



*INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO
KOURÍ*

*Título: Caracterización de extractos alcohólicos de propóleos
cubanos como antiviral contra el virus dengue 2*

Tesis en opción al título de Master en Virología

Lic. Nankyu Vega Sánchez

La Habana

2023



*INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO
KOURÍ*

*Título: Caracterización de extractos alcohólicos de
propóleos cubanos como antivirales contra el virus dengue 2*

Tesis en opción al título de Master en Virología

Autor: Lic. Nankyu Vega Sánchez

Tutoras: Prof. Mayling Álvarez Vera, DrC

Prof. Rosa Ramírez Bartutis, DrC

Prof. Gloria del Barrio Alonso, DrC

Asesores: Prof. Alen Nils Baeza Fonte, DrC

*A mí cielito lindo, por darme la vida
entregarme su amor, velar mis sueños y
moldear mi corazón*

*La felicidad no está en soñar, sino en
hacer realidad los sueños.*

RESUMEN

El virus dengue constituye el arbovirus de mayor propagación a nivel mundial y continúa siendo, para Cuba, un problema de salud sin tratamiento eficaz. En este sentido muchas de las investigaciones se encaminan a la obtención de antivirales de origen natural. En el presente estudio se propone caracterizar extractos alcohólicos de propóleos cubanos como antivirales contra el virus dengue-2. Para ello se realizó una caracterización química de cuatro extractos de propóleos cubanos (P1, P3, P4, y P6) mediante métodos cromatográficos y la cuantificación de fenoles y flavonoides totales. Además, se determinó la capacidad antioxidante de los mismos mediante el método del índice de oxidación y el de vitamina C. La citotoxicidad de estos productos se evaluó empleando el ensayo colorimétrico de reducción del MTT en células C6/36 HT. La pesquisa primaria de actividad antiviral de dos extractos se llevó a cabo mediante el ensayo de reducción de la productividad vírica. Se determinó que los extractos pertenecen según sus características químicas a propóleos cubanos Tipo I (P6), Tipo II (P1 y P3) y Tipo III (P4). Asimismo, el contenido de fenoles resultó ser directamente proporcional al de flavonoides, siendo P3 el de mayor concentración para ambos metabolitos. Se identificó, además la presencia de kaempferol, quercetina, luteolina, apigenina y nemorosona. La actividad antioxidante resultó independiente de la concentración de fenoles. Los extractos evaluados mostraron actividad antiviral a pesar de la diferencia en su composición, lo cual avala la potencialidad de estos extractos como antivirales contra el virus dengue 2.

ABSTRACT

Dengue virus is the arbovirus with the greatest spread worldwide and continues to be, a health problem without effective treatment. In this sense, most of researches aims to obtaining antivirals from natural sources. In the present study, it proposed to characterizing alcoholic extracts of Cuban propolis as antivirals against dengue 2 virus. A chemical characterization of four extracts of Cuban propolis (P1, P3, P4, and P6) was carried out by using chromatography methods and the quantification of total phenols and flavonoids. In addition, the antioxidant capacity was determined by the oxidation index and vitamin C methods. The cytotoxicity of these products was evaluated by using the MTT reduction colorimetric assay in C6/36 HT cells. The primary investigation of antiviral activity of two extracts was carried out by means of the reduction of viral productivity assay. The extracts were classified as Type I (P6), Type II (P1 and P3) and Type III (P4) Cuban propolis. Likewise, the amount of phenols was directly proportional to flavonoids amount, and P3 had the highest concentration for both metabolites. The presence of kaempferol, quercetin, luteolin, apigenin and nemorosone was also identified. The antioxidant activity was independent of the concentration of phenols. The extracts evaluated showed antiviral activity despite the difference in their composition, which supports the potential of these extracts as antivirals against the dengue 2 virus.

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ag	ácido gálico
AlCl ₃	Tricloruro de Aluminio
AP	Apigenina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATCC	Colección americana de cultivos tipo -en inglés- <i>american type culture collection</i>
b	pendiente de la curva de calibración
BHK-21	línea celular BHK-21
C	Cápside
C6/36HT	línea celular C6/36 HT
Cat	Catequina
CC50	concentración citotóxica media
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
Cl ₅₀	concentración inhibitoria media
CIAPI	Centro de Investigaciones Apícolas
CLAR	cromatografía líquida de alta resolución
CO ₂	dióxido de carbono
DH	Dengue Hemorrágico
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Envoltura
ECP	efecto citopático
EUA	Estados Unidos de América
FD	fiebre del dengue
FHD	fiebre hemorrágica del dengue
Flv	contenido de flavonoides totales
Ft	fenoles totales
HDLc	Colesterol Ligado a Lipoproteínas de Alta Densidad -en inglés- <i>high density Lipoprotein cholesterol</i>
HepG2	línea celular HepG2
I	intercepto de la curva de calibración
IL	Interleuquina
INFs	Interferones
IO	índice de oxidación
IPK	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”
K	Kaempferol

kDa	kilodaltons
L	Luteolina
LDLc	Lipoproteínas de Baja Densidad –en inglés- <i>low density Lipoprotein</i>
M	proteína de la membrana
MEM	Medio Mínimo Esencial
MR	Miricetina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
N	Nemorosona
NO	óxido nítrico
NS	no estructural -en inglés- <i>Non Structural</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	marco abierto de lectura -en inglés- <i>Open Reading Frame</i>
P	Pinobanksina
pb	pares de bases
Pp	promedio del número de placas obtenido para las réplicas
prM	proteína precursora de la membrana
Q	Quercetina
RE	retículo endoplasmático
Rf	Relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa
Rfr	Rf relativo
SE	Sustancias extraíbles en n-hexano
SFBI	suero fetal bovino inactivado
SSTF	solución salina tamponada con fosfato
TLR	receptores celulares tipo toll - en inglés- <i>Toll like receptors</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa -en inglés- <i>tumor necrosis factor alpha</i>
ufp	unidades formadoras de placas
URT	Regiones no codificantes –en inglés- <i>untranslated regions</i>
UV	Ultravioleta
VCext	contenido de vitamina C en los extractos alcohólicos
VDEN	virus del dengue
VDVB	virus de la diarrea viral bovina
VHS	virus del herpes simple
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	virus de papiloma humano
VZV	virus varicela zóster

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	- 1 -
OBJETIVOS	- 3 -
Objetivo General	- 3 -
Objetivos específicos	- 3 -
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	- 4 -
I.1 Dengue características generales	- 4 -
I.1.2 Estructura del virión	- 4 -
I.1.3 Estructura del genoma	- 5 -
I.1.4 Replicación Viral	- 5 -
I.1.5 Transmisión de VDEN en la naturaleza	- 6 -
I.1.6 Situación epidemiológica	- 6 -
I.1.6.1 Situación epidemiológica en Cuba	- 7 -
I.1.7 Antivirales naturales contra VDEN	- 8 -
I.1.7.1 Polisacáridos	- 8 -
I.1.7.2 Alcaloides y compuestos relacionados	- 9 -
I.1.7.3 Compuestos fenólicos	- 9 -
I.2. Características generales del propóleos	- 10 -
I.3. Composición del propóleos	- 11 -
I.4. Propiedades biológicas del propóleos	- 13 -
I.4.1 Actividad antiviral del propóleos	- 17 -
I.5 Capacidad inmunomoduladora del Propóleos	- 18 -
I.6. Otros usos del Propóleos	- 19 -
II. MATERIALES Y MÉTODOS	- 20 -
II. 1 Virus	- 20 -
II. 2 Líneas Celulares	- 20 -
II.2.1 BHK-21	- 20 -
II.2.2 C6/36-HT	- 20 -
II. 3 Propóleos	- 20 -
II.4. Recolección de las materias primas de propóleos	- 21 -
II.4.1 Sistema de mallas o trampas	- 21 -

II.4.1 Método de raspado	- 21 -
II.5 Preparación de los extractos de propóleos	- 22 -
II.5.1 Extracto alcohólico	- 22 -
II.5.2 Extracto seco.....	- 23 -
II.6 Caracterización sensorial de los extractos alcohólicos de propóleos	- 23 -
II.7 Caracterización química del propóleos	- 24 -
II. 7.1 Análisis cromatográfico	- 24 -
II. 7.2 Determinación del porcentaje de Sustancias extraíbles en n-hexano (ceras)	- 25 -
II. 7.3 Determinación de compuestos fenólicos totales (expresados como gramos equivalentes de ácido gálico por mililitros de extracto)	- 25 -
II. 7.4 Determinación de flavonoides totales (expresado como su equivalente en quercetina)	- 26 -
II. 7.5 Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos	- 27 -
II.8 Ensayo de citotoxicidad	- 28 -
II.8.1 Procesamiento de los datos.....	- 28 -
II.9 Obtención del lote de trabajo de virus.....	- 29 -
II.10 Determinación del título viral en las células BHK-21.....	- 29 -
II.11 Ensayo de pesquisa primaria de actividad antiviral	- 30 -
II.11.1 Procesamiento de los datos.....	- 31 -
II.12 Procesamiento estadístico	- 31 -
III. Resultados y Discusión.....	- 32 -
III.1 Caracterización organolépticas de los extractos	- 32 -
III.2 Caracterización química del propóleos.....	- 35 -
III.3 Capacidad antioxidante de los extractos.....	- 44 -
III.4 Actividad biológica de los extractos de propóleos.....	- 46 -
III.4.1 Ensayo de citotoxicidad.....	- 46 -
III.4.2 Ensayo de pesquisa primaria de actividad antiviral	- 48 -
RECOMENDACIONES	- 53 -
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 54 -
ANEXO.....	- 71 -

INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto apícola, que se deriva de una mezcla entre las resinas de algunos árboles y enzimas secretadas por las glándulas de las abejas. Este bálsamo es empleado por el insecto para el sellado de las paredes externas e internas de la colmena y para la protección de la colmena frente a agentes infecciosos y otros insectos (1, 2). El estudio de esta sustancia ha alcanzado un auge en la última década, y está enfocado fundamentalmente a sus propiedades biológicas, lo que permite su empleo para mejorar la salud animal, humana y de las plantas, y en industrias como la cosmética y la alimentaria (2-4). Este potencial biológico está estrechamente relacionado con su composición química, y puede diversificarse sobre la base de uno o varios componentes (5).

Se conoce que este producto, presenta actividad anticancerígena (6); antialérgica, antitrombótica, antineoplásica (7, 8), antiinflamatoria (9), antimicrobiana, antioxidante, antiviral, inmunomoduladora (10-12), hepatoprotectora y regenerativa (13, 14).

La actividad antiviral del propóleo se estudia desde la década de los años 80 (12, 15, 16); estas investigaciones señalan que el bálsamo tiene efecto sobre los virus con diferentes características estructurales y genómicas, distinto tropismo y diversos hospederos. Dicha capacidad se debe al sinergismo existente entre sus componentes químicos (17-19), que a pesar de su variación en dependencia del origen geográfico y botánico, está representada fundamentalmente por compuestos fenólicos (apigenina, el kaempferol, la naringerina, pectolinarigenina, quercetina), ácidos (ácido cafeico, el ácido ferúlico) y terpenoides, (5, 13, 20) capaces de inhibir a agentes infecciosos como el virus Dengue (VDEN) (21-24). Se conoce, además, que la acción antiviral de este producto apícola está dada por diferentes mecanismos (14, 25, 26) como el bloqueo parcial de la entrada del virus a la célula, la degradación del ARN viral e inhibición del ciclo de replicación del virus dentro de la célula.

Dentro de los virus sensibles al propóleo se encuentran, el poliovirus Tipo 1 (27), los géneros herpesvirus (28-31) y retrovirus (32, 33), y la mayoría de los virus respiratorios que infectan tanto humanos como a otros animales (16, 34, 35, 36). Además, se ha demostrado la susceptibilidad, ante este producto, de virus que pertenecen a la familia *Flaviviridae* tales como el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) (36, 37). Asimismo, Soroy y col. (2014), demostraron que en pacientes que presentaban Dengue Hemorrágico (DH), el extracto acuoso de propóleo (Propoelix™) aceleró la mejora en los recuentos de plaquetas y los niveles de TNF- α y acortó la duración de la hospitalización (38).

Un estudio en Cuba, que evalúa la actividad antiviral de un extracto acuoso de propóleo cubano de color rojo, frente a los virus VHS-1, Influenza A y B, y Dengue-2. Esta investigación demuestra la actividad virucida del propóleo frente a

estos virus y su dependencia de la concentración y del tiempo de contacto (39). Sin embargo, la extracción acuosa de los propóleos permite extraer entre el dos y el cuatro por ciento de sus componentes, mientras que con la extracción alcohólica se obtienen la mayoría de los metabolitos biológicamente activos de este producto (40).

Teniendo en cuenta la asociación de la infección por VDEN 2 con el desarrollo de la forma grave de la enfermedad, la ausencia de un tratamiento contra la enfermedad, así como el amplio espectro antiviral del propóleos a través de la presencia en su composición de sustancias capaces de inactivar este virus; el presente estudio propone evaluar la capacidad antiviral de los extractos alcohólicos de propóleos cubano frente al VDEN 2.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar extractos alcohólicos de propóleos cubanos como antivirales contra el virus dengue-2.

Objetivos específicos

1. Determinar la composición química de los extractos alcohólicos de propóleos cubanos con diferentes orígenes geográficos.
2. Determinar la capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos de propóleos cubanos con diferentes orígenes geográficos.
3. Determinar la toxicidad de los extractos alcohólicos propóleos cubanos en la línea celular C6/36-HT.
4. Determinar la actividad antiviral de los extractos alcohólicos de propóleos frente al virus Dengue 2 en la línea celular C6/36-HT.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 Dengue características generales

El virus del dengue pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Es un complejo de cuatro serotipos (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4) (41), que comparten el 70 % de similitud en secuencia aminoacídica y aproximadamente el 50 % con otros *Flavivirus*. Es estable a temperaturas de -70 °C y en estado de liofilización a 5 °C. Se inactiva bajo la acción de la luz Ultravioleta (UV) y es inestable al ser sometido al calor (42).

I.1.2 Estructura del virión

El VDEN es un virus envuelto y con cápside (C) de simetría icosaédrica. El tamaño del virión oscila entre los 40 y 50 nm de diámetro y presenta pequeñas proyecciones superficiales de 5 a 10 nm (43).

La envoltura es una bicapa lipídica de 10 nm de grosor asociada a una proteína de membrana (M) de origen célula hospedera y otra de envoltura (E), las cuales cumplen importantes funciones en la maduración y la entrada del virus a la célula, respectivamente (44).

La glicoproteína E tiene un peso molecular de 53 kDa, es la proteína estructural más conservada de los *Flavivirus*, y está estructurada en tres dominios (45). Además, media la unión y fusión a la membrana, catalizada por un ambiente ácido, durante la entrada del virus a la célula. Así mismo es el mayor determinante antigénico del virión; induce la producción de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación (46).

La proteína M es un pequeño fragmento de 8 kDa obtenido por proteólisis de la proteína precursora de membrana (prM). Este proceso implica un incremento en la infectividad y la reorganización de la estructura de la superficie viral (47). La función más importante de prM es proteger a la proteína E durante su paso por toda la vía secretora (43).

La proteína C es de bajo peso molecular (11 kDa) y su secuencia aminoacídica, altamente básica, permite su interacción con el ARN viral favoreciendo la formación de la ribonucleoproteína. Su dominio carboxilo terminal actúa como secuencia señal para el transporte, a través de la membrana, de prM hacia el interior del lumen de Retículo Endoplasmático (RE). Se conoce que C es una fuente inmunodominante de epítomos de células T CD4+ pero no de linfocito T CD8+ (48).

I.1.3 Estructura del genoma

El genoma de VDEN consiste en una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva, lineal y no segmentado. Está compuesto por 11000 pb (pares de base) y tiene un peso molecular de 4,2 kDa. Posee un único marco abierto de lectura (ORF-*del inglés*- Open Reading Frame) de unos 3400 codones, flanqueado en los extremos 5' y 3' por regiones no codificantes (UTR -*del inglés*- untranslated regions). La UTR 5' tiene una estructura en forma de caperuza que sirve para estabilizar el ARN viral, iniciar la traducción y subvertir los mecanismos celulares iniciales de defensa (49). A diferencia de los ARNm celulares, el genoma de VDEN carece de cola poliadenilada en su extremo 3'.

El ORF codifica para un precursor polipeptídico que es sintetizado en el RE de la célula hospedera. Esta poliproteína es escindida por proteasas y peptidasa celulares y virales dando lugar a tres proteínas estructurales (E, M y C) y siete proteínas no estructurales (NS) (50, 51).

Los genes que codifican para las proteínas estructurales se encuentran hacia el extremo 5' terminal, mientras que el segmento restante abarca las proteínas no estructurales.

5'UTR-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'UTR

I.1.4 Replicación Viral

La unión y penetración a la célula ocurre mediada por receptores. Estas regiones UTR influyen en la traducción del genoma viral y en la replicación, ya que a la región UTR 5' se une la ARN polimerasa-ARN dependiente/ metiltransferasa viral (NS5) (52).

La replicación empieza con la síntesis de una cadena ARN de polaridad negativa (ARN (-)) que sirve como molde para la síntesis de nuevos ARN progenie de polaridad positiva (ARN (+)). La síntesis del ARN viral es asimétrica, con una acumulación de ARN (+) diez veces mayor que la cantidad de ARN (-) sintetizada. En las células infectadas por VDEN pueden apreciarse cambios estructurales en membranas perinucleares (53). La traducción es dependiente de caperuza, y la metilación de la caperuza 5' ayuda a evadir las defensas antivirales innatas que inhiben la traducción en células infectadas. La traducción del único ORF produce un poliproteína larga que es co- y postraduccionalmente escindida en 10 proteínas. Los cortes son llevados a cabo por proteasas celulares y virales (45).

Para el ensamblaje de las nuevas partículas el extremo N-terminal de la proteína C actúa como una secuencia señal (54). Los viriones parcialmente ensamblados son transportados al RE de la célula hospedera, donde las nucleocápsides son envueltas con la membrana del RE que ya contiene las proteínas virales E y prM, formándose viriones inmaduros de unos 60 nm de diámetro. Finalmente, estas partículas son

transportadas a través de la ruta secretora celular, mientras las proteínas prM son escindidas por la proteasa celular furina y se obtiene proteína M, lo cual desata una redistribución de las moléculas de M y E para formar los viriones maduros (55). Tras el ensamblaje los viriones y su transportación a través de la ruta secretora, son liberados en la superficie celular. Pasos adicionales de maduración ocurren durante la salida del virus, como la modificación de prM y E por adiciones y deleciones terminales (50).

I.1.5 Transmisión de VDEN en la naturaleza

El vector transmisor del virus dengue es fundamentalmente el mosquito hembras de la especie *Aedes aegypti*, aunque también se conoce que la transmisión puede estar dada por *Aedes albopictus*. El virus dengue es transmitido por la picadura de mosquitos hembras que se infectan de manera horizontal al ingerir sangre de una persona virémica. Sin embargo, numerosos estudios han identificado la transmisión vertical como otro mecanismo de infección viral (56).

El ciclo de transmisión del virus del dengue por los mosquitos *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus* comienza con una persona infectada con el dengue, que tendrá el virus circulando en la sangre (viremia que dura aproximadamente cinco días). El virus es inoculado en los seres humanos con la saliva del mosquito vector hembra, luego se localiza y se replica en diversos órganos diana (57). Posteriormente se libera y se difunde por la sangre para infectar los leucocitos y otros tejidos linfáticos. Cuando un nuevo mosquito ingiere sangre de una persona infectada, que contiene el virus, este pasa al mosquito y se replica en la zona del tubo digestivo, los ovarios, el tejido nervioso y el cuerpo grasoso, luego se difunde en la cavidad corporal y posteriormente infecta las glándulas salivales, donde se replica. Cuando el mosquito pica a otro ser humano, el ciclo continúa (58).

I.1.6 Situación epidemiológica

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos de más rápida propagación en el mundo. La OMS calcula que cada año se producen entre 50 y 100 millones de infecciones y 2,5 billones de personas están en riesgo de contraerlo (57). Los brotes suelen ser explosivos o progresivos, dependiendo de la densidad y susceptibilidad del vector, la cepa del virus de dengue, el nivel de inmunidad en la población humana, y la intensidad de contacto vector-humano. En los últimos 50 años, su incidencia ha aumentado 30 veces con la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y, en la actual década, de áreas urbanas a rurales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima cerca 2500 millones (40 % de la población mundial) de personas procedentes de zonas urbanas y peri-urbanas y rurales se encuentran en riesgo de contraer la infección (59).

