y aromático que las abejas elaboran a partir de exudados de diversas plantas.<sup>(2)</sup> Basado en el uso práctico que ellas le dan a este producto se ha utilizado extensivamente por muchos años en la medicina tradicional. Los más importantes constituyentes parecen ser los compuestos fenólicos, que representan más del 50 % de su peso total y están relacionados con su actividad biológica, por lo que se les atribuye acción farmacológica.<sup>(3,4)</sup> Una de las propiedades más importantes del propóleos es su capacidad antioxidante, que está determinada por la presencia de compuestos antioxidantes como flavonoides.<sup>(5,6)</sup>

Los antioxidantes, por su estructura química, frenan la formación de radicales libres (RL), previenen o permiten tratar las enfermedades causadas por el estrés oxidativo al contrarrestar de una manera directa o indirecta los efectos nocivos que estos provocan, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando las funciones celulares.<sup>(7)</sup> Por lo que el consumo de antioxidantes contenidos en frutas, verduras y subproductos puede tener un efecto benéfico en la salud.<sup>(8,9)</sup> En la actualidad, existe un sinnúmero de alimentos naturales con poder antioxidante que aún no se han estudiado, sin

embargo, se realizan investigaciones encaminadas a determinar la capacidad antioxidante de estos.<sup>(10)</sup>

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antioxidante de extractos etanólicos, aceites esenciales obtenidos de *Gliricidia sepium* y propóleos de *Melipona beecheii*.

## Métodos

La investigación tuvo dos momentos referentes a: la recolección y posteriormente la determinación de las actividades biológicas presente en los aceites esenciales y extractos etanólicos.

En un primer momento se recolectó todo el material vegetal (flores y corteza) proveniente de los árboles de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. sembrados como setos vivos en la entrada principal de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, situada a los 22° 48' y 7'' de latitud Norte y 79° 32' y 2'' de longitud Oeste, a 19 msnm, en el municipio de Perico, provincia de Matanzas, Cuba.<sup>(11)</sup> Todas las muestras se colectaron en el mes de febrero del 2015. Los árboles se encuentran situados sobre un suelo que es de topografía llana, con pendiente de 0,5 a 1,0 %, y está clasificado como Ferralítico Rojo lixiviado, húmico nodular ferruginoso hidratado, de rápida desecación, arcilloso y profundo sobre calizas, con un pH ligeramente ácido de 6,2-6,4.<sup>(12)</sup> Mientras que la determinación de las actividades biológicas presente en los aceites esenciales y extractos etanólicos se realizó en el Departamento de Química del Instituto de Ciencias Exactas de la Universidad Federal de Minas Gerais en Brasil.

Las flores (300 g), al igual que la corteza, fueron recolectadas en las primeras horas de la mañana de forma manual a diferentes alturas de los árboles seleccionados. Se guardaron en bolsas de polietileno e inmediatamente se introdujeron en un cubo con hielo con el objetivo de evitar la degradación enzimática que ocurre normalmente en las muestras vegetales. El material fresco fue lavado con agua destilada y secado sobre papel de filtro para eliminar el exceso de líquido.

El propóleo (300 g) fue extraído en su estado natural de las colmenas de abejas sin aguijón ubicadas en la finca agroenergética Indio Hatuey.

### Preparación de los extractos etanólicos de corteza de *G. sepium* y propóleo de *M. beecheii*

Se pesaron 113,9 g de corteza de *G. sepium* y 84,9 g de propóleos, los cuales se fraccionaron en una relación de 30 g en 100 mL del solvente (etanol) para conseguir mejorar la extracción. Los extractos se dejaron a temperatura ambiente durante 5 días con agitación intermitente. Se sonicaron en baño ultrasónico MRC por 15 minutos y posteriormente se filtraron y sometieron a un proceso de partición, para lo que se colocó como solvente una mezcla de hexano y agua (30:50) para separar la fase orgánica (que tienen los compuestos activos) de la fracción acuosa. Luego se rotoevaporaron y se colocaron en la campana de extracción para eliminar el resto de solvente. Se conservaron a una temperatura de  $5 \pm 2$  °C hasta su uso.

