

Evaluación *in vitro* de la actividad cicatrizante y capacidad antioxidante del extracto etanólico de propóleo

In vitro evaluation of the healing activity and antioxidant capacity of the ethanolic extract of propolis

Martínez-Rojas, P. S.¹, Olivas-Calderon, E. H.³, Pedroza-Escobar, D.²,
Avalos-Soto, J.¹, García-Lujan, C.¹, Hernández-González, S. I.⁴, Castillo-Maldonado, I.²,
Téllez-López M. Á.¹

¹Facultad de Ciencias Químicas: Dpto. Farmacia y productos Naturales. Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n, Fracc. Filadelfia, CP 35010, Gómez Palacio, Durango, México.

²Facultad de Medicina: Dpto. de Bioquímica del Centro de Investigación Biomédicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Av Morelos, #900, Col Centro, CP 27000, Torreón, Coahuila, México.

³Facultad de Ciencias Químicas: Dpto. Patologías de Origen ambiental. Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n, Fracc. Filadelfia, CP 35010, Gómez Palacio, Durango, México.

⁴Facultad de Ciencias Químicas: Dpto. Bacteriología Médica Diagnóstica y Salud Pública. Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n, Fracc. Filadelfia, CP 35010, Gómez Palacio, Durango, México



Please cite this article as/Como citar este artículo: Martínez-Rojas, P. S., Olivas-Calderon, E. H., Pedroza-Escobar, D., Avalos-Soto, J., García-Lujan, C., Hernández-González, S. I., Castillo-Maldonado, I., Téllez-López M. Á. (2024). *In vitro* evaluation of the healing activity and antioxidant capacity of the ethanolic extract of propolis. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1645. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1645>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: March 06th 2024.

Accepted/Aceptado: May 20th 2024.

Available on line/Publicado: June 07th 2024.

RESUMEN

Una herida se define como corte o ruptura en la continuidad de cualquier tejido. El proceso de curación de heridas puede verse comprometido por infección, suministro inadecuado de oxígeno, desnutrición y proceso oxidativo, en la búsqueda de alternativas que coadyuben los procesos de cicatrización, se evaluó la actividad cicatrizante y antioxidante del extracto etanólico de propóleo (EEP). El propóleo fue procesado y se obtuvo el EEP a diversas concentraciones en µg/mL, se cuantificó el contenido de polifenoles totales, la capacidad antioxidante por diferentes métodos (ABTS, DPPH y FRAP), las especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (ON) y la actividad cicatrizante por la técnica Scratch Wound Healing. A 1000 µg/mL el EEP arrojó una concentración de 754.36 mgEAG/gbs de polifenoles totales, la capacidad antioxidante por los métodos de DPPH, ABTS y FRAP a 5000 µg/mL mostró concentraciones de 41.33 mgET/gbs, 60.53 mgET/gbs y 280 µMET/gbs respectivamente, la concentración de ROS y ON a 300 µg/mL mostró un porcentaje de inhibición de 32.96 y 39.93 %. El mayor % de cicatrización se observó a 600 µg/mL. Los polifenoles, así como la actividad antioxidante del EEP son prometedoras, lo cual puede estar ligado a la aceleración del proceso de cicatrización observado.

PALABRAS CLAVE: Cicatrización, propóleo, antioxidantes, reparación celular.

*Corresponding Author:

Miguel Angel Téllez-López. Dpto. Farmacia y Productos Naturales. Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123, s/n, Fracc. Filadelfia, CP 35010, Gómez Palacio, Durango, México. Teléfono: +52 87 1331 0179. Mail: mtellez@ujed.mx