Históricamente el dengue se ha considerado una enfermedad típica de países tropicales, sin embargo, hoy en día la epidemiología ha cambiado, otras zonas geográficas del mundo están siendo afectadas y la incidencia del dengue se ha incrementado dramáticamente. La enfermedad ha sido reconocida en más de 100 países y es endémica en África, el Mediterráneo Oriental, el Sudeste Asiático, el Pacífico Occidental y en las Américas (60). En la actualidad no existe una vacuna efectiva para el tratamiento terapéutico, y es el control del vector la única estrategia efectiva disponible. El dengue se reconoce en la región de las Américas desde el siglo XVIII. En los siglos posteriores la literatura recoge epidemias ocurridas principalmente en el Caribe y sur de EUA. No obstante, en las recientes décadas, la infección se ha propagado con brotes cíclicos que ocurren cada tres o cinco años. De 2001 a 2007, más de 30 países de las Américas notificaron un total de 4 332 731 casos de dengue (61).

En 2019 se registró el mayor número de casos de dengue histórico, con más de 3,1 millones de casos, incluyendo 28 203 casos graves y 1 773 muertes. En 2022, hasta la SE 52, de los 2 803 096 casos de dengue notificados en la Región, 1 299 273 (46,4 %), fueron confirmados por laboratorio y 4497 (0,16 %) fueron clasificados como dengue grave. El número más alto de casos de dengue se observó en Brasil con 2 383 001 casos, seguido por Nicaragua con 97 541 casos y Perú con 72 844 casos (62).

I.1.6.1 Situación epidemiológica en Cuba

La primera epidemia ocurrió en los años 1977-1979, la cual se extendió por toda la isla, causada por el virus VDEN-1 genotipo americano, donde se diagnosticaron más de 400 000 casos clasificados clínicamente como FD (63). En 1981 aparece en Cuba y por primera vez en las Américas la FHD. Esta epidemia provocada por el VDEN 2 genotipo asiático afectó a todo el país, un total de 344 203 personas se infectaron y 101 niños murieron. Dieciséis años después ocurrió la segunda epidemia de dengue causada por el VDEN 2 genotipo americano, en Santiago de Cuba. En esta epidemia se demostró el papel de los anticuerpos heterólogos en el desarrollo del fenómeno de amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) (64). Otras dos epidemias ocurrieron posteriormente en el 2002 y el 2006 en las que circularon los serotipos 3 y 4 respectivamente (65).

En el periodo de 2007 a 2017, se han registrado en diferentes provincias pequeños brotes de dengue con circulación de varios serotipos virales (66). Durante los años 2019 y 2020 se detectó en el país la circulación de VDEN 1 y en el 2021 además del VDEN 1 circuló el VDEN 2. Durante el 2022 observamos un incremento del número de casos de dengue y la detección de la circulación de los cuatro serotipos virales. El

dengue 3 fue el que predominó durante el año seguido del dengue 2 aunque observamos diferencias entre las diferentes provincias (67).

I.1.7 Antivirales naturales contra VDEN

Para el desarrollo de antivirales se requiere del conocimiento del ciclo de multiplicación del virus en la célula hospedera, así como las características estructurales y funcionales de las proteínas virales, a fin de identificar las moléculas dianas o los mecanismos moleculares más adecuados para bloquear la infección (68). Entre los compuestos potenciales como blancos antivirales se encuentran los inhibidores de la entrada del virus a la célula, de la etapa de maduración, de la expresión génica, de proteasas y de la síntesis de ARN.

Se han usado diferentes estrategias en la búsqueda de antivirales contra el dengue, como el estudio extensivo de compuestos que actúen sobre enzimas virales e incluso estudios bioinformáticos (69).

Durante las últimas décadas los investigadores han centrado su atención en los compuestos naturales, tratando de identificar compuestos con posible actividad antiviral contra el virus dengue. La naturaleza es un vasto reservorio de sustancias que pueden ser empleadas directamente como fármacos o pueden servir como guía para ser optimizadas en lograr el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos con estructuras moleculares novedosas con efectos adversos escasos (70).

En vistas de sus escasos efectos adversos, el empleo global de plantas o medicamentos basados en plantas, está en creciente uso. Aunque un número de plantas se conocen por su actividad anti-dengue, aún son pocas las investigaciones que se han publicado con relación al aislamiento e identificación de compuestos de plantas y su evaluación en busca de actividad antiviral frente al virus dengue (71). Entre los compuestos estudiados con más profundidad en busca de actividad anti-dengue se encuentran:

I.1.7.1 Polisacáridos

Con respecto a este tipo de compuestos se pueden encontrar diversos estudios. Las principales fuentes de polisacáridos empleadas son los productos marinos como algas pardas, algas rojas, etc. Estos compuestos han mostrado varias actividades biológicas. Se ha demostrado que algunos, como los fucoidanos, inhiben la replicación de VDEN-2 (55, 72). Talarico y col. (2007) estudiaron la actividad antiviral de distintos tipos de polisacáridos, compuestos que se pueden encontrar en la naturaleza como parte de plantas y algas. Se demostró que algunos, como el caroteno, son potentes inhibidores de VDEN-2 y VDEN-3 en células Vero y HepG2 (73). Estos autores también estudiaron polisacáridos sulfatados extraídos de algas rojas contra los cuatro

serotipos de VDEN. Sus resultados comprueban que estos extractos exhiben actividad antiviral frente a VDEN-2 y VDEN-3 en células de mamíferos, no siendo así para los serotipos VDEN-4 y VDEN-1 (74).

I.1.7.2 Alcaloides y compuestos relacionados

Son también metabolitos secundarios de plantas. La mayoría poseen actividad fisiológica en animales, con efectos tranquilizantes y analgésicos. Se han conducido estudios para evaluar su posible actividad antiviral, como es el de Low y col. (2009), donde se identificó el dihidrocloruro de emetina como un potente antiviral frente a dengue (75).

I.1.7.3 Compuestos fenólicos

Muchos de los fenoles son metabolitos secundarios de plantas, con funciones tan diversas como de defensa, de soporte mecánico, pigmentos, etc. Como muchas otras sustancias extraídas de plantas, se han estudiado sus posibles actividades antivirales.

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas que les confieren color u olor. Muchos de estos compuestos presentan propiedades antimicrobianas y anticancerígenas, por lo que el hombre los suele consumir como parte de la dieta. De ahí que se estudien en la búsqueda de actividad antiviral frente a VDEN-2. El estudio de Zandi y col. (2011), evaluó la actividad antiviral de la naringenina, rutina y fisetina contra VDEN-2, demostrando que la naringenina provoca una inhibición de la replicación viral (23).

Crance y col. (2003), evaluaron la glicirricina, compuesto presente en la raíz de *Glycyrrhiza glabra* contra flavivirus como VDEN-1, VDEN-2 y VDEN-3. Varias bioactividades se determinaron en estos compuestos, los cuales ya se han usado en pacientes con otras enfermedades (76).

En otro estudio, la narasina, que es un antibiótico producido por *Streptomyces aureofaciens* mediante fermentación, mostró actividad antiviral contra los cuatro serotipos de VDEN (21).

Estos son apenas unos pocos ejemplos del extenso estudio que se lleva a cabo con extractos obtenidos de plantas y algas en busca de actividad antiviral contra los virus del dengue.

Durante las últimas décadas la explotación de productos naturales ha arrojado una gran variedad de compuestos con actividad antiviral contra serotipos de dengue, y el interés en estos productos es creciente. Por otra parte, las estructuras de compuestos naturales pueden servir como prototipos que sean optimizados para encontrar sustancias más activas contra VDEN. Algunos de estos estudios, usaron más de una metodología para llevar a cabo o confirmar la actividad antiviral (77, 78). Todos se

asociaron con ensayos “in vitro”, pero son los estudios “in vivo” los que indican cuáles de estos pueden ser usados en terapias antivirales, ya que la efectividad in vitro no se correlaciona necesariamente con la efectividad “in vivo”.

I.2. Características generales del propóleo

El propóleo, es un producto natural que resulta de la mezcla entre la resina recolectada por las abejas, a partir de las yemas y cortezas de los árboles, y enzimas secretadas por las glándulas del insecto, además de cera y polen en distintas proporciones (1, 79, 80). Su nombre proviene del griego pro ('delante de' o 'defensa') y polis ('comunidad' o 'ciudad') y significa defensa de la ciudad (81, 82).

El origen botánico de este bálsamo es variado, pero generalmente lo constituyen plantas leñosas y resinosas: Abedul, Álamo, Pino, Aliso, Sauce, Palma y otras(81). Asimismo, el 51 % de la flora endémica cubana puede proporcionarle una composición química peculiar a los propóleos nativos lo que justifica la variabilidad de los mismos en diferentes zonas del país (1). De modo general los propóleos cubanos tienen su origen botánico en especies del género *Clusia* (copey), *Mangifera* (mango), *Pinus* (pino), *Euphorbia lactea* (cardona), *Avicennia germinans* (83)(mangle prieto) y *Rhizophora mangle* (mangle rojo). Además, varios estudios demuestran que *Clusia rosea*, es la especie vegetal más utilizada por las abejas para la elaboración de propóleos de color pardo en la isla y también se considera un árbol propolífero en la hermana República de Venezuela (5, 84, 85).

Este producto apícola, se encuentra en todas las partes de la colmena (86) y proporciona protección física y química a la misma. Es empleado por las abejas para sellar las grietas, consolidar los componentes estructurales, y barnizar el interior de la colmena (incluyendo los panales). También es utilizado por el insecto con fines desinfectantes y para reducir las vías de accesos de los depredadores y embalsamar los cadáveres de estos animales evitando su descomposición (5, 87-89).

El aspecto del propóleo, así como su color, aroma, sabor, consistencia, y composición, es variable, y depende de su origen geográfico y botánico, las condiciones medioambientales, la vegetación que circunda a la colmena, el tipo de abeja y el método de recolección empleado por el humano (raspado o mallas) (87, 90, 91). Es una sustancia pegajosa, resinosa y gomosa, con sabor fundamentalmente amargo y ligeramente picante y un aroma herbal y resinoso que varía en intensidad. Por su parte la tonalidad del propóleo puede ser rojo, amarillo-rojizo, amarillo- oscuro, marrón, pardo, verde, castaño, negro entre otras. En Cuba se han identificado tonos de marrón, pardo, pardo-rojizo, rojo y amarillo (92).

Asimismo, diversos estudios han demostrado que el aspecto pegajoso y flexible del propóleo, lo adquiere cuando se encuentra en ambientes con temperaturas elevadas,

mientras que a temperaturas bajas (en refrigeración, 4 a -20 °C) este bálsamo se vuelve firme, duro y quebradizo. Además, se conoce que su punto de fusión está entre 60 °C y 70 °C (20, 89, 93).

Por otra parte, al igual que estas características, también se ha estudiado la solubilidad del propóleo. Muchas investigaciones plantean que es un material lipofílico, cuyo mejor solvente es el etanol, y que otros como, el éter etílico, el agua, el metanol y el cloroformo pueden ser usados para la extracción y la identificación de algunos componentes específicos de este producto. También se ha usado el propilenglicol como solvente para la preparación de propóleos en la industria farmacéutica y cosmética (91, 94, 95).

I.3. Composición del propóleos

Cada propóleos posee características organolépticas, fisicoquímicas y bromatológicas únicas. Sin embargo, se sabe que de forma general los propóleos están compuestos, macroscópicamente, por resinas y bálsamos aromáticos (50-55 %), ceras (30-40 %), impurezas mecánicas (10-15 %), polen (5 %) y aceites esenciales y otras sustancias volátiles (5-15 %) (figura 1) (1, 20, 81).

La porción de cera que se encuentra en el propóleos depende, fundamentalmente, del fin de este en la colmena, y es insoluble en agua y en alcohol en frío, pero soluble en n-hexano o éter de petróleo (87).

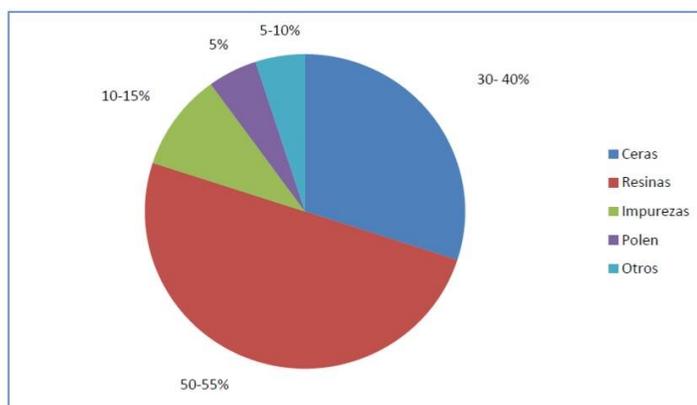


Figura 1: Composición genérica del propóleos materia prima

Por otra parte, la fracción de resinas en los propóleos es la más relacionada con su origen botánico. Esta es altamente soluble en etanol, metanol, cloroformo y prácticamente insoluble en agua. En este fragmento se han identificado más de 300 compuestos, principalmente polifenoles (87), cuyo contenido, así como el de flavonoides totales, son un parámetro importante para establecer la calidad del producto (96), pues constituyen el 50 % de la materia orgánica presente en el

propóleos y a ellos se les atribuye en gran parte la actividad biológica del bálsamo (97).

Asimismo, a pesar origen geográfico, en la mayoría de los propóleos se ha descrito la presencia de ésteres, aldehídos y ácidos fenólicos. También se han encontrado terpenos, sesquiterpenos, β -esteroides, aldehídos aromáticos, vitaminas, alcoholes, aminoácidos, azúcares, lignanos, y ácidos grasos, p-cumáricos prenilados, cafeoilquínicos, ferúlico, y cinámico (figura 2). Además en muestras de propóleos procedentes de China se reportó la presencia de octacosanol, sustancia común en las ceras epicuticulares de plantas, incluidas especies de *Eucalyptus*, *Acacia*, *Trifolium*, *Pisum* y de la mayoría de los pastos de forraje y cereales (figura 3) (98). La presencia y la proporción de estos componentes en cada propóleos permiten su clasificación en diferentes grupos (88, 89, 99).

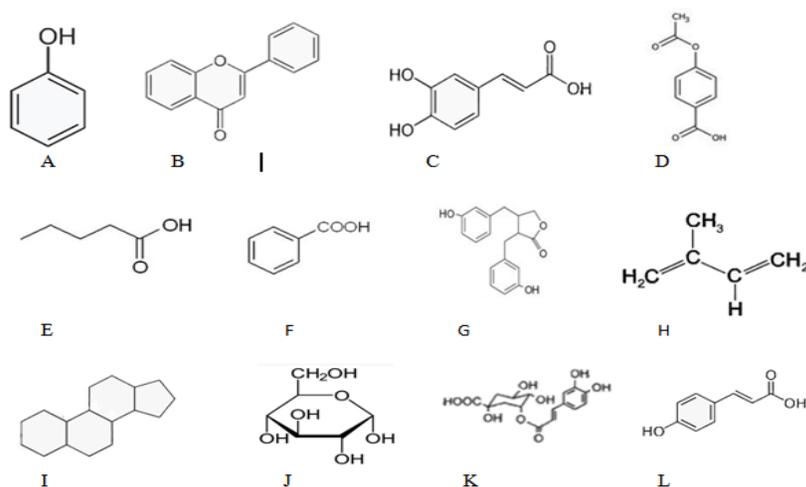


Figura 2: Estructura química de algunos compuestos del propóleos: **A** fenol (C_6H_5OH) **B** Flavona ($C_{15}H_{10}O_2$) **C** Ácido cafeico ($C_9H_8O_4$) **D** Ester fenólico **E** Ácidos alifáticos **F** Ácidos Aromáticos **G** Lignanos **H** Terpeno **I** Esteroides **J** Azúcar **K** Ácidos cafeoilquínicos **L** Ácidos p-cumáricos

En Cuba se han encontrado tres tipos de propóleos según su composición química (82):

- Tipo I: Propóleos generalmente de color pardo, cuyo componente mayoritario es la Nemorosona y presenta una menor cantidad de polifenoles y flavonoides.
- Tipo II: En su mayoría son propóleos de color rojo cuyo origen botánico es fundamentalmente el Mangle Rojo. Se conoce que este tipo presenta una elevada cantidad y variabilidad de polifenoles y flavonoides.

- c) Tipo III: Habitualmente sus extractos alcohólicos son de color amarillo. Este grupo se caracteriza por la presencia de compuestos alifáticos tales como alcoholes triterpénicos, terpenos y terpenoides.

Cuesta y col. (1997), a través de un estudio realizado a propóleos rojos de Cuba demostraron que estos poseen quinonas, triterpenos y/o esteroides, azúcares, lactonas, flavonoides (naringenina), fenoles y/o taninos, ceras y resinas (100). Asimismo, en propóleos pardos cubanos, se ha determinado la presencia de β -amirina, ácidos grasos saturados y benzofenonas preniladas (nemorosona, propolona B, C y D, y la mezcla guttiferona E-xanthochymol). También, se reporta la presencia de naftoquinonas y sus derivados, éteres, hidrocarburos e isoflavonoides en los propóleos cubanos (5, 101).

I.4. Propiedades biológicas del propóleos



Figura 3: Estructura química octacosanol ($C_{28}H_{58}O$)

El propóleos es mundialmente conocido por su gran potencial biológico. La aplicación de este producto como una sustancia con propiedades curativas, data de aproximadamente 300 años antes de Cristo (a.C) (102), por ejemplo Hipócrates (460-377 a.C) señaló que el propóleos posee determinadas características que permiten su uso para el tratamiento de heridas y úlceras en los seres humanos. Asimismo, los egipcios, utilizaron el propóleos con diferentes fines, entre ellos el de embalsamar a sus cadáveres, tal como lo hacen las abejas con los depredadores que perecen dentro de las colmenas.

En resumen, la utilidad del propóleos fue atravesando de época en época y con ella la necesidad del estudio químico, físico y biológico de este bálsamo: médicos griegos y romanos lo emplearon para eliminar toxinas en la piel, reducir inflamaciones y aliviar dolores de nervios; en la Edad Media se utilizó como antiséptico y desinfectante bucal; los incas lo aplicaron como agente antipirético; en los siglos XVII y XX, se popularizó por su actividad antibacteriana; y actualmente se emplea frente una gran variedad de patógenos de humanos, animales, y planta, y se conoce que posee capacidad antioxidante, anticancerígena, inmunoestimulante, antiinflamatoria (7), antialérgica, antitrombótica, y antineoplásica (81, 102, 103).

Asimismo, varias investigaciones demuestran que las propiedades terapéuticas del propóleos dependen de su procedencia y del solvente empleado para realizar el

extracto, ya que están estrechamente relacionadas con su composición química, y pueden variar según la presencia de uno o varios componentes químicos (5). Tolosa y col. (2002), demostraron que los extractos etanólicos son los más efectivos en cuanto a actividad antimicrobiana se refiere (104). Lo cual puede deberse a la alta solubilidad del propóleos en etanol y a que en la porción soluble en este solvente (resinas) es donde se encuentran la mayoría de los compuestos que le confieren propiedades antifúngicas, antivirales y antibacterianas (103).

Los aceites esenciales, por su parte presentan, al igual que actividad biológica, pero son compuestos volátiles y se pueden degradar, principalmente por oxidación ya sea por acción del tiempo o de elevadas temperaturas (105).

Las investigaciones realizadas, encaminadas a establecer el potencial biológico del propóleos a nivel mundial, han permitido demostrar que los compuestos fenólicos y los ácidos orgánicos (ácido cafeico, entre otros) que se encuentran en este producto son los encargados de su acción farmacológica, quedando establecidas sus propiedades antibióticas, fungicida, antiviral y antitumoral, entre otras (89). También se ha demostrado que los triterpenos pentacíclicos encontrados en propóleos brasileños y de países tropicales en general, están vinculados con su actividad antiinflamatoria, anticancerígena y antiviral (106, 107).

Por otra parte, los flavonoides presentes en los propóleos, poseen una acción directa sobre las membranas de algunas bacterias, reduciendo su capacidad de permeabilidad, inhibiendo su motilidad, haciéndolas más vulnerables al ataque del sistema inmunológico. Además, los flavonoides se caracterizan por actuar de forma similar al ácido nicotínico, dándole propiedades oxido reductoras, en sinergia con el ácido ascórbico (108). Conjuntamente se conoce que estos ejercen un efecto antiinflamatorio a nivel de las articulaciones, de la piel, y mucosas y estimulan la síntesis del colágeno de las paredes vasculares, acelera la epitelización y división celular en la curación de heridas (109). También se relaciona la actividad antibacteriana con el ácido p-cumárico, diterpénico prenilados y los flavonoides galangina, pinobanksina y pinocembrina, esta última también exhibe actividad antifúngica. Los derivados del ácido cafeoilquínico, que han sido aislados del propóleos, muestran acciones inmunomoduladoras y hepatoprotectoras y los furofuranos lignanos inhiben el crecimiento de algunas bacterias (81).