### **Obtención de los aceites esenciales**

Para la obtención de los aceites esenciales de propóleos de *M. beecheii* fue necesario disminuir previamente el tamaño de la muestra que se encontraba en su estado natural, mediante su trituración en un mortero hasta obtener un polvo lo más fino posible con las características óptimas para comenzar el proceso de hidrodestilación, durante un periodo de 5 h, utilizando para ello para lo que se utilizó un equipo del tipo Clevenger.

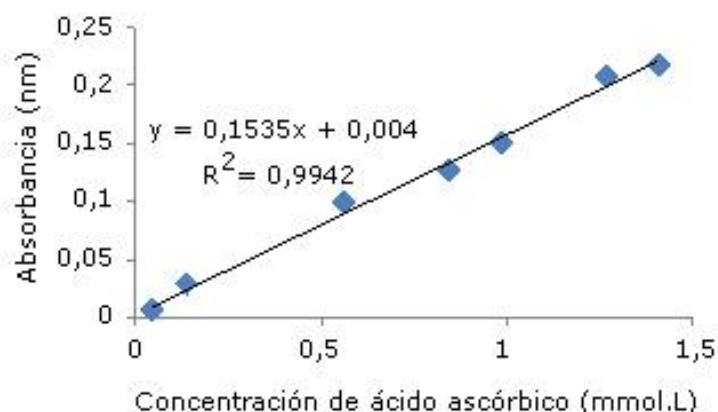
Cada emulsión acuosa resultante del proceso descrito anteriormente fue sometida a una extracción utilizando como solvente al diclorometano (DCM) y el resto de agua presente se secó con la adición de sulfato de sodio anhidro. Posteriormente, se procedió a evaporar el residuo del solvente a temperatura ambiente. El aceite esencial obtenido fue almacenado en un frasco de vidrio ámbar protegido de la luz a una temperatura de  $5 \pm 2$  °C, hasta su uso.<sup>(13)</sup>

Para la obtención del aceite esencial de flores de *G. sepium* se utilizó el material vegetal fresco. Las flores fueron cortadas en pequeños pedazos y colocadas en un recipiente que permitiera que el material vegetal estuviese en contacto con la corriente de vapor de agua caliente generada. Los compuestos volátiles que se encontraban en la muestra fueron arrastrados por el vapor de agua hasta el recipiente colector. Después, la emulsión acuosa fue sometida a extracción con cloroformo y el resto de agua secada con sulfato de sodio anhidro, evaporando el residuo del solvente a temperatura ambiente y se conservó el aceite en un frasco de vidrio ámbar protegido de la luz, a una temperatura de  $5 \pm 2$  °C hasta ser usado.<sup>(14)</sup>

### **Actividades antioxidantes**

### Actividad de captura del radical fosfomolibdato (Capacidad antioxidante total)

El ensayo se basó en la reducción de Mo (VI)-Mo (V) y consecuentemente, la formación de un complejo de color verde de fosfato/Mo(V) en pH ácido.<sup>(15)</sup> A las muestras (0,1 mL) se le adicionaron 3 mL de una solución reactiva (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sodio 28 mM e molibdato de amonio 4 mM). Los tubos fueron incubados a 95 °C por 90 min. La solución fue enfriada a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 695 nm contra una solución blanco. Se construyó la curva de calibración respectiva (Fig. 1), con las absorbancias obtenidas a partir de las diferentes concentraciones de Ácido Ascórbico y se halló la ecuación de la recta de calibrado. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y la actividad antioxidante se expresó como la absorbancia de la muestra.



**Fig. 1** - Curva de calibración de Ácido Ascórbico para la determinación de la actividad antioxidante total de los extractos etanólicos y aceites esenciales.