ABSTRACT

A wound is defined as a cut or rupture in the continuity of any tissue. The wound healing process can be compromised by infection, inadequate oxygen supply, malnutrition, and oxidative processes. In pursuit of alternatives to aid the healing process, we evaluated the healing and antioxidant activity of ethanolic extract of propolis (EEP). The propolis underwent processing, yielding EEP at different concentrations in $\mu\text{g/mL}$. The total polyphenol content, antioxidant capacity using various methods (ABTS, DPPH, and FRAP), reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) levels, and healing activity using the Scratch Wound Healing technique, were assessed. At 1000 $\mu\text{g/mL}$, the EEP exhibited a concentration of 754.36 mgEAG/gbs of total polyphenols. The antioxidant capacity, measured by DPPH, ABTS, and FRAP methods at 5000 $\mu\text{g/mL}$, showed concentrations of 41.33 mgET/gbs, 60.53 mgET/gbs, and 280 $\mu\text{MET/gbs}$, respectively. The concentration of ROS and NO at 300 $\mu\text{g/mL}$ exhibited inhibition percentages of 32.96 % and 39.93 %, respectively. The highest healing percentage was observed at 600 $\mu\text{g/mL}$. The polyphenols, along with the antioxidant activity of EEP, show promise, potentially linked to the observed acceleration of the healing process.

KEY WORDS : Healing, propolis, antioxidants, cellular repair.

Introducción

La piel es una membrana fibroelástica, considerada la “envoltura viva del cuerpo” (Guarín-Corredor *et al.*, 2013). Es el órgano más extenso del cuerpo humano, con una superficie aproximada de 1.6 m² y un peso de unos 4 kg, lo que equivale al 6 % del peso corporal total (Tresguerres *et al.*, 2009). Su principal función es constituir una barrera protectora contra microorganismos, rayos UV, pérdida de fluidos, estrés de fuerzas mecánicas y al mismo tiempo sirve como principal órgano sensitivo o de comunicación hacia el exterior (Huether & McCance, 2015) al ser la capa más externa es susceptible a procesos mecánicos que pueden ocasionar heridas en este tejido.

Una herida se puede definir como un corte o ruptura en la continuidad de cualquier tejido, también incluyen una avería en la función protectora de la piel, la pérdida de continuidad del epitelio, con o sin pérdida del tejido conjuntivo subyacente a la piel después de la lesión (Gunde, 2018).

Posterior a la lesión se desencadena un proceso complejo y dinámico de restauración de las estructuras celulares y las capas de tejido de la piel u otros órganos del cuerpo, este proceso es conocido como cicatrización (Agyare *et al.*, 2014; Schencke *et al.*, 2016; Al-Waili,

2018). De manera normal la cicatrización se divide en cuatro etapas las cuales son: Coagulación, inflamatoria, proliferativa y reepitelización.

El proceso de curación de heridas puede verse comprometido por infecciones, suministro inadecuado de oxígeno, desnutrición y procesos oxidativos (Al-Waili, 2018). Una consideración importante en la curación fisiológica de heridas es el suministro de oxígeno en el lecho de la herida (Darby *et al.*, 2014).

La cicatrización de heridas es un proceso crucial para la regeneración de la piel y la recuperación de tejidos dañados. Además de los tratamientos médicos convencionales, existen remedios naturales como el propóleo que pueden ayudar a acelerar este proceso (Arcos *et al.*, 2019), por lo que las estrategias a implementar son muy variadas.

Gran parte de su actividad biológica y terapéutica se debe a la presencia de flavonoides en su composición, (Darby *et al.*, 2014; Delgado Aceves *et al.*, 2015; Chaa *et al.*, 2019) la cual varía en función del origen geográfico (Farrér *et al.*, 2004; Somerville, 2008; Eyng *et al.*, 2015; Chaa *et al.*, 2019; Elkhenany *et al.*, 2019).

Se ha estudiado el papel que juegan las propiedades antioxidantes en la cicatrización de las heridas. La adición de estos antioxidantes se ha evaluado en apósitos e hidrogeles (Frykberg & Jaminelli, 2015; Fu *et al.*, 2020). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son reguladores cruciales de varias fases de la cicatrización de heridas. De hecho, se requieren bajos niveles de ROS para la lucha contra el daño externo (Dunnill *et al.*, 2017). Sin embargo, el estrés oxidativo excesivo en los tejidos y la disminución de la capacidad antioxidante dan como resultado un desequilibrio redox, que es una de las principales causas de las heridas que no cicatrizan (Sanchez *et al.*, 2018). Por ello, se debe revertir este estrés oxidativo con un aumento en el uso de compuestos antioxidantes (Frykberg & Jaminelli, 2015; Fu *et al.*, 2020).