En Cuba el propóleos es uno de los productos naturales más activos que se insertan en las investigaciones al respecto (cosméticos, suplementos alimentarios y medicamentos). Como resultado de estas investigaciones se ha demostrado que la presencia de quinonas y triterpenos en los propóleos rojos cubanos está estrechamente relacionada con su actividad antiinflamatoria, hepatoprotectora y

antioxidante (110). Siendo esta última afectada por el origen botánico y geográfico (89).

Asimismo, mundialmente, muchos son los estudios realizados para demostrar la actividad antibacteriana del propóleo. Estos han arribado a la conclusión de que la droga apícola es más eficaz para combatir las bacterias Gram positivas que contra las bacterias Gram negativas (89). Tolosa y Cañizares (2002), demostraron la actividad de propóleos de diferentes territorios de Campeche frente a *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Salmonella typhi*, siendo esta última la más resistente al producto (104).

De igual forma, estudios han demostrado que algunos compuestos aromáticos, ésteres de ácidos grasos y sesquiterpenos aislados de extractos de propóleos turcos, poseen actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus beta hemolítico*. Además, compuestos fenólicos y los ácidos diterpénicos presentes en propóleos brasileños, actúan contra el *Helicobacter pylori* y son responsables de la actividad hepatoprotectora (47, 111, 112). Esta acción anti-helicobacter, también fue demostrada con propóleos chilenos de diferente origen botánico (113). Además, se ha comprobado la actividad antimicrobiana del propóleo frente a *Escherichia coli*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Trichophyton rubrum*, *Listeria spp*, *Bacillus spp.*, *Candida albicans* (114). La actividad frente a la levadura se demostró que es mayor en propóleos centro europeos (Alemania, Francia y Austria) con predominio del ácido trans-p-cumárico, que en propóleos mediterráneos (Bulgaria, Turquía, Grecia y Argelia), que contienen flavonoides, ésteres del ácido cafeico y ácidos ferúlicos (103).

Por otra parte, en países como Chile y China se ha demostrado la capacidad del propóleo para disminuir la expresión del hígado graso alcohólico y no alcohólico (115, 116). En el caso de esta última cuando se encuentra en etapas avanzadas la dosis es de 12 ml diarios de extracto alcohólico al 5 %. Asimismo, se ha observado que el propóleo baja la presión sanguínea, reduce los niveles de triglicéridos y de Colesterol Ligado a Lipoproteínas de Baja Densidad (LDLc; por sus siglas en inglés) y eleva los de Colesterol Ligado a Lipoproteínas de Alta Densidad (HDLc; por sus siglas en inglés) (110).

Igualmente, varios estudios realizados en ratas con propóleos de diferentes procedencias demuestran el efecto de este producto sobre la diabetes mellitus ya que, entre otros aspectos, controla los niveles de la glucosa en la sangre de individuos que presentan dicha enfermedad (117, 118).

Además, se ha observado que el propóleo verde de Brasil muestra actividad neuroprotectora tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, debido a las propiedades antioxidantes del cafeato de fenetilo. Por otra parte, propóleos de igual

origen geográfico inhiben la adhesión de trofozoitos de *Giardia duodenalis*, lo cual sugiere su empleo como agente anti*giardiásico* (119, 120). También se recomienda a este producto como tratamiento para úlceras gastroduodenales y para aliviar dermatitis provocadas por bacterias y hongos (109, 121, 122).

En la rama de la estomatología, el propóleo también es ampliamente utilizado por todas las propiedades, anteriormente citadas, que este posee (89, 123). Además, Moreno y col. (2007), probaron el efecto del propóleo de diferentes orígenes geográficos (argentinos, colombianos y cubanos) frente a este *Streptococcus mutans*, y observaron que la cepa ATCC 25175 es sensible a al producto independiente de su origen (124). Asimismo, esta droga apícola se ha empleado en el tratamiento de la candidiasis oral, gingivitis, aftas bucales, estomatitis aftosa, cirugía bucal, recubrimiento pulpar, periodontitis, bolsas periodontales, entre otras (5). También Herrera y col. (2012) propusieron al propóleo como una alternativa de uso en el área de endodoncia, dado el potente efecto frente a *Enterococcus faecalis*, patógenas resistentes a los desinfectantes y medicaciones intraconducto utilizados en la terapia endodóntica (125).

Otro efecto interesante del propóleo es la actividad anticancerígena. Estudios han demostrado que flavonoides, aislados de este producto, tienen efectos antitumorales, tal es el caso de la propolina C, aislada de propóleo de Taiwán, que induce efecto citotóxico en las células del melanoma humano (126). También, el ácido cafeico disminuye el crecimiento tumoral en metástasis pulmonar de tumor mamario (127), este en dosis de 10 mg/ml es capaz de inhibir completamente la incorporación de timidina en el ADN del carcinoma de mama (128). El cafeato de fenetilo y la artepillina C tienen un efecto anticancerígeno y quimiopreventivo en el tratamiento de la metástasis del cáncer de colon (129). El ácido p-cumárico y diterpénico prenilados también es citotóxico para las células tumorales (81, 89, 130).

El efecto antitumoral del propóleo también es efectuado por los flavonoides que contiene, los cuales inhiben la incorporación de timidina, uridina y leucina en las células cancerígenas. Los flavonoides también inhiben la tirosinquinasa, las topoisomerasas I y II, así como, a las quinasas de las proteínas que controlan la división celular en los cuadros de oncogénesis, manifestado un metabolismo lento y retraso del crecimiento celular (130).

Como se planteaba anteriormente el propóleo no es solamente útil para el ser humano, sino también, para otros animales. Varios estudios demuestran que este aditivo natural funcional, favorece el sistema inmunológico de los animales y provoca un incremento del peso y de la masa muscular en estos, mediante la estimulación de la ingestión alimentaria. También, existen investigaciones que demuestran que,

en las cabras, al ingerir propóleos como aditivo alimenticio, se estimula la producción de sólidos totales, grasa y proteína en la leche; resultando benéfico también en bovinos, pollos, porcinos, tilapias y trucha arco iris (130).

Asimismo, a pesar de los escasos estudios relacionados con los posibles usos del propóleos en la agricultura, este podría ser una alternativa de origen natural a los pesticidas sintéticos tradicionales ya que presenta actividad frente a varios fitopatógenos (tabla 1) (88).

Tabla 1. Patógenos de plantas con sensibilidad al propóleos

Fitopatógenos	Huésped	Enfermedad	Bibliografía
<i>Sclerotium cepivorum</i>	<i>Allium cepa</i> (cebolla) <i>Allium sativum</i> (ajo)	Pudrición blanca del ajo	Acevedo (2009)
<i>Alternaria alternata</i>	Más de 380 especies vegetales	Manchas, pudriciones, y decoloraciones, en las hojas de las plantas	Sosa López y colaboradores (2014)
<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Dioscorea</i> sp. (Ñame) limón mexicano cebolla litchi papaya; mango.	Antracnosis	Sosa López y colaboradores (2014)
<i>Penicillium digitatum</i>	Cítricos frutas en épocas de post-cosecha	Moho gris en naranjas almacenadas	Matny (2015)

I.4.1 Actividad antiviral del propóleos

La actividad antiviral del propóleos es, también, de gran interés en la rama investigativa. Varios estudios demuestran el efecto de esta droga frente a virus que afectan tanto a humanos como a animales. También, se ha observado que este producto actúa sobre virus de ADN y ARN ya sean mono o bicatenario, de polaridad positiva o negativa (5).

Estudios demostraron la acción antiviral de este producto frente al virus herpes simple (VHS) Tipo 1 y 2, adicionalmente ante poliovirus Tipo 2, ya que es capaz de reducir la síntesis del ADN viral, debido a la acción sinérgica de, el ácido cafeico con su éster, el ácido ferúlico y los flavonoides que se encuentran en el propóleos (89, 103). Asimismo, se conoce que la actividad frente a ambos Tipos de Herpes (VHS 1 y 2) es mayor que la que presenta el Aciclovir, antiviral ampliamente utilizado contra el virus (30, 81) y parece ocurrir antes que penetren la célula y no después de su ingreso (130).

También se ha demostrado la capacidad antiviral del producto en cuestión sobre el virus de influenza aviar, virus de la enfermedad Newcastle, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Adenovirus Tipo 2, Virus de estomatitis vesicular Coronavirus, Virus de Influenza A y B, virus Vaccinia, y Rotavirus 2 (5).

Asimismo, se ha estudiado la actividad *in vitro* de las flavonas y flavonoles aislados del propóleo frente al virus de influenza Tipo 1, demostrándose que los segundos son más activos que las primeras en el orden de la galangina, kaempferol, y quercetina (81). También se determinó, en un estudio realizado con extractos etanólicos de propóleos brasileños, que este presenta actividad frente a los serotipos 2, 3 y 4 de Rinovirus Humanos (HRV-2 y HRV-4) y dicha acción está dada por la presencia en estos extractos del kaempferol y el ácido p-cumárico (131).

Por otra parte, algunas investigaciones muestran que flavonoides, que también se encuentran en los propóleos de diferente origen geográfico, como la apigenina, el kaempferol y la quercetina tienen efecto antiviral frente al virus dengue. Más detalladamente la concentración inhibitoria del 50 % (CI₅₀) de la quercetina como tratamientos es de 35,7 µg/ml y como profilaxis es de 28,9 µg/ml (23).

De manera general la acción del propóleo sobre los virus puede ser de diversas formas y concluyen en una reducción de la multiplicación viral e incluso en una acción virucida (12). Este producto induce la producción de Interferones (INFs), sustancias que fortalecen la membrana celular, inducen nucleasas que destruyen el genoma viral y modifican el patrón de la fosforilación del factor de iniciación eucariótico, el cual influye en la transducción de las proteínas y detiene toda la biosíntesis de estas, incluyendo la de los virus (132). También interfieren con las estructuras del virión o enmascaran los compuestos virales que son necesarios para la entrada del virus a la célula huésped (89, 130).

Estudios demuestran que el propóleo posee un mayor efecto antiviral frente a HSV-1 y HSV-2 que el Aciclovir. Tal es el caso de propóleos de la provincia turca, Hatay, que suprimió significativamente la replicación de estos virus a partir de las 24 y 48 horas de incubación, respectivamente, en presencia de 25, 50 y 100 µg/ml de propóleos. En este artículo se investiga: i) las actividades antivirales de las muestras de propóleos de Hatay contra HSV-1 y HSV-2 en la línea celular HEp-2, y ii) la presencia de los efectos sinérgicos del propóleo con aciclovir contra estos virus (30).

I.5 Capacidad inmunomoduladora del Propóleo

El propóleo y sus componentes (flavonoides, los ácidos fenólicos y esteres) tienen actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora (81). Mediante esta última el cuerpo es capaz de defenderse de los patógenos que le afectan ya sean virales o microbianos.

Este producto apícola es capaz de modificar la inmunidad inespecífica. Sus constituyentes, tales como el ácido cinámico y su derivado p-cumarínico, estimulan la producción, en los macrófagos, del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), de la

interleucina (IL) -1 β (133), de los receptores celulares tipo toll TLR-2 y TLR-4 y la formación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), mientras que reduce la producción de óxido nítrico (NO) (134).

El efecto inmunológico del propóleo depende en gran medida de su concentración y de la de sus componentes por separado. Elevadas concentraciones de este producto y del ácido cinámico, al contrario de lo planteado anteriormente, inhiben la producción de TNF- α e IL-10, mientras que se fomenta la actividad antifúngica frente a *Candida albicans* (135). En resumen, en dependencia de la concentración el propóleo exhibe efectos proinflamatorios y antiinflamatorios y puede estimular o inhibir ciertos procesos inmunológicos (89).

I.6. Otros usos del Propóleo

Por todas las propiedades, antes señaladas, que posee el propóleo, este es ampliamente utilizado en diversas ramas industriales.

En la industria farmacéutica se elaboran ungüentos tópicos y ampollas que ayudan a la circulación sanguínea, en tratamiento de forúnculos, acné, herpes simple, inflamaciones orales y neurodermatitis también se puede encontrar en forma de cápsulas, como extracto hidroalcohólico o glicólico, en pastillas para la garganta, y en polvo (81, 136, 137).

En la industria cosmética, también es empleado en la elaboración de jabones, champús, pastas dentales, enjuagues bucales, cremas faciales y cosméticos (94).

En muchos países se utiliza, además, como aditivo por sus propiedades antioxidantes. Este producto prolonga entre dos o tres veces la vida útil de productos envasados o en alimentos frescos, ejemplo pescados congelados, grasas y aceites, ron y bebidas alcohólicas y podrían extenderse a otra clase de alimentos tales como carne vacuna, cordero, cerdo, pollo, fruta, etc. (2, 81). Asimismo, en Cuba se utilizan los propóleos como medicamentos, cosméticos y suplementos alimentarios (5).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. 1 Virus

Para la evaluación de la actividad antiviral frente al virus dengue se utilizó la cepa VDEN-2 A15 (2PR 5P C6/36HT), aislada del suero de un paciente con un cuadro clínico de dengue clásico, durante la epidemia de 1981, y conservada en la colección de cepas del Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK).

II. 2 Líneas Celulares

II.2.1 BHK-21

Para el ensayo de titulación viral se empleó la línea celular BHK-21 clon 15 (fibroblastos de riñón de hámster sirio recién nacido) obtenida a partir de la línea BHK-21 clono 13 (ATCC 1992), la cual fue donada al Laboratorio de Cultivos Celulares del IPK por el Prof. S. B. Halstead. Las células se cultivaron en frascos plásticos estériles de 75 cm² en Medio Esencial Mínimo (MEM de las siglas en inglés Essential Minimum Medium), suplementado con 1 % de aminoácidos no esenciales (100X), y Suero Fetal Bovino Inactivado (SFBI) al 10 %. Se pasaron semanalmente a razón de pase de 1:8. Se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂. El medio de mantenimiento consistió en MEM suplementado con SFBI al 2 %.

II.2.2 C6/36-HT

Para la determinación de la citotoxicidad y de la actividad antiviral de los extractos de propóleos en estudio se empleó la línea celular de mosquito C6/36-HT (sublínea obtenida Kuno y Oliver en 1989 a partir de C6/36-HT que crece a 34 °C) donada por el CDC de San Juan de Puerto Rico al Laboratorio de Cultivos Celulares del IPK. Las células se mantuvieron mediante pases semanales con una razón de pase de 1:6, utilizando como medio de crecimiento MEM suplementado con 1 % de aminoácidos no esenciales (100X), 2 mM de glutamina, antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomycinina 100 mg/mL) y 10 % de SFBI por calor (30 minutos a 56 °C). El medio de mantenimiento consistió en el medio de crecimiento, suplementado con SFBI al 2 %.

II. 3 Propóleos

En el estudio se evaluaron cuatro extractos alcohólicos de propóleos cubanos P1, P3, P4, P6, obtenidos a partir de muestras de propóleos (P1_{mp}, P3_{mp}, P4_{mp}, P6_{mp}) recolectadas en apiarios de Matanzas, Mayabeque, La Habana y Holguín respectivamente (tabla 2).

Tabla 2. Origen y forma de obtención de las materias primas de propóleos empleadas en el estudio.

Materia prima (mp)	Color	Método de recolección	Fecha de recolección	Provincia	Extracto alcohólico
P1 _{mp}	Rojo	Raspado	2020	Matanzas	P1
P3 _{mp}	Rojo	Mallas plásticas	2021	Mayabeque	P3
P4 _{mp}	Amarillo	Raspado	2021	La Habana	P4
P6 _{mp}	Pardo	Raspado	2015	Holguín	P6

II.4. Recolección de las materias primas de propóleos

Para el estudio se seleccionaron 15 colmenas por apiario y se emplearon dos métodos de recolección de materia prima o muestras de propóleos

II.4.1 Sistema de mallas o trampas

Se emplearon mallas plásticas matrizadas de 50 x 42 cm, con orificios de 3,4 x 3,2 mm y un espesor de 1,3 mm. Se colocó una trampa en cada caja de colmena, sobre la última alza, entre los cabezales y la tapa durante 30 días.

A los 15 días se procedió a una revisión de las colmenas, y las trampas se desplazaron a partir del lado interno de una de las paredes del cajón, en sentido lateral, a los efectos que la parte propolizada quede sobre el cabezal del marco y la parte que estaba sobre el cabezal (zona sin propolizar) se localice en el espacio que queda entre los marcos.

Posteriormente, para la extracción del propóleos, las mallas se congelaron a -20 °C, y se realizó una separación manual.

II.4.1 Método de raspado

Este sistema consistió en raspar con una espátula (de acero inoxidable), la tapa y la superficie de los cuadros, donde las abejas depositaron el propóleos.

Las muestras de propóleos recolectados mediante uno u otro sistema, se colocaron en frascos de vidrio y/o plástico bromatológicamente aptos y se depositaron en sitios frescos, oscuros y secos, evitando la exposición directa a la luz solar, tubos de neón o focos de gas.

II.5 Preparación de los extractos de propóleos

II.5.1 Extracto alcohólico

Para la preparación de los extractos alcohólicos se tomaron 100 g de cada muestra de propóleos y se mezclaron con 500 mL de alcohol al 96 % (proporción: 1/5 (g/mL)) (figura 4).

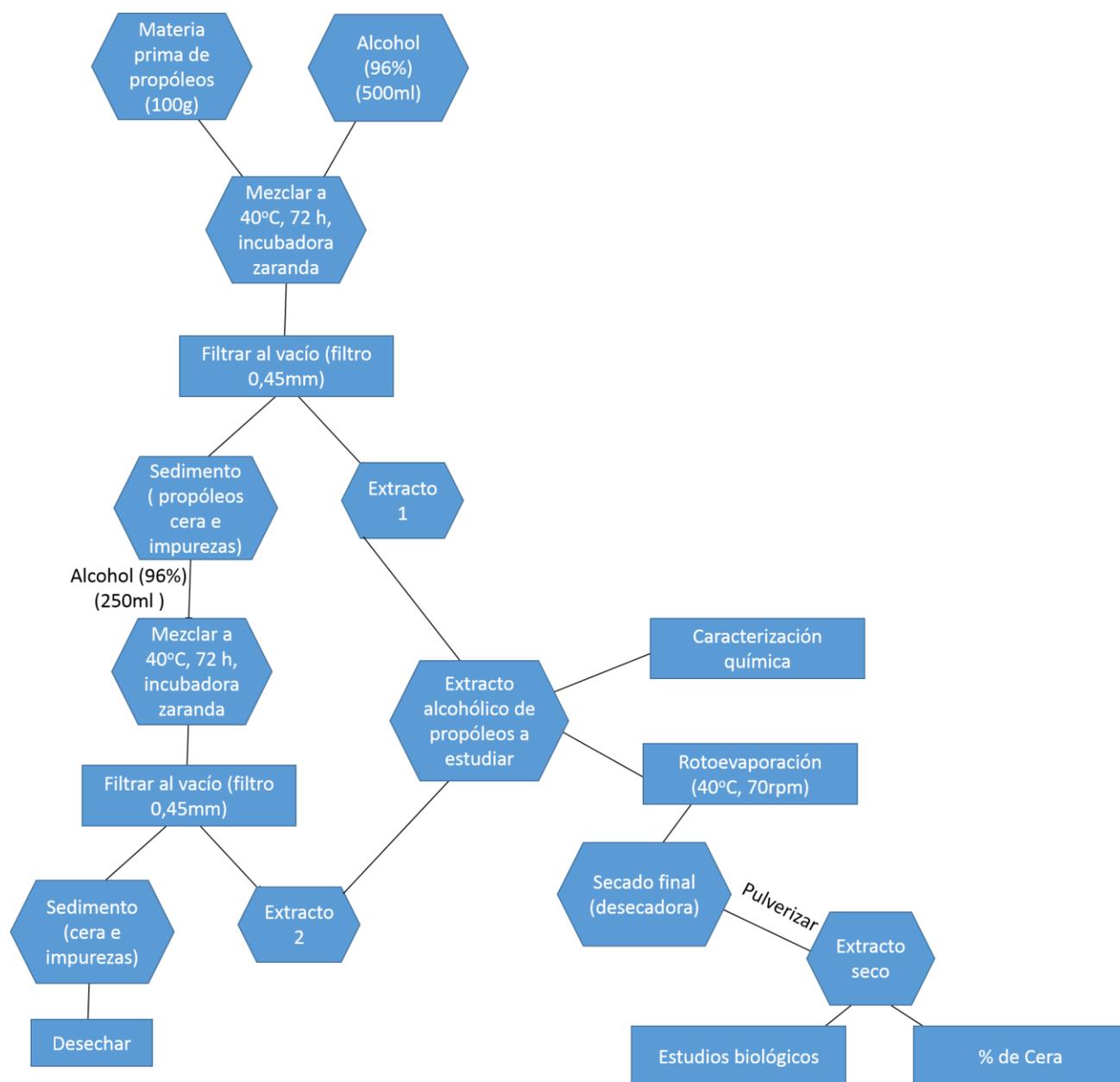


Figura 4. Preparación de los extractos de propóleos.