### Determinación del contenido de fenoles totales

La concentración de los compuestos fenólicos en las muestras fueron medidos por el método de Folin-Ciocalteu.<sup>(16)</sup> A las muestras (0,5 mL) en diferentes concentraciones (entre 100 y 1100 µg/mL) se les añadió 2,58 mL de reactivo de fenol Folin-Ciocalteu. Después de 3 minutos, se agregó una solución de carbonato de sodio saturado (0,3 mL). La solución resultante fue incubada a temperatura ambiente (25 °C) durante 20 minutos. La absorbancia se midió a 760 nm. Para la calibración analítica fueron utilizadas soluciones de ácido gálico con concentraciones entre 25 e 400 µg/mL. Los niveles de fenoles presentes en las muestras fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG), o sea, mg de EAG/g de extracto etanólico o aceite esencial.

### Determinación del contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó por el método de cloruro de aluminio.<sup>(17)</sup> Los extractos etanólicos y aceites esenciales (0,5 mL) se mezclaron con agua destilada (2,5 mL) y 150 µL de una solución de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>) al 5 %. La solución resultante se homogenizó mediante el uso del vórtex por un período de 10 segundos y luego estuvo en reposo a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 300 µL de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub> al 10 %), 1 mL de NaOH (1 mM) y 550 µL de agua destilada. La muestra se homogenizó y se mantuvo en reposo por 15 minutos. La absorbancia de cada muestra se leyó a 415 nm. Se prepararon soluciones patrones de quercetina para obtener la curva de calibración (Fig. 2), en un intervalo de concentraciones de 25 a 400 µg/mL. El contenido total de flavonoides fue calculado mediante la curva de calibración. Los resultados se expresaron en microgramos de equivalentes de quercetina (EQ) por gramo de extracto o aceite esencial.

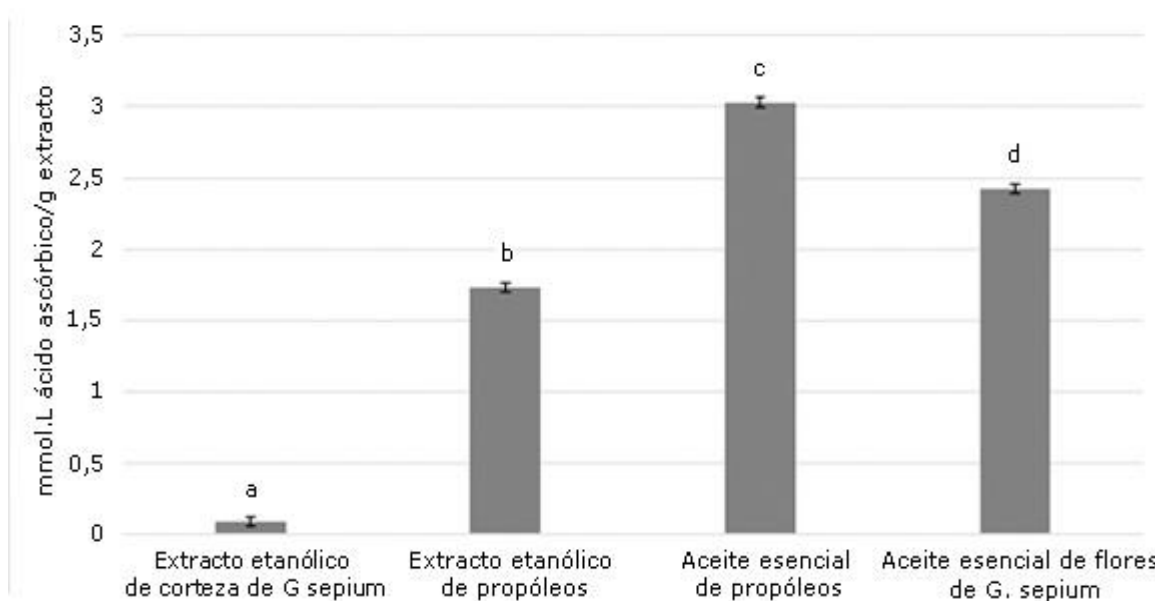


Fig. 2 - Curva de calibración de Quercetina para la determinación de flavonoides totales en los extractos etanólicos y aceites esenciales.