En esta investigación se propone el uso del propóleo, ya que desde hace muchos años se conoce del empleo de este para la curación de heridas; (Barron & Wynn, 2011; Asgharpour *et al.*, 2019; Baygar, 2020; Belvedere *et al.*, 2020) de la misma manera, presenta propiedades antitumorales y antioxidantes, (Harnaj *et al.*, 1978; Agyare *et al.*, 2014) diversos efectos sobre bacterias, hongos, parásitos y virus (Castillo, 2018; Carter & Skilbeck, 2014).

Es precisamente este punto el que hace particularmente interesante este estudio debido a que el propóleo contiene atributos que pueden coadyubar en los procesos de cicatrización de heridas. Por tal motivo, el objetivo de este estudio es evaluar la actividad cicatrizante y la capacidad antioxidante del extracto etanólico de propóleo.

Material y Métodos

El procesamiento del propóleo para la obtención del extracto etanólico, la cuantificación de polifenoles totales y las determinaciones de la capacidad antioxidante por los tres métodos,

que se describen posteriormente, fueron realizados en el laboratorio de Farmacia y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas, unidad Gómez Palacio, del estado de Durango, México, dependiente de la Universidad Juárez del Estado de Durango en el periodo de enero a julio del 2020.

La concentración de ROS y ON, así como, la cicatrización *in vitro* por la técnica de Scratch Wound Healing Assay, se realizó en el departamento de Bioquímica del Centro de Investigación Biomédica, de la Universidad Autónoma de Coahuila, unidad Torreón en el periodo de agosto-diciembre del 2020.

Propóleo

El Propóleo se obtuvo de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en el municipio de Torreón, Coahuila, México en el mes de enero del 2020, bajo las condiciones de obtención establecidas por el Departamento de Biología. UAAAN Unidad Regional Laguna.

Fibroblastos

Las líneas celulares denominadas: Primary Dermal Fibroblast Normal; Human, Neonatal (HDFn) y Fibroblastos de ratón 3T3, se obtuvieron del laboratorio de Biología Molecular del cáncer de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Elaboración del extracto etanólico de propóleo

Se preparó el extracto considerando 25 g de propóleo con 250 mL de etanol absoluto como solvente, manteniéndolo a temperatura ambiente en un lugar seco, fresco y alejado de la luz; luego de 24 horas en agitador orbital (Heathrow Scientific, Modelo Sea Star 1.11) a 150 rpm, se filtró con un embudo Buchner con papel filtro de poro grueso (Whatman No. 1) aunado a un matraz Kitasato mismo que lleva a cabo su función junto a una bomba de vacío (AutoSciencie, Modelo AP-9950) hasta que el residuo obtenido fue lo más claro posible. Enseguida, se sometió al rotavapor (Buchi, Modelo R-210) a 100 rpm, 50 °C por 30 min hasta lograr que el propóleo presentara una consistencia semisólida; este fluido semisólido se dividió en tres cajas Petri, que posteriormente se colocaron en una estufa de vacío (Napco, Modelo 5831) con condiciones de 40 °C y 20 atm, purgada cada hora, durante 24 horas. Una vez obtenido el material seco totalmente, se pesaron las cajas en balanza analítica (Adventurer Ohaus, Modelo AR2140) para cuantificar el rendimiento del extracto etanólico de propóleo.