Las mezclas se colocaron a 40 °C durante 72 horas en una incubadora con zaranda. Los extractos obtenidos, luego de este periodo de incubación, se colocaron durante una hora a -20 °C (138) para separar las ceras y los propóleos extraídos, y se filtraron al vacío empleando filtros de 0,45 mm de diámetro. Posteriormente, a los sedimentos derivados de la filtración, se le añadieron 250 mL de alcohol y se pusieron bajo iguales condiciones durante otras 72 horas, luego de las cuales se procedió a una segunda filtración con las mismas características.

Los extractos colectados en cada filtración se mezclaron y se conservaron a 4 °C en frascos ámbar, para evitar la evaporación del alcohol y la descomposición de los compuestos biológicamente activos.

II.5.2 Extracto seco

Los extractos alcohólicos obtenidos se concentraron a sequedad, en un rotoevaporador (Heidolph Laborota 4010 Digital) a 60 °C y 70 rpm a presión reducida. Luego se vertieron en bandejas de acero inoxidable y se colocaron en una desecadora a vacío hasta su secado total. Los extractos secos obtenidos se almacenaron en frascos de vidrio color ámbar y se conservaron a -20 °C.

II.6 Caracterización sensorial de los extractos alcohólicos de propóleos

La determinación de las características sensoriales de los extractos a evaluar la llevo a cabo el panel sensorial del Centro de Investigaciones Apícolas (CIAPI) mediante pruebas descriptivas del color, el aspecto, el aroma y el sabor. Para esto, los propóleos se colocaron en frascos de vidrio codificados. Primeramente, se evaluó el olor y el sabor y luego el resto de los caracteres, comparando cada muestra con los controles adecuados.

Los atributos mencionados se clasificaron de la siguiente forma:

Aspecto:

1. Heterogéneo
2. Homogéneo
3. Transparente
4. Turbio

Olor/Aroma:

1. Resinoso
2. Aromático
3. Característico
4. Floral
5. Otro

Sabor

1. Picante
2. Resinoso
3. Amargo
4. Característico
5. Fuerte.
6. Suave
7. Ceroso (insípido)
8. Otro

Color

1. Verdoso
2. Amarillo
3. Pardo
4. Marrón
5. Verde
6. Rojo
7. Castaño
8. Otro.

II.7 Caracterización química del propóleos

La caracterización química de los extractos se realizó en los laboratorios del Centro de Investigaciones Apícolas (CIAPI) según los procedimientos plasmados en la norma IRAM-INTA 15935-2 "Productos del NOA (noroeste argentino) Propóleos Parte 2 – Extractos de propóleos " con algunas modificaciones.

II. 7.1 Análisis cromatográfico

II. 7.1.1 Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

Para el estudio cualitativo de la composición química de los propóleos a evaluar se empleó el método de cromatografía en capa delgada desarrollado por Campo y col. en el 2008 con modificaciones (114).

Se utilizó una cámara cromatográfica de vidrio de 21,5 cm de altura, 23 cm x 6 cm el área de la base y 28 cm x 13 cm el área de la cara superior. Se trabajó a temperatura ambiente (25-29 °C) y se estimó un tiempo de saturación de 30 min aproximadamente. Se empleó como fase estacionaria placas de gel de sílica GF 254 (0,20 mm; Macherey-Nagel) sobre soporte de aluminio para los análisis cualitativos (activadas previamente a 100 °C). Como fase móvil se empleó una mezcla de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (5:4:0.2). Como patrón de corrida se emplearon ocho sustancias de referencia: nemorosona (N), pinobanksina (P), kaempferol (K), apigenina (AP), Quercetina (Q), luteolina (L), miricetina (MR) y catequina (Cat). La placa se reveló con luz ultravioleta a las longitudes de onda de 254 nm, y de 366 nm.

II. 7.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución con espectro ultravioleta (CLAR-UV)

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es la técnica cromatográfica más empleada para el fraccionamiento preliminar y para el análisis cuantitativo de los productos naturales. En este estudio se empleó el Cromatógrafo de Líquidos acoplado a un Espectrómetro de Masa de triple cuádruplo LC-MS (LCMS 8040, SHIMADZU). Las separaciones se desarrollaron empleando una columna shimpack HRC-ODS 150 x 4,6 mm 5 µm. La fase móvil empleada fue una mezcla de ácido fórmico al 0,1 % y metanol (Panreac Químia SA, 99.9 %), impulsada a un flujo constante de 1 mL/min. Las inyecciones se realizaron manualmente y contenían 10 µL por muestra. El estudio se realizó a temperatura ambiente y el detector utilizado es luz ultravioleta a 265 nm y a 280 nm según Williams y Harborne, 1989 (139).

II. 7.2 Determinación del porcentaje de sustancias extraíbles en n-hexano (ceras)

Este ensayo se realizó en un extractor de Soxhlet (Behrotest®), a partir del extracto seco obtenido de cada muestra de propóleos recolectada.

Se pesaron dos gramos y se añadieron en cartuchos de celulosa secos, para colocarlos en el extractor. Consecutivamente se añadieron 200 ml de n-hexano (Panreac Química SA, 95 %) en cada balón del Soxhlet. La extracción se realizó durante tres horas luego de que el solvente entrara en ebullición y alcanzara una velocidad aproximada de 130 gotas de condensado por minuto. Posteriormente se evaporaron 10 ml del contenido del balón en placas Petri secas (pesadas con anterioridad) a 100 °C durante una hora. Luego las placas se pusieron durante 30 minutos en una desecadora y se pesaron hasta lograr constancia de masa (dos pesadas sucesivas no difieren entre sí en más de 5 mg).

El porcentaje de ceras o de sustancias extraíbles en n-hexano (S_E) debe ser menor de 2 g/100g y se determinó mediante la fórmula:

$$S_E = \frac{P_1 - P_0}{P_d} * \frac{V_{\text{hex}}}{10} * 100$$

Donde:

P_1 : la masa de la placa Petri con sustancias extraíbles (seco), en gramos;

P_0 : la masa de la placa Petri vacía (seco), en gramos;

P_d : la masa del propóleos que se añadió en al dedal, en gramos;

V_{hex} : el volumen total del n-hexano, en mililitros.

El experimento se realizó por duplicado.

II. 7.3 Determinación de compuestos fenólicos totales (expresados como gramos equivalentes de ácido gálico por mililitros de extracto)

Primeramente, se elaboró una curva de calibración, empleando como solución de referencia una mezcla de ácido gálico (Ag) y etanol (Quimipur, 99,5 %) a concentraciones de 0 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml y 0,5 mg/ml de ácido gálico.

Posteriormente a 0,1 ml de cada solución patrón y cada extracto se añadieron cuatro mililitros de agua destilada y 0,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac Química SA, 99 %). La mezcla se dejó en reposo durante cinco minutos. Luego se añadieron cuatro

militros de una solución de carbonato de sodio al 7,5 %, y 1,4 ml de agua destilada y se dejó en reposo durante dos horas a la oscuridad.

Finalmente se midió la absorbancia de las soluciones en cubetas de vidrio en un espectrofotómetro (MRC, espectro V-II D) a 765 nm, contra un blanco de agua destilada. Las mediciones se realizaron por triplicado. El contenido de fenoles totales se calculó con la fórmula:

$$Ft \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{Abs - I}{b} * \frac{V_{d1}}{V_d}$$

Donde:

Ft: contenido de fenoles totales;

Abs: promedio de las absorbancias de cada muestra;

I: intercepto de la curva de calibración;

b: pendiente de la curva de calibración;

V_{d1}: volumen final de la solución;

V_d: volumen que toma de la muestra.

II. 7.4 Determinación de flavonoides totales (expresado como su equivalente en quercetina)

El contenido de flavonoides totales presente en cada extracto de propóleos, se determinó, por el método de Tricloruro de Aluminio (AlCl₃).

La curva de calibración se trazó con soluciones de quercetina a concentraciones de 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml y 10 µg/ml. El solvente utilizado fue una solución de tricloruro de aluminio (AlCl₃) al 5 %. Los valores de absorbancias se leyeron a 425 nm en un espectrofotómetro (MRC, espectro V-II D).

Para ello se añadió 0,1 ml de las muestras, 0,5 ml de AlCl₃ y 24,4 ml de metanol en volumétricos de 25 ml. Luego se tomó un mililitro de cada dilución y de la solución blanco (0,1 ml de etanol, 0,5 ml de AlCl₃ y 24,4 ml de metanol) y se colocaron en cubetas de vidrio. Los valores de absorbancias se leyeron a 425 nm en un espectrofotómetro (MRC, espectro V-II D) para evitar la interferencia de otras sustancias fenólicas como los ácidos fenólicos. El experimento se realizó por duplicado.

$$Flv = \frac{Abs - I}{b}$$

Donde:

Flv: contenido de flavonoides totales;

Abs: promedio de los valores de absorbancia de cada extracto leído a 425 nm;

b: pendiente de la curva de calibración;

I: intercepto de la curva de calibración.

II. 7.5 Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos

II. 7.5 1. Índice de oxidación

Se añadió dos mililitros de cada extracto alcohólico de propóleos al 5 % de sólidos solubles, a 100 ml de agua destilada y la mezcla se filtró con papel de filtro para análisis cualitativo bajo en cenizas de 125 mm (FILTER-LAB®). Posteriormente, a dos mililitros ml de cada filtrado se le añadió un mililitro de ácido sulfúrico (Applichem, 95-97 %) y se agitó durante un minuto. Luego se agregó 0,05 ml de una solución de permanganato de potasio 0,1 N e inmediatamente que se puso en marcha el cronometro y se registró el tiempo en que la solución tarda en decolorarse, lo que indica la actividad antioxidante de la muestra. Este procedimiento se realizó por duplicado.

II. 7.5 2 Capacidad antioxidante por el método de vitamina C

Se realizó mediante la técnica propuesta por Sayed y Roofot (1979), con modificaciones. La curva de calibración se trazó con soluciones de vitamina C a concentraciones de 0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml y 40 µg/ml. El solvente utilizado fue una solución de ácido oxálico (H₂C₂O₄). Los valores de absorbancias se leyeron a 730 nm en un espectrofotómetro (MRC, espectro V-II D).

La capacidad antioxidante equivalente a la vitamina C se determinó añadiendo 50 µL de los extractos alcohólicos en 10 ml de H₂C₂O₄ y un mililitro de estas soluciones con ácido sulfúrico y molibdato de amonio al 5 % (1:4:5). Luego las mezclas se colocaron a 90 °C durante una hora.

Las concentraciones de compuestos con capacidad antioxidante equivalente a la vitamina C en los propóleos a evaluar, se calculó según la ecuación de la curva de calibración.

$$VC_{ext} = \frac{Abs - I}{b}$$

Donde:

VCext: contenido de compuestos con capacidad antioxidante equivalente a la vitamina C en los extractos alcohólicos;

Abs: promedio de los valores de absorbancia de cada extracto leído a 730 nm;

b: pendiente de la curva de calibración;

I: intercepto de la curva de calibración.

II.8 Ensayo de citotoxicidad

La determinación de la citotoxicidad de cada extracto a analizar se realizó por el ensayo colorimétrico de reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) por enzimas mitocondriales activas en células vivas (40). En el ensayo se emplearon placas de 96 pocillos de fondo plano con monocapa confluyente de la línea celular C6/36 HT, sembrada 48 horas antes a partir de una suspensión de células de 2×10^5 células/mL.

En el ensayo se realizó por duplicado y se añadieron 100 μ L por pocillo de las diferentes concentraciones de cada extracto, con 6 réplicas por concentración, dejándose dos filas como controles celulares.

Las concentraciones a evaluar se prepararon a partir de una madre de 1000 μ g/ml de extracto del propóleos seco disuelto en MEM y abarcaron el rango desde 5 μ g/ml hasta 1000 μ g/ml. Las placas se incubaron según los requerimientos de la línea celular empleada (33 °C, atmósfera con 5 % de CO₂), por un periodo de cinco días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 10 μ L de MTT previamente preparado a concentración de 5000 μ g/mL disuelto en solución salina tamponada con fosfato (SSTF) (0,01 mol/L; pH 7) a todas las placas, y se incubaron en iguales condiciones durante 4 horas (protegidas de la luz). Posteriormente se disolvieron los cristales de formazán con 100 μ L de DMSO por pocillo. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro lector de placas multipozos (MRX Revelation, Dynex Technology®) con el programa integrado Dynex Revelation 4.02 a una longitud de onda de 560 nm con filtro de referencia de 630 nm.

II.8.1 Procesamiento de los datos

El porcentaje de viabilidad o supervivencia asociado a cada concentración evaluada se calculó a partir del valor promedio de absorbancia de los pozos tratados con cada concentración de extracto, respecto al valor promedio de absorbancia de los controles celulares (sin tratar), el cual se considera como el 100 % de viabilidad.

El valor de la CC₅₀ se determinó mediante regresión lineal, a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis-respuesta, obtenida al graficar (concentración del extracto-porcentaje de viabilidad celular).

II.9 Obtención del lote de trabajo de virus

Frascos plásticos estériles de 25 cm² con monocapa confluyente de células C6/36-HT se inocularon con 500 µL de la cepa viral en estudio a una multiplicidad de infección de 0,01, empleando medio de mantenimiento (MEM, Gibco, EUA) con L-glutamina 200 nmol/L al 1 %, suero fetal bovino inactivado al 2 %, antibiótico (Penicilina 10. 000 UI/mL y Estreptomicina 10. 000 µg/mL) al 1 %.

Las células inoculadas se incubaron durante una hora a 33 °C, para facilitar la entrada del virus. Posteriormente se añadieron cinco mililitros de medio de mantenimiento a cada uno de los frascos. Los cultivos celulares inoculados con la cepa A15 del virus Dengue 2 se incubaron a 33 °C y atmósfera de 5 % de CO₂.

La replicación viral se confirmó por el método de reducción de placa. Consecutivamente los frascos se congelaron a -80 °C con una previa adición de SFBI al 20 %. Finalmente, los cultivos se descongelaron de forma rápida a 37 °C y distribuyeron en alícuotas de 200 µL.

II.10 Determinación del título viral en las células BHK-21

Para la titulación en células BHK-21 se procedió según lo descrito en el Manual de técnicas de laboratorio para el diagnóstico y caracterización de los virus del dengue y otros arbovirus (2011) del laboratorio de Arbovirus del IPK, como se describe a continuación:

Se prepararon diluciones seriadas en base 10 (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴,10⁻⁵). Posteriormente, en una placa de 24 pocillos, se añadió 500 µL de una suspensión de células BHK-21 a una concentración de 2 x 10⁵ cels/mL en cada pocillo y se dejó en reposo durante una hora a temperatura ambiente.

Luego se inoculó, en cada pocillo, 50 µL de las diluciones del virus ya preparadas y se incubó durante cuatro horas a 37 °C y atmósfera de 5 % de CO₂.

Después se añadieron 0.5 mL de medio de recubrimiento Overlay (SFBI 6 %, L-glutamina 2 mM, MEM2X, carboximetilcelulosa a 3 g/L, antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomicina 100 µg/mL- 0,2 mL y bicarbonato 2,5 mL), y se incubó a 37 °C y atmósfera al 5 % de CO₂, durante 5 días por requerimientos del virus VDEN-2

Posterior a este periodo de incubación se realizó la tinción de la placa. Para ello se descartó el medio, se lavaron las monocapas celulares, con agua corriente, y a cada pocillo se añadieron 0.5 mL de la solución colorante (ácido acético 1 mmol/L (Merk, Alemania), Naphthol Blue Black 1,6 mmol/L y acetato de sodio 166 mmol/L, Sigma, EUA). Después de 30 minutos en reposo se realizó un segundo lavado de la placa y se dejó a temperatura ambiente hasta el secado completo de la misma. Luego se

realizó el conteo de focos formados en cada pocillo donde se observó efecto y se determinó el título viral según la siguiente fórmula:

$$\text{Titulo viral} \frac{\text{UFP}}{\text{mL}} = Pp * f \text{ dilución} * 10^n$$

Dónde:

Pp: Promedio del número de placas obtenido para las réplicas;

f dilución : Factor de corrección para expresar el título en UFP/mL
 $\left(\frac{\text{volumen del solvente}}{\text{volumen del inóculo}}\right)$;

10ⁿ: Representa la dilución en que se contarán las placas.

II.11 Ensayo de pesquisa primaria de actividad antiviral

La pesquisa primaria de actividad antiviral de los extractos de propóleos frente a VDEN-2 se realizó según la metodología propuesta por Guo y col., 2006 con modificaciones (140).

Para ello monocapas celulares de C6/36-HT crecidas en placas de 96 pocillos se incubaron con concentraciones subtóxicas de los extractos, comprendidas entre 100 µg/mL y 200 µg/mL, empleando 6 pocillos para cada concentración. En cada placa se dejaron dos columnas como controles celulares, una como control viral, y otra como control positivo (virus + suero hiperinmune + células). Tras una hora de incubación a 33 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ se añadió 100 µL de una suspensión viral de dengue 2 con UFP/ml en las columnas correspondientes. Luego las placas se incubaron bajo las condiciones requeridas para la línea celular, (33 °C, en atmósfera con 5 % de CO₂), durante cinco días. Transcurrido este tiempo se colectaron los sobrenadantes correspondientes a cada concentración de extracto evaluada, así como del control viral y el del control positivo y se conservaron a una temperatura de -70 °C.

II.11.1 Determinación de reducción de la productividad vírica mediante el ensayo de reducción del número de placas.

Cada una de las muestras colectadas en el ensayo de pesquisa primaria de actividad antiviral, se evaluaron mediante reducción de la productividad vírica a través de la determinación de reducción del número de placas.

Para ello se inocularon 100 µL de sobrenadante puro de cada una de las muestras en placas de 24 pozos con monocapa de células BHK-21. Tras dos horas de incubación (37 °C, en atmósfera con 5 % de CO₂) se añadió 0,5 mL de medio Overlay (SFBI al 6 %, L-glutamina 2 mM, MEM 2X, Carboximetilcelulosa 3 g/L, antibióticos), y se incubó por cinco días en iguales condiciones. Luego se descartó todo el medio de la placa,

se lavó suavemente con agua corriente y se tiñeron las monocapas con colorante vital Naphtol Blue Black. Tras lavar y dejar secar se procedió al conteo del número de placas formadas en cada pocillo. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

II.11.1 Procesamiento de los datos

El valor porcentual de reducción del número de placas con respecto al control viral se calculó según la relación:

$$\% \text{ de reducción} = [1 - (X_s/X_m)] \times 100 \%$$

Donde:

X_s: promedio del número de placas obtenido para la dilución de la muestra tratada;

X_m: promedio del número de placas obtenido para el control viral.

Toda muestra tratada que exhiba un porcentaje de reducción ≥ 50 se consideró como positiva (presencia de inhibición viral) (Álvarez y col., 2005).

II.12 Procesamiento estadístico

Para comprobar la normalidad de los datos se usaron las pruebas Kolmogorov-Smirnov y el test de Liliefors. La homogeneidad de varianzas se evaluó con el test de Levene. Al no encontrarse cumplidas las premisas de normalidad y homocedasticidad en los datos colectados, se procedió a la realización de pruebas no paramétricas. El nivel de significación estadística es $p < 0,05$. Se determinó la correlación existente entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante, y el contenido de flavonoides totales. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Statistica 6.0 88 (Stat SoftInc 2001).

El valor de CC₅₀ se determinó mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis-porcentaje de viabilidad celular.

III. Resultados y Discusión

El propóleo es un producto natural que las abejas crean y utilizan, fundamentalmente, como sellador de hendiduras y antiséptico. Por su utilidad en la colmena y sus propiedades biológicas, es objeto de innumerables estudios que buscan el efecto de este, sobre enfermedades que afectan tanto a humanos como a animales y plantas, donde los resultados han sido variables, aun tratándose de una misma enfermedad. Esta variabilidad se debe, principalmente, a la compleja composición de los propóleos, que está dada, entre otros aspectos, por su origen geográfico y botánico. En este estudio se caracterizaron, como potenciales antivirales frente al virus dengue 2 A15, a cuatro extractos alcohólicos de propóleos cubanos (P1, P3, P4, P6), procedentes de materias primas recolectadas en apiarios de las provincias: Matanzas, Mayabeque, La Habana y Holguín, respectivamente.

III.1 Caracterización organolépticas de los extractos

El análisis sensorial, en este estudio, se realizó para evaluar la calidad y las características organolépticas específicas para cada extracto alcohólico de propóleos obtenido. La evaluación la ejecutaron panelistas especializados del panel sensorial del Centro de Investigaciones Apícolas mediante pruebas descriptivas del color, aspecto, aroma y sabor.