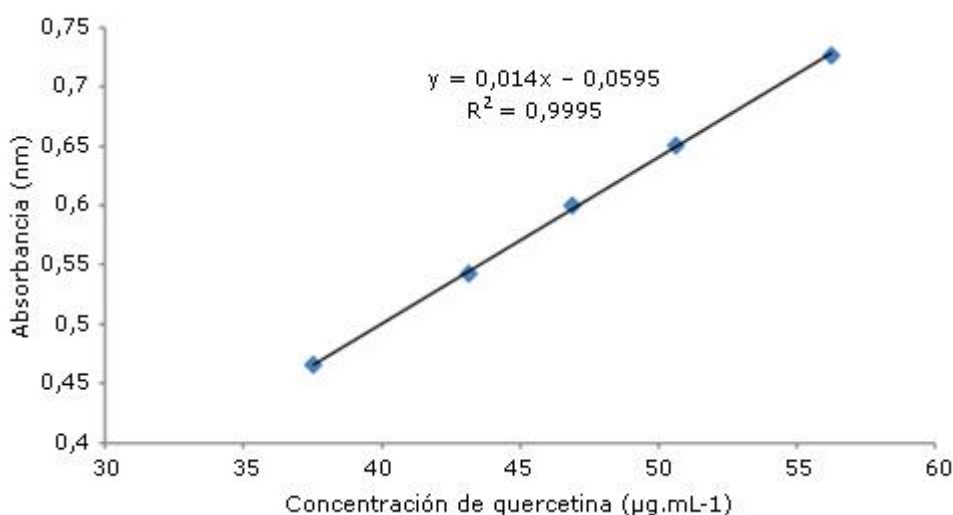
### Ensayo del poder reductor férrico

Se tomaron alícuotas (0,25 mL) de los extractos etanólicos y aceites esenciales obtenidos, en diferentes concentraciones (entre 12,5 e 100 µg/mL) fueron misturados con una solución de tampón fosfato (0,2 M, a pH 6,6) e 0,625 mL de ferrocianato de potasio 1 % (p/v). Después de homogeneizadas, las soluciones fueron incubadas en baño de María a 50

°C por 20 minutos. Entonces, se adicionaron 0,625 mL de ácido tricloroacético a 10 % (p/v) y las soluciones fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante (0,18 mL) se combinó con 1,8 mL de agua destilada y 0,36 mL de solución de cloruro férrico (0,1 %, p/v). La absorbancia fue medida a 700 nm. El ácido ascórbico fue usado como control positivo. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.<sup>(18)</sup>

## Resultados

Como se muestra en la figura 3, tanto los extractos etanólicos como los aceites esenciales mostraron una respuesta positiva ante el ensayo de actividad antioxidante total. El aceite de propóleos resultó el más activo a diferencia del extracto etanólico de corteza de *G.sepium* que presentó los parámetros más bajos.



**Fig. 3** - Actividad antioxidante total. Letras diferentes indican diferencia significativa para  $p \leq 0,05$ .

La cantidad total de fenoles detectados en las muestras osciló entre los rangos comprendidos de 37,9-116,3 mg de ácido gálico/g de material seco (Tabla 1). El propóleos de forma general en sus dos presentaciones, tanto en extracto etanólico como en aceite esencial, mostró un tenor de fenol elevado de 116,3 mg de GAE/g y 108,3 mg de GAE/g respectivamente.