En la tabla 3 se muestran las características sensoriales con más de un 85 % de semejanza entre los panelistas, para cada uno de los extractos de propóleos analizados en el estudio. En esta se observa que, a pesar de la diferencia en su origen geográfico, todos presentan un sabor amargo y resinoso y un olor característico, además de un aspecto homogéneo a TA. Esto indica que dichos atributos, en los extractos evaluados, no están dados por la localidad donde se ubican los apiarios de extracción, ni por la fuente vegetal, sino porque los propóleos son productos extraídos a partir de la resina de las plantas cuyo aroma y sabor resultan poco variable entre diferentes especies. Esta observación coincide con lo obtenido por Rodríguez y col. (2020), en un estudio realizado a ocho propóleos mexicanos de diferentes municipios (Michoacán, Guanajuato, Veracruz y Puebla) donde todas las muestras presentaron sabor amargo (99).

Tabla 3: Características organoléptica de cuatro extractos alcohólicos de propóleos cubanos.

Parámetros	P1	P3	P4	P6
Olor	Característico resinoso	Característico resinoso	Característico resinoso	Característico resinoso
Color	Rojo	Rojo	Amarillo	Pardo
Sabor	Amargo y resinoso	Amargo y resinoso	Amargo y resinoso	Amargo y resinoso
Aspecto	Líquido transparente, homogéneo a TA			

TA: Temperatura ambiente

Los resultados del presente estudio, además, concuerdan con los obtenidos por Carlos y col. (2010), quienes identifican un predominio (85 %) de aroma característico entre propóleos de diferente origen geográfico de la Región Apícola I-Cuneca del Salado de Buenos Aires (92). Asimismo, Bankova y col. (1998), plantean que el aroma característico de los propóleos se debe a la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos (141). Estos tipos de compuestos también se encontraron en propóleos cubanos de diferentes localidades (142). Estos análisis indican que los propóleos cubanos presentan características físico-químicas similares a los de otros países.

Igualmente, en la tabla 3 se recoge el color observado por los panelistas en los extractos analizados, característica organoléptica más importante para clasificar los propóleos de diferente origen. Como resultado se observó una diferencia en el color de los extractos (pardo, rojo y amarillo) (figura 5), lo que se corresponde a lo observado en la materia prima a partir de los cuales se obtuvieron. Esto indica que existen tres tipos de propóleos cubanos, teniendo en cuenta su color, lo cual concuerda con los resultados del estudio realizado por Campo y col. (2008).



Figura 5. Extractos alcohólicos preparados a partir de 100 g de las materias primas de propóleos cubanos evaluados, P1pm (P1), P3pm (P3), P4pm (P4) y P6pm (P6).

En la figura 5 se observa que los extractos P1 y P3, tienen tonalidades de color rojo similares, a pesar de la diferencia en el origen geográfico de la materia prima a partir de la cual se obtuvieron. Asimismo, Cuesta y col. (2007), demuestran la existencia de propóleos cubanos de color rojo, amarillo y pardo en todas las regiones del país, en un estudio de caracterización química realizado a 65 muestras de este producto apícola, por los métodos de Resonancia Magnética Nuclear Monodimensional (1D NMR, por sus siglas en inglés), Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Matriz de Fotodiodos (HPLC-PDA, por sus siglas en inglés) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Espectrómetro de Masas (HPLC-MS, por sus siglas en inglés) (107). Sobre estas bases se puede concluir que, el color de los extractos de propóleos evaluados en esta investigación, no dependen del origen geográfico, pero, a diferencia del aroma y el sabor, si puede estar dado por la fuente vegetal de la resina y la vegetación circundante a la colmena. Rodríguez y col. (2020), al igual que Lozina y col. (2010), en estudios de propóleos mexicanos y argentinos respectivamente, plantean que características físicas como el color, en este producto apícola, están determinadas por el origen botánico y la flora circundante a los apiarios y que las tonalidades de los extractos etanólicos están relacionadas con el contenido de los compuestos fenólicos y flavonoides (99, 143).

III.2 Caracterización química del propóleo

La composición química y el contenido de compuestos biológicamente activos en los propóleos es muy diversa y depende de varios factores, fundamentalmente del origen geográfico y botánico (89).

La mayoría de sus componentes son solubles en etanol absoluto y en alcohol al 96 %. En Cuba, la mayor forma de comercialización de este producto, es en extractos alcohólicos al 5 % de sólidos solubles. Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente estudio se realizaron los análisis químicos a esta concentración y se emplearon métodos de CCD y CLAR-UV con el objetivo de caracterizar y tipificar químicamente extractos alcohólicos de propóleos cubanos para su empleo como antivirales.

En la figura 6 se muestra la corrida cromatográfica por CCD, de los extractos evaluados (carriles P1, P3, P4 y P6) y de las sustancias de referencias a identificar (carriles P), revelados con luz ultravioleta a $\lambda = 254$ nm (figura 6A) y a $\lambda = 366$ nm (figura 6B). En esta figura se observan tres patrones de comportamiento cromatográfico entre los extractos, que se corresponden con los perfiles en CCD de los tipos de propóleos cubanos hasta el momento identificados (Tipo I, Tipo II, Tipo III). Dicha clasificación se dictó por Campo y col. (2008), quienes analizan 60 muestras de las tres regiones geográficas de Cuba (114). Este grupo de investigación determinó que, generalmente, los propóleos cubanos clasificados como Tipo I resultan ser de color pardo, los Tipo II de color rojo y que los de tonalidad amarilla pertenecen, en su mayoría, a los Tipo III, tal y como se identificó en el presente trabajo (82, 107).

En la tabla 4 se recogen los valores de la relación relativa entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa (R_{fr}) correspondientes a cada banda identificada por CCD en los cromatogramas de los extractos (tabla 4A) y de las sustancias patrones (tabla 4B).

La técnica de CCD, basada en la polaridad de la sustancia químicas, se empleó para un análisis cualitativo de la presencia de compuestos fenólicos en las soluciones alcohólicas, así como para una rápida tipificación de los propóleos evaluados según su composición química. Es de interés la identificación de estos compuestos, debido a que, según la literatura son metabolitos con un gran potencial biológico y los principales determinantes de las propiedades farmacológicas (79, 144, 145), entre ellas las antivirales, que presenta el producto apícola en cuestión (19, 146-148).

Como resultado de la presente investigación, se identificaron, en los extractos de color rojo P1 y P3, cuatro bandas características de los propóleos cubanos Tipo II que revelan un R_{fr} entre 0,58 cm y 0,40 cm, aproximadamente (tabla 4). Además, se

observó en las figuras 6, 7B y 7C, que ambas sustancias mostraron un comportamiento cromatográfico similar, a pesar de la diferencia en el método de muestreo, el origen geográfico y por tanto en la vegetación circundante a los apiarios de recolección. Estos resultados indican que las abejas *Apis mellifera* tienen preferencia por determinadas especies de plantas propolíferas y que ambos propóleos pueden tener igual origen vegetal o al menos provenir de especies vegetales con propiedades quimiotaxonómica similares.

En un estudio realizado por Campo (2007) a siete muestras de propóleos cubanos

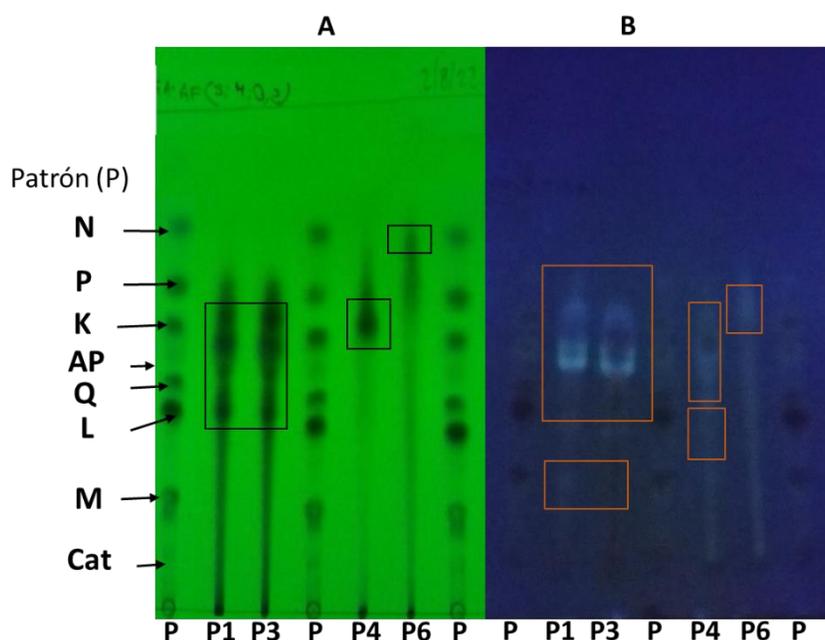


Figura 6 CCD de los extractos alcohólicos de propóleos en estudio (P1; P3; P4; P6); empleando como fase móvil una mezcla de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (5:4:0.2). **A:** revelado con luz ultravioleta (UV) a $\lambda = 254$ nm **B:** revelado con luz UV a $\lambda = 366$ nm. **Patrón de corrida (P):** Nemorosona (N), Pinobanksina (P), Kaempferol (K), Apigenina (AP), Quercetina (Q), Luteolina (L), Miricetina (MR) y Catequina (Cat).

Tipo II, de diferentes regiones del país demuestran que estos tienen su origen a partir de una o de varias especies de una misma familia de plantas. En este estudio demuestran, además, la presencia de isoflavonoides en este tipo de propóleos, y explican que, debido a la limitada distribución de dichos metabolitos en el reino vegetal, el posible origen botánico de los propóleos Tipo II es la familia *Leguminosae*. Esta hipótesis se confirmó con la identificación en las siete muestras de la

retusapurpurina A, sustancia aislada de la especie *Dalbergia ecastophyllum* perteneciente a la familia *Leguminosae*. También plantean que dicho compuesto es el responsable de la coloración roja en este tipo de bálsamo (5).

Por su parte en el extracto alcohólico pardo P6, se observó la presencia de una banda de igual Rfr que el patrón de Nemorosona (figura 6A), componente fundamental en la caracterización de los extractos de propóleos cubanos Tipo I, lo que permitió su incorporación dentro de este grupo. Resultados similares fueron obtenidos por Cuesta y col. (2001 y 2002), en exploraciones químicas realizadas a propóleos cubanos con diversas tonalidades de marrón y procedentes de diferentes regiones del Cuba, donde demostraron la presencia de dicha benzofenona, como compuesto mayoritario (101, 149).

Tabla 4 Distancia de corrida correspondientes a las bandas identificadas en los cromatogramas mostrados en la figura 6 de los extractos alcohólicos en estudio (A) y los patrones empleados (B)

Compuestos (Rfr cm)	A				B	
	P1	P3	P4	P6	Patrón	Rfr (cm)
1 (0,33)	+	+			Catequina (Cat)	0,10
2 (0,40)	+	+			Miricetina (MR)	0,16
3 (0,40)			+		Luteolina (L)	0,39
4 (0,43)	+	+			Quercetina (Q)	0,43
5 (0,48)	+	+			Apigenina (AP)	0,48
6 (0,55)	+	+			Kaempferol (K)	0,55
7 (0,56)			+		Pinobaksina (P)	0,62
8 (0,58)	+	+			Nemorosona (N)	0,73
9 (0,60)			+			
10 (0,64)				+		
11 (0,65)	+	+				
12 (0,73)				+		

+ Presencia del componente en el extracto alcohólico

Asimismo, se clasificó al extracto P4 como propóleos Tipo III, caracterizado, fundamentalmente, por la presencia de triterpenos (metabolitos de baja polaridad)

como compuestos mayoritarios. Estas características químicas también se observaron en propóleos colombianos (150, 151) y nigerianos (152).

Aparte de la tipificación de los extractos, este método cromatográfico permitió la identificación de bandas con iguales R_f al de las sustancias de referencia que componen al patrón aplicado en la corrida. En la tabla 4 se observa, que los propóleos P1 y P3 presentaron bandas con similar distancia de corrida que la de los patrones de Kaempferol, Apigenina, Quercetina y Luteolina, lo que es indicativo de la posible presencia de estos compuestos en dichos extractos. Además, en el carril correspondiente al extracto P4 se observaron dos bandas con R_f cercanos a los de los patrones de Luteolina y Kaempferol y a las manchas mostradas por los extractos ya clasificados como Tipo II, sin embargo, el color emitido por estas al ser reveladas con luz UV de $\lambda = 366$ nm (figura 6B), no es congruente con lo observado en las sustancias de referencia y en los extractos P1 y P3.

Los resultados de la presente investigación se corroboraron mediante CLAR-UV, ya que es una técnica más versátil, confiable y resolutive, y en este estudio, se basa en la hidrofobicidad de las sustancias químicas a identificar. Este método se realizó para confirmar la presencia de algunos de los compuestos identificados por CCD, al comparar con patrones comerciales corridos bajo las mismas condiciones que los extractos, como se observa en la figura 7, en la cual se muestran cinco cromatogramas correspondientes a los patrones de interés y a los extractos alcohólicos P1, P3, P4 y P6 respectivamente, y una tabla con los tiempos de retención manifestado por cada sustancia de referencia a identificar.

En el análisis por CLAR-UV (figura 7), se observó que ambos productos mostraron picos de absorbancia en el mismo tiempo de retención que las sustancias de referencias K, AP y Q (figura 7F) lo que ratifica su posible presencia en estos productos apícolas. Asimismo, no se observaron picos de absorbancia en la CLAR-UV realizada a la muestra P4 (figura 7D) que coincidieran con el tiempo de retención mostrado por L y K. Esto puede significar la presencia en el extracto P4 de componentes con igual polaridad, pero características estructurales e hidrofobicidad diferente a los ya identificados en P1 y P3.

La existencia de estos metabolitos, a excepción de la quercetina, en propóleos cubanos no está reportada hasta el momento, pero si resultan investigaciones que demuestran la presencia de flavonoides e isoflavonoides en los propóleos de diferentes regiones del país (101). Además, a pesar del alto por ciento de plantas endémicas cubanas, Cuba presenta una vegetación característica de las regiones tropicales, lo que sugiere una similitud, en cuanto a composición, entre los propóleos

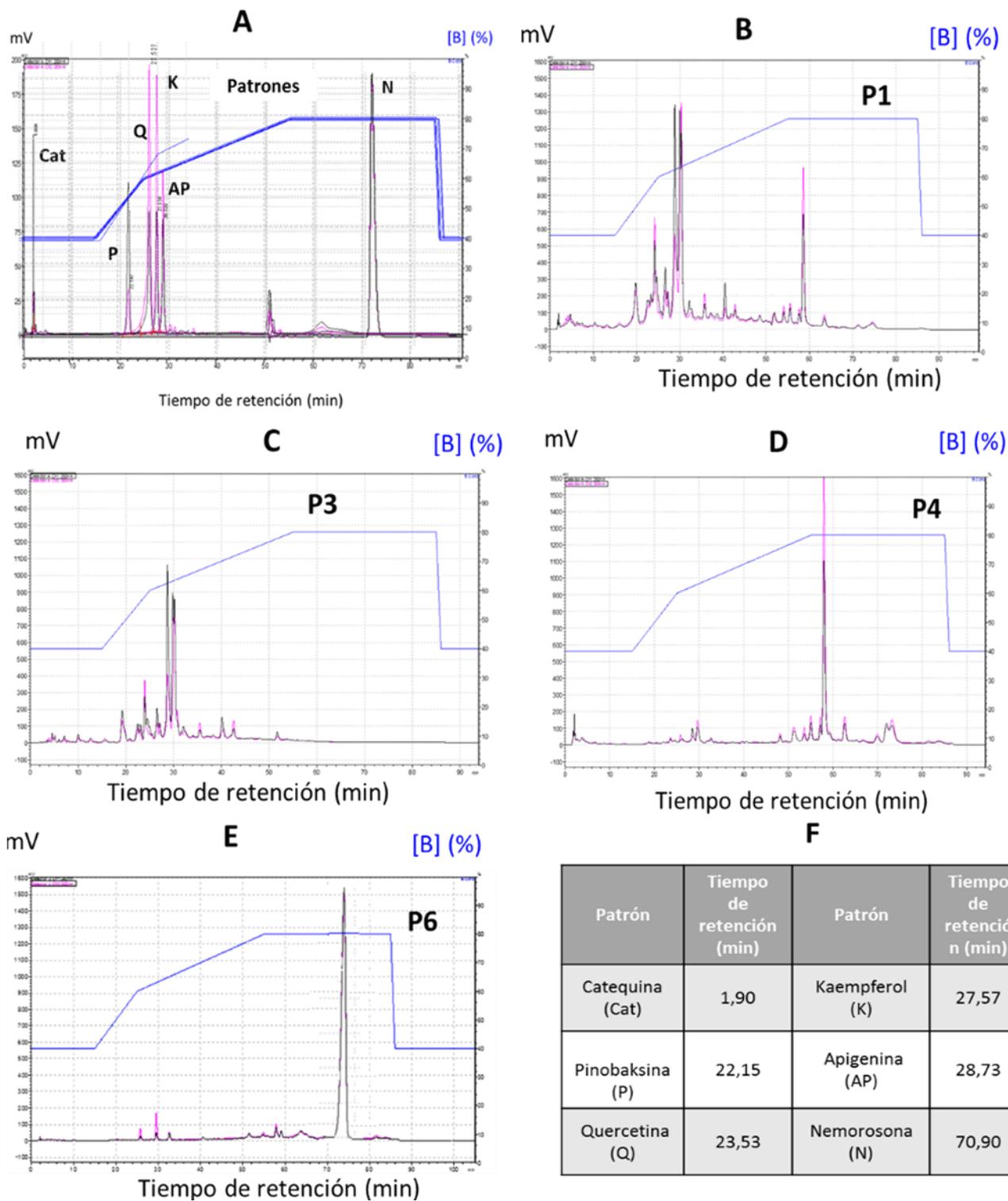


Figura 7 CLAR-UV de los patrones de interés (A), y los extractos alcohólicos de propóleos a analizar P1 (B), P3 (C), P4 (D), P6 (E), leído con luz UV a $\lambda=280$ nm, y $\lambda=265$ nm. F corresponde al tiempo de retención de cada patrón.

cubanos y propóleos procedentes de países con vegetación semejante, en los que se ha reportado la presencia de dichos compuestos. Adicionalmente, otros ensayos demuestran que el posible origen botánico de los propóleos rojos cubanos son especies de la familia Leguminosae como *Dalbergia ecastophyllum*, planta con distribución en zonas tropicales de América Central y Sudamérica, África, Madagascar y sur de Asia. Otros estudios demuestran la presencia del kaempferol, y otros fenoles como la catequina y la naringina en propóleos brasileños (153). También, se reportó que propóleos colombianos contienen flavonoides como quercetina, pinocembrina, apigenina, kaempferol, y galangina además de ácidos carboxílicos aromáticos (96).

Asimismo, al comparar los cromatogramas correspondientes a los extractos P1 y P3 (figura 7B y 7C), se observó una similitud en el comportamiento de estos hasta un tiempo de retención igual a 40 min, a partir del cual se mayor variabilidad de metabolitos en el caso de P1. Estos resultados pueden deberse a que, las fuentes naturales de donde las abejas recolectaron los exudados, para ambos extractos, sean de diferentes especies dentro de una misma familia de plantas o de una misma especie, que al desarrollarse en diferentes zonas geográficas (Matanzas y Mayabeque) y en condiciones climáticas diferentes, presenten variaciones cualitativas y cuantitativas en su composición química.

Por otra parte, en la figura 7E se puede apreciar una total correspondencia con los resultados obtenidos en la CCD (figura 6, carril P6), ya que se muestra como metabolito mayoritario en el extracto P6 un compuesto de igual hidrofobicidad que la Nemorosona patrón. Iguales hallazgos se encontraron en otros estudios de propóleos cubanos de color pardo clasificados también como propóleos Tipo I, además se conoce que el origen botánico de estos propóleos es, fundamentalmente, la especie vegetal *Clusia rosea*, planta con un alto contenido de Nemorosona (5, 101, 107, 149). Asimismo, se reportaron otras benzofenonas preniladas en extractos de propóleos cubanos con esta clasificación denominadas como propolona B, C y D (154). Similares características se reportaron en propóleos brasileños (155), ecuatorianos (156) y venezolanos (106).

Posterior al análisis cromatográficos, se determinó cuantitativamente el contenido de fenoles, de flavonoides y de ceras presentes en la fracción alcohólica de los propóleos evaluados en el presente estudio. Los resultados obtenidos en estos experimentos se recogen en la tabla 5 donde cada valor corresponde a la media de tres experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar. En esta tabla también se muestran los límites estipulados por la Norma IRAM-INTA 15935-2 "Productos del NOA (noroeste argentino) Propóleos Parte 2 – Extractos de propóleos ", para cada

parámetro señalado, observándose que todos los extractos analizados se encuentran dentro de los estándares de calidad química establecidos para los extractos propóleos.