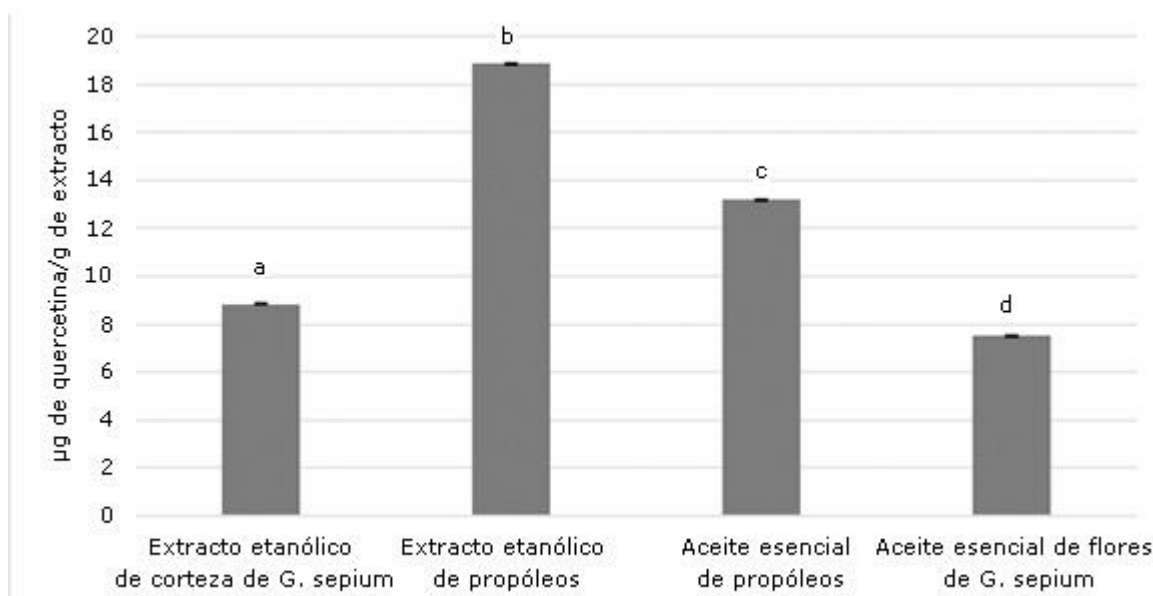
**Tabla 1** - Contenido de fenoles totales cuantificados en extractos etanólicos y aceites esenciales.

Extractos	Contenido de fenoles totales en (mg EAG)/g
Etanólico de corteza de <i>G.sepium</i>	37,9



Etanólico de propóleos de <i>M.beecheii</i>	116,3
<i>Aceites esenciales</i>	
Propóleos de <i>M.beecheii</i>	108,3
Flores de <i>G.sepium</i>	60,3

Como se puede observar en la figura 4, los valores de contenido de flavonoides presentes en el propóleos al igual que en ensayo anterior referido al contenido de fenoles totales, mostraron una tendencia similar tanto en el extracto etanólico (18,85 µg/g) como en el aceite esencial (13,18 µg/g), resultados superiores a los encontrados en el aceite de flores de *G. sepium* (7,51 µg/g) y en el extracto etanólico de corteza (8,83 µg/g).



**Fig. 4** - Gráfico que muestra la cuantificación de flavonoides totales. Letras diferentes indican diferencia significativa para  $p \leq 0,05$ .

En la tabla 2, se evidencia un comportamiento similar a los ensayos anteriores descritos para determinar la actividad antioxidante. El aceite esencial de propóleos alcanzó el mayor porcentaje de reducción de los iones férricos (95,2 %), seguido del extracto etanólico de la misma procedencia (82,6 %), mientras que el aceite esencial de flores *Gliricidia sepium* obtuvo valores muy próximos de un 82,2 %.

**Tabla 2** - Porcentaje de reducción de iones férricos de los extractos etanólicos y aceites esenciales.

	Absorbancia a 700 nm	Reducción de iones férricos (%)
<b>Patrón</b>		
Ácido Ascórbico	0,084	100

Extractos		
Etanólico de corteza de <i>G. sepium</i>	0,015	18,2
Etanólico de propóleos de <i>M. beecheyi</i>	0,069	82,6
Aceites esenciales		
Propóleos de <i>M. beecheyi</i>	0,080	95,3
Flores de <i>G. sepium</i>	0,069	82,2

## Discusión

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo.<sup>(19)</sup>

Se ha demostrado que muchos metabolitos secundarios de naturaleza fenólica muestran actividad antioxidante<sup>(20,21,22,23)</sup> y esta a su vez se relaciona con un sin número de enfermedades vinculadas a los procesos de oxidación que ocurren en las células.<sup>(24,25,26,27)</sup>

Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal debido a la reactividad del grupo fenol.<sup>(28)</sup>

Los compuestos fenólicos de las plantas incluyen a los: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos y lignanos.<sup>(29)</sup> La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de inhibir las oxidasas, lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos.<sup>(30)</sup>

De forma general, en los ensayos referentes al contenido de fenoles totales y al de la cuantificación de flavonoides totales se evidenció la misma tendencia de que el propóleos tanto en extracto etanólico como en aceite esencial obtuviera los mejores resultados. Este fenómeno se pudo explicar debido a que la mayoría de los compuestos bioactivos encontrados en el propóleos son compuestos fenólicos, aunque su concentración está sujeta a variaciones sustanciales en función del origen de las muestras y del mismo modo pueden también variar las propiedades biológicas que les son atribuidos. Diversos estudios han demostrado una correlación directa entre el contenido de fenoles y las actividades

biológicas presentes en los propóleos, como la actividad antioxidante y la antimicrobiana.<sup>(31,32,33)</sup>

El propóleos ejerce efectos antioxidantes en el colon, disminuyendo la concentración de hidroperóxidos lipídicos, debido a que algunos de sus componentes son absorbidos y pasan al torrente sanguíneo y actúan como antioxidantes hidrófilos al aumentar las concentraciones de vitamina C en los tejidos.<sup>(34)</sup> Además han sido evaluados en el campo de la terapia contra el cáncer.<sup>(24)</sup> En un estudio se determinó el efecto anticancerígeno mediado por diferentes enfoques y ensayos en células <sup>(35)</sup> y se apreció la inhabilitación de la proliferación de células cancerígenas, mediante la apoptosis, de manera dependiente de la concentración.<sup>(36,37,38,39)</sup>

El hecho de que los aceites esenciales hayan presentado valores en los cuatro ensayos realizados que denotan la presencia de actividad antioxidante, puede explicarse a través de la variedad de compuestos químicos presentes en ellos como los terpenos y terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y los oxigenados derivados), los cuales poseen un bajo peso molecular, son altamente lipofílicos y por eso tienen facilidad para atravesar las membranas celulares e inducir respuestas biológicas.<sup>(40)</sup>

Podemos apreciar de forma general que los cuatro ensayos realizados para determinar la posible actividad antioxidante presente en los extractos etanólicos y aceites esenciales evaluados, siguieron la misma tendencia donde el propóleos alcanzó los mejores resultados en sus dos presentaciones. Por lo cual, podría convertirse en un buen candidato a ser utilizado en las ramas de la industria y la medicina en Cuba.

## Referencias bibliográficas

1. Kolawole OM, Joseph AK, George OA. Antibacterial and Phytochemical Activity of *Gliricidia sepium* against Poultry Pathogens. 2018.
2. Wilson MB, Brinkman D, Spivak M, Gardner G, Cohen JD. Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. J. Invertebr. Pathol. 2015. 124:44-50.
3. Orantes Bermejo FJ. Los Propóleos en Andalucía. Grupo de Cooperación Columela-Asociación Provincial de Apicultores de Granada. Proyecto C/99/006, 2006.
4. Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 2000.31(1), 3-15.