Además, en la tabla 5, se puede observar que los propóleos Tipo II (P1 y P3), en este

Tabla 5 Contenido de fenoles totales, flavonoides totales y sustancias extraíbles en n-Hexano en los extractos alcohólicos de propóleos evaluados.

Extracto	Fenoles totales (mg AG/ml)	Flavonoides totales (μg Q/ml)	% Sustancias extraíbles en n-Hexano (ceras)
P1 (Tipo II)	10.69 ± 1.31^b	4.43 ± 0.005^b	1,19
P3 (Tipo II)	29.11 ± 1.89^a	12.66 ± 0.29^a	0,82
P4 (Tipo III)	8.79 ± 1.31^c	3.81 ± 0.005^c	1,45
P6 (Tipo I)	$2,99 \pm 0,51^d$	$2,53 \pm 0.19^d$	1,8
IRAM-INTA 15935-2	Mínimo 2,50	Mínimo 2,50	Máximo 2

ensayo, contienen una mayor concentración de fenoles y flavonoides que los extractos catalogados como Tipo I (P6) y Tipo III (P4), lo cual concuerda con el análisis cromatográfico anteriormente desarrollado (figura 6 y 7). Estos resultados coinciden con los reportados por Cuesta-Rubio y col. (2007), donde al analizar 65 muestras de propóleos cubanos demostraron que en Cuba los propóleos con mayor contenido fenólico son los de color rojo clasificado en su mayoría como propóleos Tipo II. Asimismo, estos investigadores identificaron que los propóleos cubanos con tonalidad amarilla están representado fundamentalmente por compuestos alifáticos (triterpenos y sequiterpenos) (107); composición química similar a la de propóleos mexicanos producidos por *Apis mellifera* (157). Por otra parte, Núñez y col. (2018), observaron, aunque en una mayor concentración, la presencia de fenoles y flavonoides en propóleos recolectados por raspado en la ciudad chilena Mulchén.

Además, se identifica (tabla 5) que los propóleos Tipo II analizados en este estudio presentan diferencias significativas entre sí, en el contenido de fenoles y flavonoides, siendo P3 el de mayor concentración en ambos grupos químicos (29,11 mg/ml y 12,66

µg/ml respectivamente), a pesar de mostrar una menor variabilidad en el análisis cromatográfico por CLAR-UV (figura 7B y 7C). Asimismo, se observa que, P1 presenta un porcentaje de ceras relativamente mayor al de P3. Estos resultados pueden estar dados, entre otros aspectos, por la diferencia en la forma de recolección de los propóleos materia prima, ya que mediante el método de raspado esta se obtiene con un mayor contenido de impurezas y ceras, lo que implica la obtención de un extracto con menor calidad química que los obtenidos a partir de materias primas recolectadas por el método de mallas.

De igual manera, con el análisis de correlación se determinó que entre el contenido de fenoles y el de flavonoides totales (figura 8A) existe una correlación positiva de un 99 %, mientras que entre el porcentaje de sustancias extraíbles en N-hexano presente en los extractos y el total de fenoles (figura 8B) existe una correlación negativa de un 93 %. Esto indica que el incremento en la concentración de flavonoides, así como, la disminución en el porcentaje de ceras observada en esta investigación, se asocia con un aumento de la concentración de fenoles totales.

Al comparar resultados con lo reportado en la literatura se puede observar que tanto el contenido fenólico como el de flavonoides en los extractos evaluados es mayor que el de propóleos colombianos (93, 158), mexicanos (157), ecuatorianos (159), argentinos (88, 92) y chilenos (160) con elevado potencial biológico. Asimismo, Angulo (2014) obtuvo que propóleos ecuatorianos, con menor concentración de flavonoides que P6 (el más alto con 197 mg/100g), poseen un elevado potencial biológico en cuanto a capacidad antioxidante y antimicrobiana (86). También, se ha declarado que los propóleos de zonas tropicales contienen flavonoides análogos a las muestras europeas, pero a partir de plantas diferentes (161). Estos datos favorecen a la hipótesis de que los propóleos cubanos presentan propiedades terapéuticas similares o mayores a otros propóleos estudiados.

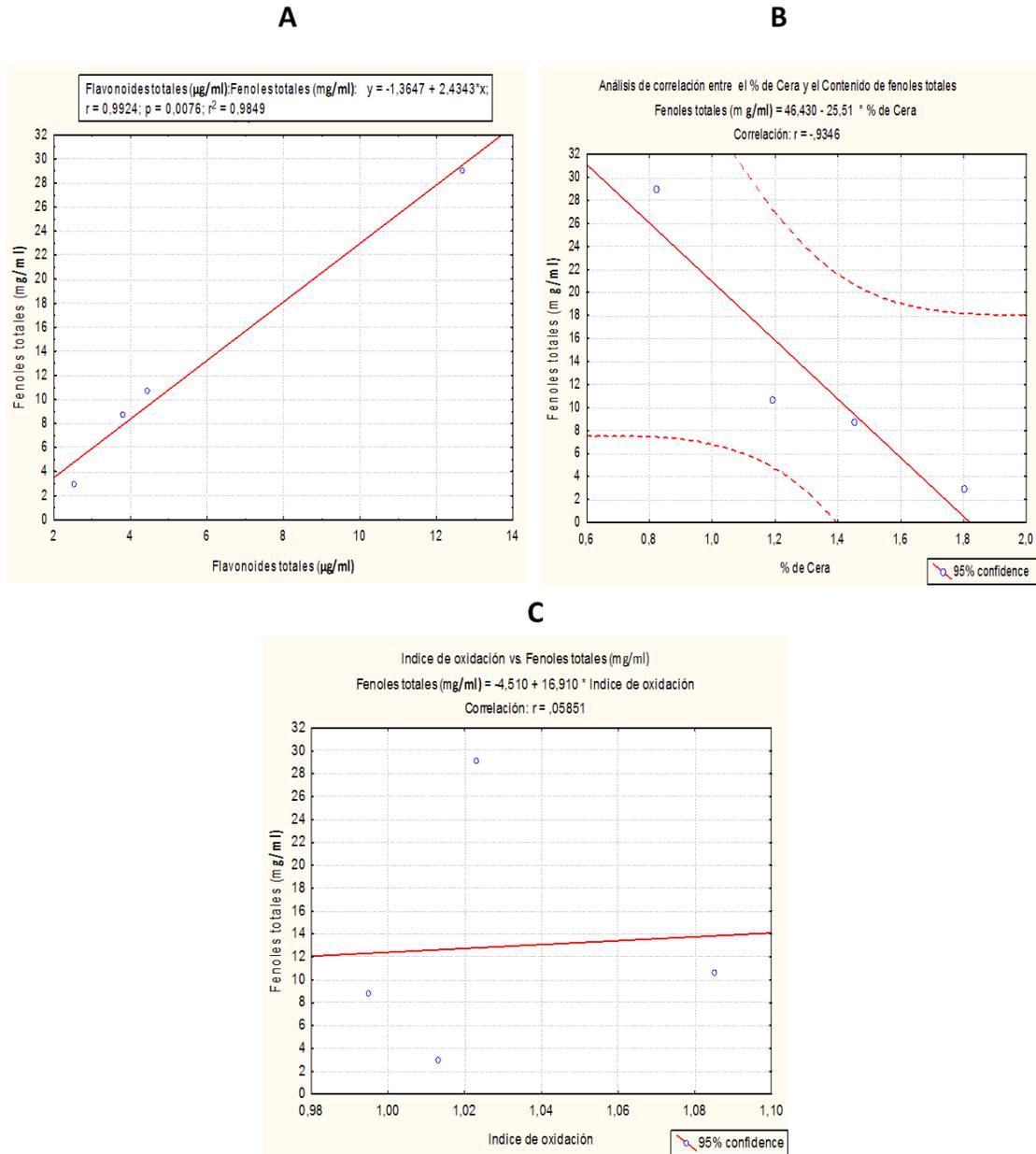


Figura 8. Análisis de correlación entre los parámetros químicos determinados para cada extracto alcohólico de propóleos al 5 %. **A:** Contenido de fenoles totales y el de flavonoides; **B:** Contenido de fenoles totales y el porcentaje de ceras; **C:** Contenido de fenoles totales y el índice de oxidación.

El análisis químico realizado en este trabajo resultó una herramienta útil para definir la posible actividad biológica de los extractos evaluados. La relación existente entre

los compuestos fenólicos y flavonoides y el potencial biológico de los propóleos, así como, la presencia de estos metabolitos en los extractos analizados en el presente estudio, indican que, los mismos pueden tener propiedades terapéuticas similares a la de otros propóleos (cubanos y de otros países) con actividades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, cicatrizantes, y antiinflamatorias.

III.3 Capacidad antioxidante de los extractos

La capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos evaluados se determinó mediante el método de la vitamina C y el método del índice de oxidación (IO), siendo este, además, un indicador de calidad de los extractos de propóleos.

Tabla 6. Capacidad antioxidante de los extractos determinada por el método del índice de oxidación y el método de vitamina C

No. Extracto	Método del Índice de oxidación (s)	Método de Vitamina C (VC) (mg/ml)
P1 (Tipo II)	1,09	5,19 ± 0,15 ^b
P3 (Tipo II)	1,02	9,47 ± 0,12 ^a
P4 (Tipo III)	0,99	2,87 ± 0,05 ^c
P6 (Tipo I)	1,01	5,07 ± 0,54 ^b
IRAM-INTA 15935-2	Máximo 22,00	(-)

(-): no especificado

En la tabla 6 se observó que todos los extractos mostraron índices de oxidación aproximados a un segundo, valor inferior al límite establecido en la norma argentina IRAM-INTA 15935-2 "Productos del NOA (noroeste argentino) Propóleos Parte 2 – Extractos de propóleos " (22 s máximo), lo que avala la calidad de los propóleos cubanos P1, P3, P4 y P6 e indica la presencia de grupos funcionales oxidables con elevada capacidad antioxidante. Además, en la figura 8C se observa que la correlación existente entre el contenido de fenoles y el índice de oxidación es de un 5,8 % lo que revela que no se puede predecir la actividad antioxidante, indicada por el IO de estos extractos, conociendo, únicamente, el contenido fenólico de los mismos, pues puede estar dada, además, por otros grupos o compuestos reactivos con igual o mayor fuerza antioxidante.

Asimismo, Guanche (2022), demostró que extractos acuosos y alcohólicos de propóleos cubanos con diferencias significativas en el contenido de fenoles y flavonoides, presentan valores semejantes de IO, también de aproximadamente un segundo (162). De igual forma Bankova (2000), plantea que, en países tropicales, el contenido de flavonoides no es el factor determinante de una mejor calidad y actividad biológica (163).

Por otra parte, la técnica de Vitamina C, en contradicción con lo obtenido por el método de IO, mostró diferencias significativas entre la capacidad antioxidante desarrollada por los extractos evaluados. El bálsamo de mayor actividad fue P3 (tabla 6) con un potencial equivalente a 9,47 mg/ml de Vitamina C, lo que se corresponde con un elevado contenido de fenoles y flavonoides. Además, se puede observar que, entre los extractos Tipo II analizados en la presente investigación, a una mayor concentración de grupos fenólicos se observó un mayor potencial antioxidante. Esto permite explicar que, para este tipo de propóleos, los agentes reductores pueden ser los compuestos fenólicos y los flavonoides. Dichos compuestos poseen propiedades antioxidantes que, minimizan la peroxidación lipídica, actúan como quelantes de los metales redox- activos, evitando el efecto de los radicales libres (86, 164). Asimismo, Quiñones (2012) y Vargas (2014) demostraron que compuestos como la catequina y la quercetina, por el grupo fenólico presente en su estructura, tienen una elevada capacidad para neutralizar radicales libres y evitar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (165, 166).

En el presente trabajo, se demostró (tabla 6) que, a pesar de la diferencia en la variabilidad (figura 7) y concentración de polifenoles y en la clasificación química entre los extractos Tipo I y Tipo II (tabla 5), el extracto P6 (Tipo I) mostró una actividad antioxidante, equivalente a la vitamina C, similar a la de P1 (Tipo II). Esto puede sugerir que, el extracto de color pardo estudiado presenta otros compuestos, distintos a los fenoles, capaces de estabilizar radicales libres, o que la presencia de determinados fenoles en el bálsamo es suficiente para desarrollar igual actividad que P1.

La literatura reporta que la actividad antioxidante no siempre está relacionada con la concentración de grupos fenólicos, sino que se deben, fundamentalmente, a la posición los grupos hidroxilos fenólicos en los anillos A y B y, en menor medida, a la acción de ácidos grasos insaturados provenientes de las abejas (136, 165, 167).

La elevada capacidad antioxidante que mostraron todos los extractos evaluados en esta investigación, inducen un posible empleo de los mismos como estrategia factible en el tratamiento de enfermedades virales (168). Dicho planteamiento se basa en que,

los virus de ARN, inducen estrés oxidativo en las células como mecanismo para la expresión de la maquinaria biosintética que emplean para su replicación (169, 170). Además, se conoce que este estrés oxidativo se desarrolla en el organismo como respuesta a la alteración en la homeostasis provocada por una infección viral (171).

III.4 Actividad biológica de los extractos de propóleos

Para el análisis de citotoxicidad y la determinación de la actividad antiviral se seleccionaron los extractos P3 y P6 por constituir los más comunes en el país y los más empleados en la industria farmacéutica. Esta selección también se basó en que ambos propóleos son representativos de dos regiones del país (occidente y oriente respectivamente) y porque entre todos los extractos P3 mostró la mayor actividad antioxidante y las mejores características químicas.

III.4.1 Ensayo de citotoxicidad

En la figura 10 se muestra el comportamiento de la viabilidad de la línea celular C6/36-HT al enfrentarse a concentraciones crecientes de los extractos P3 y P6, a partir de un análisis de regresión lineal de la curva dosis-respuesta realizado para 2 experimentos (6 pocillos por cada concentración) del ensayo colorimétrico del MTT descrito por Mosmann (1983). Mediante esta técnica la cuantificación de la viabilidad celular se realiza de manera indirecta, ya que se basa en la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales para, en células viables, reducir el MTT, de color amarillo a formazán de color púrpura. Además, este ensayo permite poner fin a la disyuntiva de si la acción inhibitoria de la multiplicación del virus se debe a un efecto sobre el ciclo de replicación viral o a la destrucción de las células hospederas.

En el presente trabajo se observó que, para ambos extractos, a concentraciones por debajo de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la viabilidad celular resultó en más de un 85 %. Este valor disminuyó a partir de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figura 10), concentración a la cual empezaron a percibirse cambios en la morfología celular al observarse al microscopio. Además, el tratamiento con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ambos extractos redujo considerablemente la viabilidad celular (figura 10) hasta un 28,8 % para P6 y un 7,9 % para P3. Asimismo, se determinó, que la concentración citotóxica media (CC_{50}) para el extracto P3 es de 222,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para P6 es de 315 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos datos señalan que P3 resulta más tóxico para las células C6/36-HT que el extracto de color pardo, lo cual puede deberse a que, el mismo presenta una mayor variabilidad de componentes (figura 7C y 7D) y a que dentro de estos metabolitos existan algunos capaces de inducir una mayor toxicidad en dicha línea celular. Estos resultados son similares a los obtenidos por Giral (1997), estudio en el cual a pesar de que la investigadora

emplea un extracto acuoso de propóleos rojo cubano, se observa que este provoca efectos nocivos en líneas celulares Vero y BHK-21 a partir de 300 $\mu\text{g/ml}$ y 400 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (39). Sin embargo, difieren de los alcanzados por Amoros y col. (1992) ya que señalaron que propóleos franceses, con igual método de obtención que el realizado en el presente estudio, mostraron una citotoxicidad media de 72 $\mu\text{g/ml}$ en células Vero (12). Por otra parte, Demir y col. (2020) demostraron que propóleos italianos extraídos con etanol, a concentraciones por debajo de 200 $\mu\text{g/ml}$, en células HaCaT, no provocaron efectos citotóxicos, y la CC_{50} fue de 375 $\mu\text{g/mL}$, valor superior al obtenido en este estudio para células C6/36-HT.

También investigaciones realizadas con propóleos cubanos de color pardo resaltan la citotoxicidad de este tipo de bálsamo apícola en células cancerígenas (172, 173).

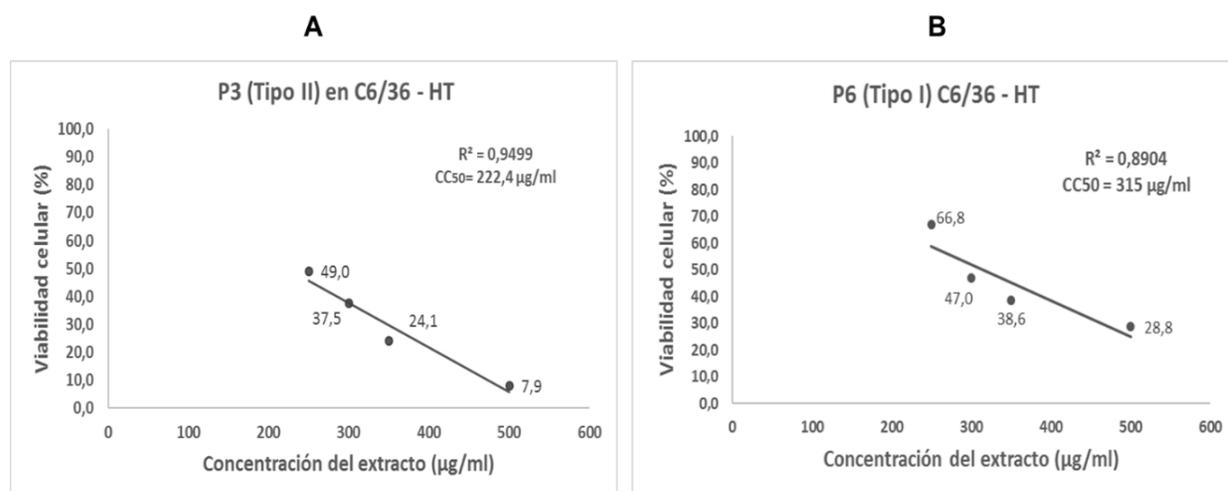


Figura 10 Viabilidad de las células C6/36HT frente a concentraciones crecientes de los extractos alcohólicos de propóleos P3 (**A**) y P6 (**B**), determinada mediante el método del MTT a los cinco días de incubación. Cada punto corresponde a la media de dos experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar.

Además, la toxicidad celular mostrada por el extracto P6 se puede asociar a la presencia, en este, de compuestos como la Nemorosona, ya que la literatura reporta que dicho metabolito constituye un potente desacoplador protonofórico mitocondrial (174), capacidad que explica el efecto citotóxico y anticancerígeno de dicha benzofenona (175). De igual manera se reporta que otras benzofenonas polipreniladas presentes en propóleos pardos cubanos, como la gutiferona, y la clusianona, un isómero de posición de la Nemorosona, contribuyen a la acción citotóxica/antiproliferativa de producto apícola (176, 177).

III.4.2 Ensayo de pesquisa primaria de actividad antiviral

En la actualidad el VDEN constituye un problema de salud y es uno de los arbovirus más extendidos a nivel mundial, sin embargo, no existe un tratamiento eficaz que controle o prevenga la enfermedad que causa. Por ello son varios los estudios que desarrollan nuevas estrategias con el fin de encontrar antivirales frente al VDEN a partir de productos naturales, incluidos compuestos puros, fracciones y extractos crudos aislados de diferentes tipos de plantas. Dicha actividad, para cualquier producto, puede ser medida de manera directa o indirecta, mediante la evaluación de la capacidad para proteger a las células del daño inducido por el virus o de su efecto inhibitorio sobre la productividad vírica.

En el presente estudio se determinó, de forma preliminar, la actividad antiviral de dos extractos de propóleos cubanos procedentes de las provincias de Mayabeque y Holguín (P3 y P6 respectivamente), mediante el método de reducción del número de placas, con el fin de conocer la capacidad de los mismos para disminuir la productividad vírica del VDEN 2. En este ensayo se trabajó con concentraciones de extractos por debajo de 200 µg/ml, ya que a partir de la misma fue que se observó más de un 85 % de viabilidad celular, según el ensayo colorimétrico de MTT, para la línea celular C6/36-HT, en ambos casos.

En la tabla 7 se recogen los porcentos de inhibición de la productividad viral mostrado por los extractos en cada concentración evaluada, según el total de unidades formadoras de placa en cada pocillo y se comparan con la clasificación y el origen de los mismos. En esta se observa que ambos extractos provocan una inhibición de la productividad del virus dengue 2 a partir de 160 µg/ml, a pesar de constituir propóleos de diferente origen geográfico y clasificación y de que existir una diferencia de más de 26 mg/ml en el total de fenoles entre los extractos (tabla 5) siendo P6 el de menor concentración de estos metabolitos y mayor porcentaje de inhibición a esta concentración.