5. Cumbao JLT, Alvarez PLJ, Belina-Aldemita MD, Micor JRL, Angelia MRN, Manila-Fajardo AC. Total phenolics, total flavonoids, antioxidant activity and antibacterial property of propolis produced by the stingless bee, *Tetragonula biroi* (Friese), from Laguna and Quezon, Philippines. *Philippine Entomologist*. 2016.
6. Ferreira JM, Fernandes-Silva CC, Salatino A, Negri G, Message D. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017. 97(11), 3552-8.
7. López A, *et al.* Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista ANACEM*, 2012. 6(1):49-51.
8. Kutaiba Ibrahim A, Mohamed Abdalkarim M. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Antioxidant activity. *Journal of Pharmacy Research*, 2012, 5(8), 4013-20.
9. Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bohn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., & Blomhoff, R. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. 2010, *Nutrition Journal*, 9, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>
10. Reyes A, Galicia M, Carrillo M. Antioxidantes: La magia de lo natural. *Rev Tlatemoani*. 2011;(8): 1-16.
11. Academia de Ciencias de Cuba. Nuevo Atlas Nacional de Cuba. Instituto Cubano de Geodesia y Cartografía. La Habana, Cuba. 1989, p. 41
12. Hernández JA, Pérez JJM, Bosch ID, Castro SN. Clasificación de los suelos de Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) e Instituto de Suelos, Ministerio de Agricultura (MINAG). La Habana, Cuba, 2015. p 46-7.
13. Monsálvez MN, Zapata M, Vargas M, Berti M, Bittner V Hernández. Antifungal effects of n-hexane extract and essential oil of *Drimys winteri* bark against take-all disease. *Ind. Crop. Prod.* 2010, 31(2): 239-44.
14. Martínez, A. "Aceites esenciales". Universidad de Antioquia. Medellín. 2003, 1-34.
15. Umamaheswari M, Chatterjee TK: In vitro antioxidant activities of the fractions of *Cocciniagrandis* L. leaf extract. *Afr J Trad Compl Altern Med* 2008, 5:61-73.
16. Arabshahi-Delouee S y Urroj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*. 2007, 102: 1233-40.
17. Liu X, Zhu L, Tan J, Zhou X, Xiao L, Yang X *et al.* Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Complementary and Alternative Medicine*. 2014. 14:12.

18. Oyaizu M: Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese J. Nutr 1986, 44:307-15.
19. Paladino S. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.)-126 -Facultad de Ciencias Agrarias., Universidad Nacional de Cuyo., Mendoza -Argentina, TESIS, 2011. pp. 12-5.
20. Talla E, Tamfu AN, Gade IS, Yanda L, Mbafor JT, Laurent S *et al.* New Mono-Ether of Glycerol and Triterpenes with DPPH Radical Scavenging Activity from Cameroonian Propolis. *Nat. Prod. Res.* 2016, 6419 (November), 1-11.
21. Hernández M, Abraham M, Cerón A, Gutiérrez A, Gutiérrez D, Ávila F. Contenido de flavonoides, fenoles y actividad antioxidante de propóleos colectados en Guanajuato, México. 2017, 2,607-12.
22. Olczyk P, Komosinska K, Ramos P, Mencner L, Olczyk K, Pilawa B. Free Radical Scavenging Activity of Drops and Spray Containing Propolis-An EPR Examination Pawel. *Molecules* 2017, 22, 3-6.
23. Zhang C, Shen X, Chen J, Jiang X, Hu F. Identification of Free Radical Scavengers from Brazilian Green Propolis Using Off-Line HPLC-DPPH Assay and LC-MS. *Food Technol.* 2017, 14-9.
24. Kustiawan P, Lirdprapamongkol K, Palaga T, Puthong S, Phuwapraisirian P, Svasti J *et al.* Molecular Mechanism of Cardol, Isolated from *Trigona incisa* Stingless Bee Propolis, Induced Apoptosis in the SW620 Human Colorectal Cancer Cell Line. *BMC Pharmacol.Toxicol.*2017, 4-13.
25. Mise S, Köprücü K, Enis M, Silici S. Effects of Dietary Propolis on the Number and Size of Pleopadal Egg, Oxidative Stress and Antioxidant Status of Freshwater Cray Fish (*Astacus Leptodactylus* Eschscholtz). Elsevier 2017, No. June, 4-5.
26. Mujica V, Orrego R, Pérez J, Romero P, Ovalle P, Zúñiga J *et al.* The Role of Propolis in Oxidative Stress and Lipid Metabolism: A Randomized Controlled Trial. Evidence-based Complement. *Altern. Med.* 2017, 5-6.
27. Salmas R, Durdagi S, Fuat M, Duruyurek M, Abdullah H, Selamoglu Z. The Effects of Pollen, Propolis, and Caffeic Acid Phenethyl Ester on Tyrosine Hydroxylase Activity and Total RNA Levels in Hypertensive Rats Caused by Nitric Oxide Synthase Inhibition: Experimental, Docking and Molecular Dynamic Studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2017, 1102 (January), 0-1.
28. Pedreño Y. Los antioxidantes polifenólicos, un complemento alimenticio saludable, *Revista Eubacteria.* No. 28, Murcia -España, 2012. pp. 1-4.