Estos resultados establecen que la actividad antiviral frente al virus dengue, mostrada por los extractos evaluados en este estudio, no está dada por el total de fenoles en sí, sino por la presencia o no de determinados compuestos con potencial antiviral que no tiene que ser necesariamente polifenoles. Además, la literatura reporta que, dicha propiedad biológica se asocia con la presencia y la acción de fenoles, triterpenos y otros metabolitos secundarios, y no con su concentración. También, se conoce que en los propóleos la capacidad terapéutica está dada por el efecto sinérgico de sus componentes (14, 19).

Tabla 7. Capacidad antiviral de los extractos P3 y P6 dada por la reducción de la productividad vírica determinada por el método de reducción del número de placas

Extracto (Clasificación, Procedencia)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% de Inhibición
Extracto alcohólico P3 (Tipo II (rojo), Mayabeque)	200	100
	180	100
	160	66
	140	0
	120	0
	100	0
Extracto alcohólico P6 (Tipo I (pardo), Holguín)	200	100
	180	100
	160	100
	140	0
	120	0
	100	0

Asimismo, se puede alegar que la actividad del extracto P3 puede estar dada por la presencia, en este, de fenoles como el kaempferol, la apigenina, la quercetina y la luteolina y en el caso del extracto P6 puede estar dado por la nemorosona u otras benzofenonas. Loaiza y col. (2021), reportan la existencia de aproximadamente 20 compuestos fenólicos con actividad anti-dengue con varios mecanismos de acción que van desde una acción sobre el ciclo replicativo hasta una actividad directa contra el virus y las proteínas virales (178, 179). Además, se conoce que la quercetina, posee actividad antiviral frente a VDEN 2 con un índice de selección de 11,8 en la línea celular humana Huh 7 (180), y que en las células Vero, bloquea los cambios conformacionales en el desarrollo de las proteínas virales (23). También, Kwon y col. (2020), demostraron que propóleos brasileños tienen efecto antiviral frente a rinovirus humanos, y que esta acción se debe, además de la crisina, al kaempferol, la quercetina, y la Luteolina presentes en los mismos; dichos compuestos mostraron una actividad antiviral mayor que la ribavirina (181). González y col. (2018), en un estudio sobre la actividad anti-virus del moquillo canino realizado con propóleos mexicano y flavonoides comerciales demostraron la capacidad de antiviral del producto apícola y de la quercetina, no siendo así para la pinocembrina y la naringerina (19).

El efecto antiviral de la quercetina, también lo demuestran Schnitzler y col. (2010), ya que plantean que, dicho metabolito secundario unido a glicoproteínas bloquea la

interacción virus-célula, e inhibe la fase intracelular del ciclo de replicación viral al bloquear a la polimerasa de los virus y por lo tanto interfieren con la síntesis de ácido nucleico viral (25).

Otras investigaciones plantean que benzofenona preniladas, como la clusianona, 7-epiclusianona, 18,19-dihidroxiclusianona, nemorosona y propolona A, muestran actividad antiviral frente al virus de inmunodeficiencia humana (VIH), lo que permite asociar que, la acción antiviral del extracto P6 evaluado en la presente investigación puede estar dado por estos compuestos (182).

En cuanto a la acción antiviral de extractos alcohólicos de propóleos contra el VDENV, no ha sido reportada hasta el momento, sin embargo, si existen estudios que demuestran dicha actividad biológica, en extractos acuosos de este producto apícola. Soroy y col. (2014), señalan que en 63 pacientes con dengue hemorrágico, el consumo de dos capsulas de 200 mg de Propoelix™ (extracto de propóleos acuoso) en tres dosis diarias durante siete días acelera la mejora en los recuentos de plaquetas y los niveles de TNF- α y acorta la duración de la hospitalización (38). La acción antiviral de extractos acuosos de propóleos rojos cubanos también fue demostrada por Giral (1997), es este caso se trataba de un extracto de origen pinareño que redujo el título viral en 2 log a una concentración de 250 μ g/ml (39) y mostró una acción virucida a 150 μ g/ml. Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación, a pesar de tratarse de un extracto alcohólico de origen geográfico diferente, lo que puede estar dado por la presencia en la fracción soluble en agua de los mismos compuestos u otros con igual potencial biológico que la fracción soluble en etanol, sin embargo varios estudios plantean que la extracción acuosa de los propóleos permite extraer solo entre el dos y el cuatro por ciento de los componentes biológicamente activos de este producto. Se conoce además que el kaempferol es un flavonoide altamente soluble en agua y soluble en etanol caliente (40, 104, 162).

Por otra parte, los mecanismos de acción por los cuales los extractos evaluados desarrollan el efecto antiviral no fueron identificados en el presente estudio, pero, según lo reportado por la literatura, esta capacidad puede estar asociada con una acción directa o indirecta sobre el virus dengue 2. Huleihel y Isanu (2002) reportan que los propóleos tienen un efecto antiviral profiláctico sobre el VHS Tipo I, al evaluar mediante la ausencia de efecto citopático una concentración de 50 mg/ml dos horas antes de la infección y obtener una protección total (100 %) (183). Asimismo, este grupo de trabajo, mediante microscopia electrónica, demuestra que el efecto antiviral de los propóleos está dada por una acción directa sobre los herpesvirus evitando la adhesión de estos a las células (184). Además, Carvalho (2013) plantea que los

flavonoides y otros ácidos fenólicos, presentes en los bálsamos apícolas, son los responsables de la acción antiviral en etapas tempranas de la infección ya que forman complejos inestables con las proteínas del virus afectando las etapas de adsorción y penetración a la célula. Este investigador también plantea que dichos metabolitos provocan una inhibición de la polimerasa viral y con ello una interferencia en la síntesis del genoma del virus (185).

En otro estudio, realizado también mediante microscopia electrónica sobre la actividad anti-pseudorrabia, se observa la formación de una barrera que impide la penetración de los virus a la célula huésped y una alteración en la estructura del virus, lo cual afecta la penetración y el ciclo replicativo de este (186).

Igualmente, diversos trabajos demuestran que el propóleo regula la inmunidad específica e inespecífica, tanto celular (linfocitos T) como humoral (linfocitos B) (148, 187, 188) y estimula la actividad de los macrófagos a casi el doble (189, 190), lo que aumenta la capacidad de esta sustancia para eliminar el virus (10, 191).

Estos datos demuestran que los propóleos cubanos presentan igual o mayor actividad antiviral que propóleos de otros orígenes geográficos, así como también permiten asociar dicha propiedad terapéutica con su composición química.

CONCLUSIONES

- Los propóleos cubanos Tipo II presentan flavonoides en su composición con potencial antiviral.
- La capacidad antioxidante de los extractos evaluados es independiente de la concentración de fenoles y flavonoides.
- La diferencia detectada en la citotoxicidad de la línea celular C6/36-HT está dada por la variabilidad de los componentes presentes en los extractos evaluados.
- La actividad antiviral de los extractos alcohólicos de propóleos cubanos evaluados es independiente de su origen geográfico y de la concentración de metabolitos secundarios.

RECOMENDACIONES

- Confirmar la presencia de los metabolitos identificados en los propóleos evaluados mediante tecnologías más avanzadas.
- Evaluar la actividad antiviral de los cuatro extractos estudiados frente al virus dengue-2 con el empleo de otros métodos biológicos “*in vitro*” e “*in vivo*”.
- Emplear otros tipos de extractos de los propóleos evaluados y comparar resultados con los obtenidos en el presente estudio.
- Determinar la actividad antiviral de compuestos identificados en los extractos evaluados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chang L, Martino M, Rodríguez JL, Fajardo M. Aplicación del extracto hidroalcohólico de propóleos rojo cubano en el desarrollo de una biopelícula activa. 2010;79-87.
2. Vargas RD, Torrescano GR, Sánchez A. El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*. 2013;38(10):705-7.
3. Bucio C, Navarro F, Martínez O, Torres J. Efecto sobre hongos fitopatógenos de un extracto acuoso de propoleo obtenido de las abejas domésticas. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2016;1(2):107-10.
4. Macías AM, Yunda EF. Aplicación de extractos de propóleos como agente conservante en carne de res molida que expenden en el mercado de Sauces IV de la ciudad de Guayaquil. [Tesis de Licenciatura]: Universidad de Guayaquil; 2015.
5. Campo M. Estudio Químico de Propóleos Rojos Cubanos. [Tesis Doctoral]: Universidad de la Habana; 2007.
6. Szliszka E, Krol W. Polyphenols Isolated from Propolis Augment TRAIL-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;10.
7. Barros M, Lemos M, Maistro E, Leite M, Sousa J, Bastos J. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal Ethnopharmacol* 2008;3(120): 372-7.
8. Hashemi J. Biological Effect of Bee Propolis: A Review. *European Journal of Applied Sciences* 2016;8(5):311-8.
9. Núñez RD, Balboa PN, Alvear ZM, Ceron A, Abarzua SK, Vasconcellos CA. Evaluación de la Actividad Anti-inflamatoria de Propóleos Chileno sobre Cortes Histológicos de Orejas de Ratón. *Int J Morphol*. 2018;36(1):189-93.
10. Sforcin J. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;113:1-14.
11. Santos S, da Silva G, Depieri AH, Menegazzo M, Felipe I, Tardeli de Jesus CG, et al. Brazilian Propolis Antileishmanial and Immunomodulatory Effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;7.
12. Amoros M, Sauvager F, Girre L, Cormier M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*. 1992;23(3):10.

13. Ramos F. Características físico-químicas y capacidad antioxidante de los propóleos del Estado de Guanajuato. 2016.
14. Sforcin J. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Research*. 2016;30:894-905
15. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013:11.
16. Ecsanu V, Prahoveanu E, Cricsan I, Cioca A. The effect of aqueous propolis extract on experimental influenza virus infection in mice. *Virologie*. 1981(32):213-5.
17. Kosalec I, Pepelnjak S, Bakmaz M, Wladimir-Knezevic V. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta pharmacologica Sinica*. 2005(55):423-30.
18. Oliveira AC, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TIE. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz (Brazil)*. 2006;101:493-7.
19. González M, González FR, García CG, Liborio Carrillo L, Soto CI, Canales M, et al. Comparison between In Vitro Antiviral Effect of Mexican Propolis and Three Commercial Flavonoids against Canine Distemper Virus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;2018:9.
20. Peña R. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e Investigación Agraria*. 2008;35(1):17-26.
21. Low J, Wu K, Chen K, Ng M. Narasin, a novel antiviral compound that blocks dengue virus protein expression. *Antivir Ther*. 2011(16):1203-18.
22. Leontang A, Rhun Y. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012(12).
23. Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, Abubakar S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Viol J*. 2011(8):560.
24. Abd Kadir S, Yaakob H, Mohamed Z. Potential anti dengue medicinal plants: a review. *Nat Med*. 2013;67(4):677-89.
25. Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research*. 2010;24(1):9.

26. Ripari N, Alves A, da Silva M, Lopes F, Ingrid K, K.; B, et al. Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2021;73(3):19.
27. Búfalo MC, Figueiredo AS, de Sousa J, Candeias J, Bastos JK, Sforcin JM. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2009(107):1669-80.
28. Vynograd N, Vynograd I, Sosnowski Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*. 2000(7):1-6.
29. Shimizu T, Takeshita Y, Takamori Y. Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of Antitherpetic efficacies. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011:61-96.
30. Yildirim A, Duran GG, Duran N, Jenedi K, Bolgul BS, Miraloglu M, et al. Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Med Sci Monit* 2016;22:422-30.
31. Simoni IC, Aguiar B, de Araujo AM. In vitro antiviral activity of propolis and *Baccharis* sp. extracts on animal herpesviruses. *Arq Inst Biol*. 2018(85):1-7.
32. Gekker G, Hu S, Spivak M, Lokensgard JR, Peterson PK. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;102:158-63.
33. Ito J, Chang FR, Wang HK. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *J Nat Prod* 64: 1278–1281. 2001(64):1278-81.
34. Serkedjieva J, Manolova N, Bankova V. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acid). *Journal of Natural Products*. 1992;55(3):9.
35. Shimizu T, Hino A, Tsutsumi A, Park YK, Watanabe W, Kurokawa M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir Chem Chemother*. 2008(19):7-13.
36. Bernal M. Circulación de agentes patógenos y usos de propóleo en el tratamiento del síndrome diarreico infeccioso del ternero. Estudio comparativo. Trabajo presentado en el primer taller Internacional sobre Apiterapéuticos, II Simposio de Apiterapia, II Simposio sobre Propóleos, La Habana, Cuba. 1991.

37. Cueto AP, Alves SH, Pilau M, Weiblen R, Kubica TF, Lovato LT. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. *Ciencia Rural*. 2011;41(10):7.
38. Soroy L, Bagus S, Purnama I, Djoko W. The effect of a unique propolis compound (Propoelix TM) on clinical outcomes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Infection and Drug Resistance*. 2014(7):323-9.
39. Giral T. Estudio preliminar de la actividad antiviral de un extracto acuoso de Propóleos-Rojo. [Tesis de Maestría]: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí; 1997.
40. Vakhonina E, Budnikova N, Mitrofanov D, Repeyeva L, Stepanitseva G. Comparative evaluation of aqueous propolis extracts prepared in different ways. *Earth and Environmental Science*. 2021;624(1).
41. Pierson T, Diamond M. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 1. 6th ed 2013. p. 747-94.
42. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg*. 1982;31:830-6.
43. Oliveira AS, Silva ML, Oliveira AF, Silva CC, Teixeira RR, Paula SO. NS3 and NS5 proteins: important targets for anti-dengue drug design. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 2014;25.
44. Tibaire M. Actualización en dengue: 2001 Parte 1. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2001;21:7.
45. Rey FA. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:6899-901.
46. Kostychenko VA, Zhang Q, Tan JL, Lok SM. Immature and mature dengue serotype 1 virus structures provide insight into the maturation process. *Virology Journal*. 2013;87:7700-7.
47. Hsieh SC, Zou G, Tsai WY, Qing M, Chang GJ, Shi P, et al. The C-terminal helical domain of dengue virus precursor membrane protein is involved in virus assembly and entry. *Virology*. 2011(410):170-80.
48. Velandia M, Castellanos J. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 2011;15(1):33-43.
49. Dafis S, Schriewer J. 2-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*. 2010;468:452-6.

50. Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *J. Virol*, 80, 8353– 8358. *Virology Journal*. 2010;80:8353-8.
51. Pierson T, Kuhn R. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. *Cell Host Microbe*. 2008;4:229–38.
52. Urbina E, Rodríguez M. Presentaciones atípicas de la infección por el virus del dengue: Una Revisión de la Literatura. *Revista Médica de Trujillo*. 2017;12(1).
53. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell host & microbe*. 2009;5(4):365-75.
54. Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *Journal of virology*. 2004;78(15):8078-84.
55. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity. . *Molecules*. 2008(13):1671-95.
56. Driggs Y, Aguilar P, Batista P. Importancia de la prevención del dengue. *Rev cubana med*. 2021;60(3).
57. de Souza TBB, Dias JP. Perfil epidemiológico da dengue no município de Itabuna (BA), 2000-jun. 2009. *Revista Baiana de Saúde Pública*. 2010;34(3):665-.
58. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirakul N, Fitton P, Vasawanathana S, Limpitikul W, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*. 2010;328(5979):745-8.
59. Were F. The dengue situation in Africa. *Paediatrics and international child health*. 2012;32(sup1):18-21.
60. Kurane I, Takasaki T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. *Reviews in medical virology*. 2001;11(5):301-11.
61. Wilder-Smith A, Ooi E-E, Vasudevan SG, Gubler DJ. Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Current infectious disease reports*. 2010;12:157-64.

62. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Actualización Epidemiológica: Dengue, chikunguña y Zika. 25 de enero de 2023. In: Washington DCOO, editor. 2023.
63. Cantelar de Francisco N, Fernandez A, Molina A. Survey of dengue in Cuba. 1978-1979. *Revista cubana de medicina tropical*. 1981;33(1):72-8.
64. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of virology*. 2013;158(7):1445-59.
65. Guzmán MG, Kourı G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International journal of infectious diseases*. 2004;8(2):69-80.
66. Guzmán M, Vázquez S, Álvarez M, Pelegrino J, Ruiz D, Martínez P, et al. Vigilancia de laboratorio de dengue y otros arbovirus en Cuba, 1970-2017. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2019;71(1).
67. Alvarez M. Comportamiento del virus dengue en los ultimos años. *LNR Arbovirus*, IPK2023.
68. Timiri AK, Sinha BN, Jayaprakash V. Progress and prospects on DENV protease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;117:125-43.
69. Teixeira RR, Pereira WL, Oliveira AFCdS, Da Silva AM, De Oliveira AS, Da Silva ML, et al. Natural products as source of potential dengue antivirals. *Molecules*. 2014;19(6):8151-76.
70. Abd Kadir SL, Yaakob H, Mohamed ZR. Potential anti dengue medicinal plants:a review. *Nat Med*. 2013;67(4):677–89.
71. Lim S, Wang Q, Noble C, Chen Y, Dong H, Zou B, et al. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral Res*. 2013;100:500-19.
72. Hidari KI, Abe T, Suzuki T. Crbohydrate-related inhibitors of dengue virus entry. *Viruses*. 2013;5(2):605-18.
73. Talarico LB, Duarte ME, Zibetti RG, Nosedá MD, Damonte EB. An algal-derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection. *Planta medica*. 2007;73(14):1464-8.
74. Talarico L, Pujol C, Zibetti R, Faría P, Nosedá M, Duarte M, et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral research*. 2005;66(2-3):103-10.

75. Low J, Chen K, Wu K, Mah-LeeNm H. Antiviral activity of emetine dihydrochloride against dengue virus infection. *J Antivir Antiretrovir*. 2009;1:62-71.
76. Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral research*. 2003;58(1):73-9.
77. Rees CR, Costin JM, Fink RC, McMichael M, Fontaine KA, Isern S, et al. In vitro inhibition of dengue virus entry by p-sulfoxy-cinnamic acid and structurally related combinatorial chemistries. *Antiviral research*. 2008;80(2):135-42.
78. Brandão GC, Kroon EG, Souza DE, Filho JDS, Oliveira AB. Chemistry and antiviral activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae). *Molecules*. 2013;18(8):9919-32.
79. Bustinza A. Propóleo: Un potencial tratamiento para el COVID-19. *SCientífica*. 2020;18(1):27-31.
80. Saiz M, Serrano J. Propóleo: aplicaciones terapéuticas. *NATURA MEDICATRIX*. 2003;21(2):11.
81. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73:S1-S6.
82. Cuesta O, Piccinelli AL, Campo M, Márquez I, Rosado A, Rastrelli L. Chemical and Geographical Classification of Cuban Propolis Using ¹H and ¹³C NMR Together with HPLC-DAD data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(18):7502-9.
83. Silva-Béltran NP, Marquez M-LAP, Ruíz-Cruz S, Morán-Palacio EF, Chaidez-Quiróz C. Composición fenólica, actividad antihemolítica, antiinflamatoria y antibacteriana de propóleos del sur de Sonora. *Biotecnia*. 2022;24(3):77-86.
84. Talero C, Hernández D, Figueroa J. Calidad microbiológica de propóleo crudo y sólidos solubles de extractos de propóleos de *Apis mellifera* en Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2012;59(2):109-18.
85. Garcia-Mayea Y, Costa-Mugica A, Mondéjar-Álvarez D, Vidal-Novoa A. Potencial acción ateroprotectora de algunos productos apícolas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2012;43(2):1-9.
86. Angulo JB. Caracterización y actividad antioxidante de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de Chimborazo utilizados en la empresa APICARE-RIOBAMBA [Tesis de grado]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias.; 2014.

87. Álvarez Y. Desarrollo de un producto a base de miel con agregado de propóleos. [tesis de Grado]: UNCPBA; 2017.
88. Cibanal I, Krepper G, Fernández L, Gallez L. Caracterización fisico-química de propóleos argentinos para su uso como biofungicida agrícola. 2017.
89. Šabanović M, Saltović S, Mujkić A, Jašić M, Bahić Z. Impact of Propolis on the Oral Health. *Balkan Journal of Dental Medicine* 2019:1-9.
90. Guanche D, Yadró CA, Pérez J, Vega N, Robles A. Evaluación del método de recolección de propóleos empleando mallas plásticas. *Apiciencia*. 2022(2).
91. Alba de Armas M, Saucedo Y, Sotolongo L, Norman O, Gómez M, Jorge M. Optimización de la tecnología de elaboración de la tintura de propóleos. *Centro Azúcar*. 2022;49(3):69-77.
92. Carlos J. Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la Region Apícola I- Cuenca del Salado, PCIA, de Buenos Aires. [Tesis Doctoral]: Universidad Politécnica de Valencia; 2010.
93. Rodríguez Y. Caracterización Fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento del Atlántico, Colombia.: Universidad Nacional de Colombia; 2012.
94. Farfán AC, Cedeño BG, Muentes SG. Caracterización del propóleo del cantón Rocafuerte y su aplicación en la elaboración de un producto cosmético. *MQRInvestigar*. 2022;6(4):438-54.
95. Padró L, Chil I. Caracterización preliminar de la jalea de propóleos al 10% para uso estomatológico. *Revista Cubana de Química*. 2014;26(2):147-56.
96. Palomino LR, García CM, Gil J, Rojano BA, Durango DL. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae [Online]*. 2009;16(3):388-95.
97. Ochoa C, Rubila C. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de propoleo al 30% y cloruro de cetilpiridinio al 0.05% mas digluconato de clorhexidina al 0.05% sobre cepas de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175). *Estudio comparativo In Vitro*. 2022.
98. Ahn MR, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*. 2007;101:10.