29. Ignaz I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 2011, 126: 1821-35.
30. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM.* 2009; 52(2): 73-5.
31. Da Silva Frozza C, Garcia C, Gambato G, De Souza M, Salvador M, Moura S *et al.* A Chemical Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Brazilian Red Propolis. *Food Chem.Toxicol.*2013, 52, 13-42.
32. De Mendonça I, De Moraes Porto I, Do Nascimento TG, De Souza NS, Dos Santos Oliveira JM, Dos Santos Arruda RE *et al.* Brazilian Red Propolis: Phytochemical Screening, Antioxidant Activity and Effect against Cancer Cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 2015, 1-12.
33. Betances E, Revilla I, Vivar A, González M. Flavonoid and Antioxidant Capacity of Propolis Prediction Using Near Infrared Spectroscopy. *Sensors* 2017, 17, 2-13.
34. Sun F, Hayami S, Haruna S, Ogiri Y, Tanaka K, Yamada Y. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxidases in rats. *J Agric Food Chem* 2000; 48(5):1462-5.
35. Frión Y, Díaz A, Ruiz J, Rodríguez H, Maurício J. Brazilian Green Propolis Induced Apoptosis in Human Lung Cancer A549 Cells through Mitochondrial-Mediated Pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2015. 67(10):1448-56.
36. Alizal deh A, Afrouzan H, Dinparast N, Sawaya A, Azizian S, Hemmati H *et al.* Chemoprotection of MNNG-Initiated Gastric Cancer in Rats Using Iranian Propolis. 2015.
37. Elnakady Y, Rushdi A, Franke R, Abutaha N, Ebaid H, Baabbad M *et al.* Characteristics, Chemical Compositions and Biological Activities of Propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia. *Sci. Rep.* 2017, No. October 2016, 1-13.
38. Wang C, Wang YX, Yu NQ, Hu D, Wang XY, Chen XG *et al.* Brazilian Green Propolis Extract Synergizes with Protoporphyrin IX-Mediated Photodynamic Therapy via Enhancement of Intracellular Accumulation of Protoporphyrin IX and Attenuation of NF- $\kappa$ B and COX-2. *Molecules* 2017, 1-13.
39. Zabaïou N, Fouache A, Trousson A, Baron S, Zellagui A, Lahouel M *et al.* Biological Properties of Propolis Extracts : Something New from an Ancient Product. *Chem. Phys. Lipids* .2017, 1-9.
40. Chao SC, Young DG. Screening for inhibitory activity of essential oils ou selected bacteria, fungi and viruses. *Journal Essentials Oil Research.* 2000. 12(4):630-49

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### Contribución de los autores

*Leydi Fonte Carballo*: Redacción del artículo.

*Jacqueline Aparecida Takahashi*: Diseño de la investigación.

*Maykelis Díaz Solares*: Selección de los protocolos a trabajar en la investigación.

*Denise Sande Santos*: Recopilación de la información.

*Norma Patricia Duran Osorio*: Recopilación de la información.

*Aura María Blandón Osorio*: Estandarización de los protocolos utilizados.

*Inelvis Castro Cabrera*: Análisis de los datos.

*Yudit Lugo Morales*: Análisis de los datos.

*Nancy Altunaga Pérez*: Apoyo en las técnicas realizadas en el laboratorio para la investigación.

### Financiamiento

El presente trabajo fue financiado por la beca de doctorado sandwich de CNPq-TWAS de Brasil del proyecto 158/12 otorgada a Leydi Fonte Carballo y el apoyo institucional de la EEPF Indio Hatuey de la Universidad de Matanzas, Cuba.