99. Rodríguez B, Canales M, Penieres J, Cruz T. Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. 2020;30.
100. Cuesta Rubio O, Cuéllar Cuéllar A, Vázquez Cano A, Iris Ferraz B, Gil Rodríguez J, Agüero Agüero J, et al. Estudio químico y microbiológico de 2 muestras de propóleo rojo de origen cubano. *Rev cuba farm.* 1997;49-53.
101. Cuesta-Rubio O. Estudio químico de propóleos cubanos. [Tesis en opción al título de doctor en Ciencias Farmacéuticas.]: Universidad de La Habana; 2001.
102. Angel AM. Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá (Colombia) [Tesis de Maestría en Toxicología]: Universidad Nacional de Colombia; 2012.
103. Velasquez B, Montenegro S. Antimicrobial activity of ethanol extracts of propolis obtained of bees *Apis mellifera*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental.* 2017;8(1):185-93.
104. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica.* 2002;43(1-2):187-204.
105. Bedascarrasbure E, Maldonado L, Fierro Morales W, Alvarez A. Propóleos. Caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actualización de composición y propiedades. Buenos Aires: Ediciones Magna; 2006. p. 218.
106. Talero CA. Actividad anti-gérmenes in vitro de extractos etanólicos de propóleos obtenido de abejas (*Apis mellifera*) en tres áreas geográficas de Colombia [Magíster en Producción Animal]: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
107. Cuesta O, Piccinelli A, Campo M, Marquez I, Rosado A, Rastrelli L. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. *Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:7502-9.
108. López BG-C, Sawaya A. A review of the plant origins, composition and biological activity of red propolis. *Natural Products: Structure, Bioactivity and Applications*; Nova Science Publishers, Inc: New York, NY, USA. 2012:83-96.
109. García M. Actividad in vitro de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros [tesis de licenciatura]: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2011.

110. Fernández D, Velbes PE, Nasiff A, Domínguez C, Soto J, Giral T. Efecto del tratamiento con extracto de propóleos rojo oral en la esteatohepatitis no alcohólica. *Revista Cubana de Medicina*. 2014;53(3):9.
111. Banskota A, Tezuka Y, Adnyana IK, Ishii E, Midorikawa K, Matsushige K, et al. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*. 2001;8(1):8.
112. Hashimoto T, Aga H, Tabuchi A, Shibuya T, Chaen H, Fukuda S, et al. Anti-*Helicobacter pylori* compounds in Brazilian propolis. *Natural Medicines*. 1998;52(6):3.
113. Villanueva M, González M, Fernández H, Wilson M, Manquián N, Otth C, et al. Actividad antibacteriana in vitro de propóleos chilenos sobre *Helicobacter pylori*. *Revista chilena de infectología*. 2015;32(5):530-5.
114. Campo M, Cuesta-Rubio O, Márquez I, Rosado A, Montes de Oca R. Análisis Cualitativo de Propóleos Cubanos por Cromatografía en Capa Delgada. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2008;27(3):7.
115. Herrera CL, Fritz O, Montenegro G, Alvear M, del Sol M, Salazar LA. El propóleos reduce la esteatosis hepática inducida por dieta en ratones. *International Journal of Morphology*. 2010;28(1):75-84.
116. Velbes Marquetti PE, Martínez Barrios S, Soto Matos J, Hernández Castro JL, Pérez Piñero A. Evaluación de la fibrogénesis hepática en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica tratados con propóleos rojo oral cubano. *Revista Cubana de Medicina*. 2021;60(3).
117. Pacheco A, Daleprane JB, Freitas VS, Ferderbar S, Hirabara S, Cuevas A, et al. Efecto del propóleos chileno sobre el metabolismo de glucosa en ratones diabéticos. *International Journal of Morphology*. 2011;29(3):754-61.
118. Ramos M. Uso del propóleo en el proceso de cicatrización post extracción dentaria en pacientes diabéticos: Universidad de Guayaquil. Facultad Piloto de Odontología; 2014.
119. Alday J. Evaluación de la actividad antiparasitaria (in vitro e in vivo) de propóleos sonorenses y algunos de sus constituyentes sobre *Giardia lamblia* [Tesis de Maestría en ciencias de la Salud]: Universidad de Sonora; 2014.
120. Guerra YE, Jorge LV, Assef JAC, Izquierdo KR, González II. La propolina por intubación duodenal como tratamiento de la giardiasis. *Mediciego*. 2017;23(3):19-23.

121. Pastor MA, Martín L, Gatica ME, Angulo J, Vargas-Machuca I, del Carmen Fariña M, et al. Dermatitis alérgica de contacto no profesional a propóleo. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2003;94(3):188-90.
122. Flores I. Evaluación del efecto del propóleo en cultivos celulares infectados con *Malassezia pachydermatis* [Tesis de Maestría]. Biblioteca de la UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.
123. Corona M, López C, Duharte A, Ramón R, Tamayo Y. Efectividad de la tintura de propóleos al 10 % en pacientes con estomatitis subprótesis. *MEDISAN*. 2018;22(9).
124. Moreno Z, Martínez P, Figueroa J. Efecto antimicrobiano in vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *Nova*. 2007;5(7).
125. Herrera L, Piscioti M, Ramos O, Neira L, Pinzón J, Herrera A, et al. Actividad Antimicrobiana *in vitro* de un propoleos de Santander sobre *enterococcus faecalis*. *Ustasalud*. 2012;11:73-8.
126. Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L, Lin J-K. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2004;1(2):175-85.
127. Oršolić N, Knežević AH, Šver L, Terzić S, Bašić I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of ethnopharmacology*. 2004;94(2-3):307-15.
128. Gruenberger T, Gorlitzer M, Soliman T, Rudas M, Mittlboeck M, Gnant M, et al. It is possible to omit postoperative irradiation in a highly selected group of elderly breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*. 1998;50:37-46.
129. Kimoto N, Hirose M, Kawabe M, Satoh T, Miyataka H, Shirai T. Post-initiation effects of a super critical extract of propolis in a rat two-stage carcinogenesis model in female F344 rats. *Cancer Letters*. 1999;147(1-2):221-7.
130. Muñoz LC, Linares SE, Narváez W. Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Biosalud*. 2011;10(2):11.
131. Guaraca AL, Palomino DL. Estudios de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica. [Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Cosmética]: Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador.; 2018.

132. Veckenstedt A, Güttner J, Béládi I. Synergistic action of quercetin and murine alpha/beta interferon in the treatment of Mengo virus infection in mice. *Antiviral research*. 1987;7(3):169-78.
133. Bachiega TF, Orsatti CL, Pagliarone AC, Sforcin JM. The effects of propolis and its isolated compounds on cytokine production by murine macrophages. *Phytotherapy Research*. 2012;26(9):1308-13.
134. Orsatti C, Missima F, Pagliarone A, Bachiega TF, Búfalo M, Araújo Jr J, et al. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*. 2010;24(8):1141-6.
135. Conti BJ, Búfalo MC, Golim MdA, Bankova V, Sforcin JM. Cinnamic acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.
136. Limón D, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E, J. G. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*. 2010;34:143-54.
137. Nuñez I. Evolución en el descubrimiento y desarrollo de fármacos antivirales [Fin de Grado]: Universidad Complutense de Madrid; 2018.
138. Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Med Sci Monit*. 2016;22:422–30.
139. Harborne J. General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry*. 1989;1:1-28.
140. GUO J, PANG J, WANG X. In vitro screening of traditionally used medicinal plants in China against enteroviruses. *World JGastroenterol*. 2006;12:4078-81.
141. Bankova V, Boudourova G, Popov S, Sforcin JM, Cunha SR. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*. 1998;29:7.
142. Márquez I, Cuesta O, Campo M, Rosado A, Montes de Oca R, Piccinelli AL, et al. Studies on the Constituents of Yellow Cuban Propolis: GC-MS. Determination of Triterpenoids and Flavonoids. *J Agric Food Chem*. 2010;58:4725-30.
143. Lozina LA, Peichoto ME, Acosta O, Granero G. Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2010;29(1):9.

144. Bhargava P, Mahanta D, Kaul A, Ishida Y, Terao K, Wadhwa R, et al. Experimental Evidence for Therapeutic Potentials of Propolis. *Nutrients*. 2021;13.
145. Pobiega K, Gniewosz M, Kraśniewska K. Antimicrobial and antiviral properties of different types of propolis. . *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 2017;589(22):69-79.
146. Frión-Herrera Y, Gabbia D, Scaffidi M, Zagni L, Cuesta O, De Martin S, et al. Cuban Brown Propolis Interferes in the Crosstalk between Colorectal Cancer Cells and M2 Macrophages. *Nutrients*. 2020;12(7):2040.
147. Demir S, Atayoglu AT, Galeotti F, Garzarella E, Zaccaria V, Volpi N, et al. Antiviral activity of different extracts of standardized propolis preparations against HSV. *Antiviral Therapy*. 2020:26.
148. Yosri N, Abd El-Wahed AA, Ghonaim R, Khattab OM, Sabry A, Ibrahim M, et al. Anti-Viral and Immunomodulatory Properties of Propolis: Chemical Diversity, Pharmacological Properties, Preclinical and Clinical Applications, and In Silico Potential against SARS-CoV-2. *Foods*. 2021;10:47.
149. Cuesta-Rubio O, Frontena-Uribe BA, Ramirez-Apan T, Cárdenas J. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosona. *Z Naturforschung*. 2002;57 C(3/4):372-8.
150. Martínez G, Garcia CM, Durango DL, Gil JH. Caracterización de propóleos provenientes del Municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *MVZ Cordoba*. 2012;17(1):2861-9.
151. Palomino LR, Martínez J, García CM, Durango DL, Gil JH. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Fac Ciencias Agrar [Online]*. 2010;63(1):5373-83.
152. Alaribe CS, Esposito T, Sansone F, Sunday A, Pagano I, Piccinelli AL, et al. Nigerian Propolis: Chemical composition, antioxidant activity and α -amylase and α -glucosidase inhibition. . *Nat Prod Res*. 2019;35(18):3095-9.
153. Araújo KS, dos Santos Júnior JF, Sato MO, Finco FD, Soares IM, Barbosa R, et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and apis from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amaz* 2016;46(1):61-8.
154. Márquez I, Campo M, Cuesta O, Piccinelli AL, Rastrelli L. L. Polyprenilated benzofenone derivatives from Cuban propolis. *J of Nat Prod*. 2005;68(6): 931-4.

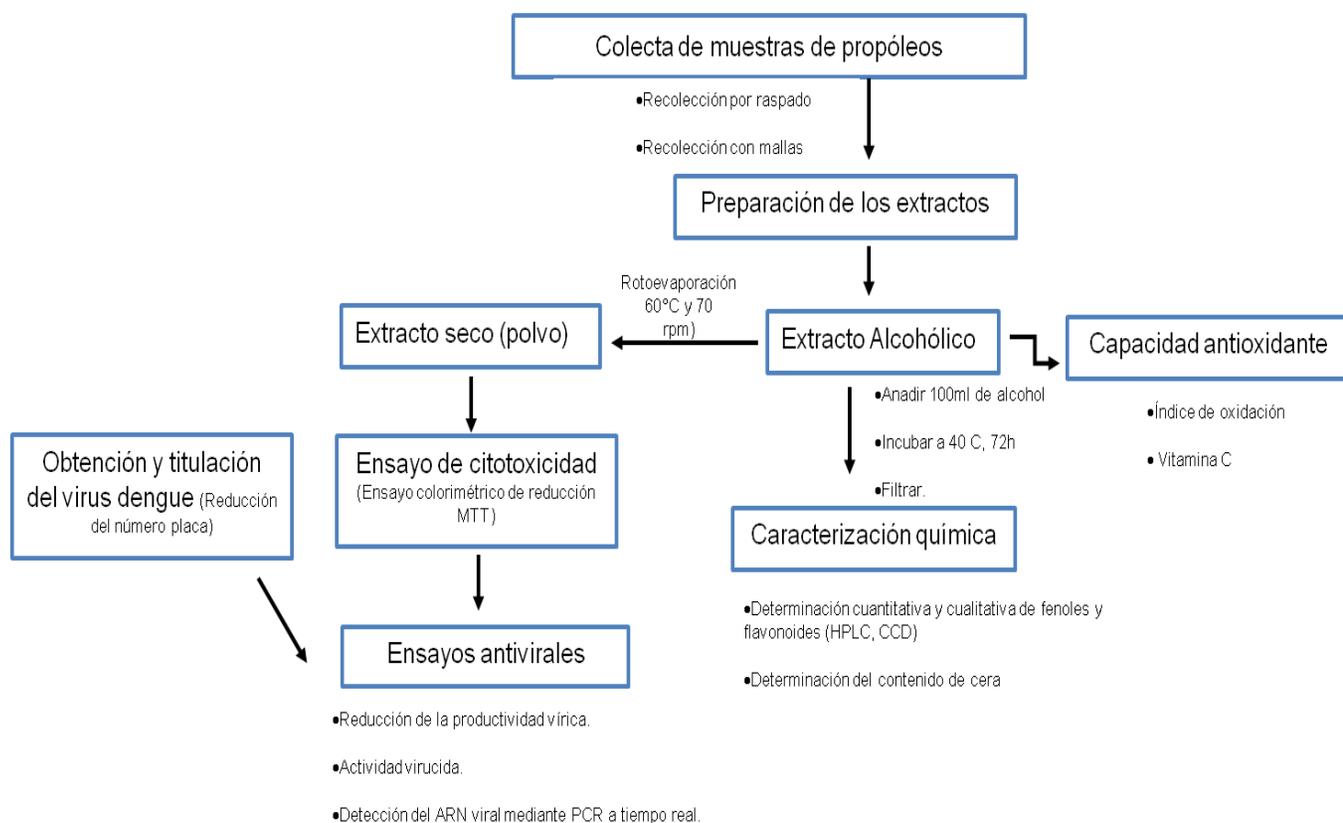
155. De Souza EC, Da Silva EJ, Cordeiro HK, Lage NM, Da Silva FM, Dos Reis DL, et al. Chemical compositions and antioxidant and antimicrobial activities of propolis produced by *Frieseomelitta longipes* and *Apis mellifera* bees. *Quim Nova*. 2018;41(5):1-7.
156. Beldma AX, Miranda CJ. Determinación de nemorosona en propóleos ecuatorianos por CLAE-DAD-EM. Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud: Universidad Técnica de Machala; 2019.
157. Herrera MG. Caracterización química y actividad biológica de propóleos producidos en el Estado de Yucatán [En opción al título de doctor en Ciencias Biológicas.]: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.; 2019.
158. Grosso G. Perfil de flavonoides e índice de oxidación de algunos propóleos Colombianos. *Revista Zootecnia Tropical*. 2007;25(2):1-4.
159. Carrasco LM, Cepeda NS. Caracterización química y actividad antioxidante de tres muestras de propóleos ecuatorianos [Tesis de Licenciatura]: Universidad Técnica de Machala; 2020.
160. Fritz JA. Caracterización química del propóleos chileno: Universidad Austral de Chile; 2011.
161. Wollenweber E, Buchmann SL. Feral honey bees in the Sonoran Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1997;52(7-8):530-5.
162. Guanche D. Evaluación de diferentes extractos de propóleos. *Rev CENIC Cienc Biol*. 2022;53(3).
163. Bankova V. Determining quality in propolis samples. *The journal of the American apitherapy society*. 2000;7(2):3.
164. Yoong AM. Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya [Tesis de Licenciatura]: Universidad de Honduras; 2004.
165. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 2012;27(1):76-89.
166. Vargas R, Torrescano G, Acedo E, Carvajal E, González A, Vallejo B, et al. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Commercial Propolis Extract in Beef Patties. *Journal of Food Science*. 2014;79(8):1499-504.

167. Vargas R, Torrescano G, Mendoza A, Vallejo B, Acedo E, Sánchez J, et al. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Biocientia*. 2014;16(1):32-7.
168. Checconi P, De Angelis M, Marocci M, Fraternali A, Magnani M, Palamara A. Redox-Modulating Agents in the Treatment of Viral Infections. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):4084.
169. Guerrero C, Acosta O. Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection. *World J Virol*. 2016;5(2):38.
170. Camini F, da Silva CC, Almeida L, de Brito C. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Arch Virol*. 2017;162(4):907-17.
171. Guerrero C. Los virus de RNA inducen estrés oxidativo celular y los antioxidantes reducen la generación de partículas virales, tanto *in vitro* como *in vivo*. 2021.
172. Popolo A, Piccinelli L, Morello S, Cuesta O, Sorrentino R, Rastrelli L, et al. Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. *Nat Prod Commun* 2009;4:1711-6.
173. Pardo G, Reis F, Dalalio F, Nuñez Y, Cuesta O, Uyemura S, et al. The cytotoxic effects of brown Cuban propolis depend on the nemorosone content and may be mediated by mitochondrial uncoupling *Chem Biol Interact* 2015;2015(228):28-34.
174. Pardo G, Nuñez Y, Tudella V, Cuesta O, Rodrigues F, Pestana C, et al. The anticancer agent nemorosone is a new potent protonophoric mitochondrial uncoupler. *Mitochondrion*. 2011;11(2):255-63.
175. Pardo G, Marín J, Cuesta O, Ochoa E, Verdecia Y, Pellón R, et al. Antiproliferative activity of compounds that interfere with mitochondrial function. Anticancer and antiparasitic potential. *Revistas Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* 2018;8(1).
176. Reis F, Pardo G, Nuñez Y, Cuesta O, Marín J, Uyemura S, et al. Clusianone, a naturally occurring nemorosone regioisomer, uncouples rat liver mitochondria and induces HepG2 cell death. *Chem Biol Interact* 2014;212:20-9.
177. Pardo G, Nuñez Y, Tudella V, Cuesta O, Rodrigues F, Pestana C, et al. The anticancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: ensuing energetic and oxidative stress implications. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;253(3):282-9.

178. Loaiza V, Monsalve LM, Bezerra C, Martinez M, Pergentino D. Antiviral Role of Phenolic Compounds against Dengue Virus: A Review. *Biomolecules*. 2021;11(11):28.
179. Sánchez I, Gómez F, Taboada J, Ruiz BH. Antiviral Effect of Flavonoids on the Dengue Virus. *Phytotherapy Research*. 2000(14):89-92.
180. Dewi BE, Desti H, Ratningpoeti E, Sudiro M, Fithriyah, Angelina M. Effectivity of quercetin as antiviral to dengue virus-2 strain New Guinea C in Huh 7-it 1 cell line. *Earth and Environmental Science*. 2020:6.
181. Kwon MJ, Shin H, Perumalsamy H, Wang X, Ahn YJ. Antiviral effects and possible mechanisms of action of constituents from Brazilian propolis and related compounds. *Journal of Apicultural Research*. 2019.
182. Reyes R, Huerta M. Compuestos naturales de plantas de la familia clusiaceae; Inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *INCI* 2009;34(6):385-92.
183. Huleihel M, Isanu V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Isr Med Assoc J* 2002(4):923-7.
184. Mahmoud H, Isanu V. Anti-herpes Simplex Virus Effect of an Aqueous Extract of Propolis. *IMAJ*. 2002;4(923-927).
185. Carvalho O, Botekho C, Ferreira C, Ferreira H, Santos M, Diaz M, et al. In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: implications of structural differences for antiviral design. *Research in veterinary science*. 2013;95(2):717-24.
186. González M. Evaluación antiviral del propóleo mexicano en cultivo celular infectado con el virus de Aujeszky [Tesis de Maestría]. Biblioteca de la UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
187. Sforcin J, Orsi R, Bankova V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;98:301-5.
188. Ivanovska ND, Dimov VB, Pavlova S, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of water soluble derivative. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995;47:9.
189. Búfalo MC, Ferreira I, Costa G. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2013(149):84-92.

190. Nassar SA, Mohamed AH, Soufy H, Nasr SM, Mahran KM. Immunostimulant Effect of Egyptian Propolis in Rabbits. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:9.
191. Padrón A, Naranjo A, Díaz J, Llera R. El propóleo una alternativa de todos los tiempos. *researchgate*. 2019.

ANEXO



Anexo 1. Flujo de trabajo empleado en la presente investigación