Rendimiento del extracto etanólico de propóleo

Para establecer el rendimiento de los extractos de propóleo se estableció se utilizó la siguiente ecuación (ecuación 1):

Ecuación 1. Rendimiento de los extractos de propóleo

$$\text{Rendimiento (\%)} = (P \times 100) / m$$

P= Peso de extracto seco (g)

m= Peso seco de muestra (g)

Contenido de polifenoles totales en el extracto etanólico de propóleo

La cuantificación de los polifenoles totales se realizó mediante el método de Folin Ciocalteu (Cortés-Chitala *et al.*, 2021). Los extractos se diluyeron a 5000, 1000, 620 y 320 µg/mL y la reacción se llevó a cabo mezclando 0.5 mL de reactivo Folin 0.67 N y 0.5 mL de Na₂CO₃ 1.9 M. Después de 1 h de reposo, las muestras se leyeron a 760 nm en un espectrofotómetro UV/Visible utilizando ácido gálico (GA) como patrón de referencia. Para establecer el contenido de polifenoles se utilizó la siguiente ecuación (ecuación 2):

Ecuación 2. Contenido total de polifenoles expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico

$$\text{Contenido total de polifenoles} \left(\frac{\text{mgEAG}}{\text{gbs}} \right) = \text{ppm} \frac{\text{L de extracto}}{\text{g muestra}}$$

ppm= concentración en mg/mL,

L= volumen en litros de la solución

g= gramos de muestra seca del extracto.

Actividad antioxidante del extracto etanólico de propóleo

Acido 2,2'-azino-bis-3- etilbenzotiazolin-6-sulfonico (ABTS)

La capacidad de eliminación de radicales libres por el método del ABTS se realizó según lo descrito por (Re *et al.*, 1999), con alguna modificación.

El radical ABTS⁺ se forma añadiendo ABTS 7 Mm y persulfato de potasio 2.25 mM. Dicha mezcla se dejó reaccionar durante 12-16 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente. Se diluyó el radical con etanol y agua (75:25). Las muestras se realizaron mezclando 10 µL del extracto etanólico de propóleo (5000, 1000, 620 y 320 µg/mL) con 190 µL de la solución de ABTS⁺

y la absorbancia se midió después de 30 minutos a 740nm. Los resultados fueron expresados como la capacidad antioxidante equivalente a porcentaje de inhibición. El porcentaje de inhibición del radical ABTS+ se calculó de acuerdo con la ecuación 3.

Ecuación 3. Porcentaje de inhibición del radical ABTS+

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{ABS control} - \text{ABS muestra})}{\text{ABS control}} \times 100$$

ABS= Absorbancia

1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó mediante espectrofotometría visible en presencia del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH) a 518 nm en un espectrofotómetro UV/Visible. Se tomaron 2 mL de metanol al 80 % (blanco) y 2 mL de extractos diluidos a diferentes concentraciones (5000, 1000, 620 y 320 µg/mL). A cada uno se le añadieron 2 mL de DPPH 2.5 mM recién preparado. La lectura del blanco y las muestras se realizaron después de 30 min. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la ecuación descrita por Cortés-Chítala *et al.* (2021) (ecuación 4).

Ecuación 4. Porcentaje de inhibición para la prueba de DPPH en donde se consideran las absorbancias (Abs) del control y muestra.

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - \frac{\text{ABS muestra}}{\text{ABS control}} \times 100$$

ABS= Absorbancia

Poder reductor del hierro (FRAP)

El ensayo FRAP, se realizó de acuerdo con el procedimiento utilizado por Serra y Lacalle (2010).

Se preparó el reactivo TPTZ mezclando 2.5 mL de TPTZ (0.01 M), 2.5 mL de FeCl₃*6H₂O (0.02 M) y 25 mL de solución buffer (pH 3.6).

Para las muestras se tomó 10 µL de cada concentración de extracto etanólico de propoleo (5000, 1000, 620 y 320 µg/mL) y se le adicionó a cada uno 190 µL de reactivo FRAP, posteriormente se incubó la mezcla durante 30 minutos y se midió su absorbancia a 595 nm. Se

realizó una curva de trólox en viales protegidos de la luz, se hicieron las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 0, 25, 50, 100, 200, 300 ppm. Finalmente, el resultado se expresó como μmol equivalentes a trólox/ gramos de base seca en base a la siguiente ecuación (ecuación 5):

Ecuación 5. μmol equivalentes a trólox/ gramos de base seca

$$\frac{\mu\text{molET}}{\text{gbs}} = \frac{(\text{ppm})(L)(DF)}{\text{g de propóleo}}$$

ppm= Partes por millón

L= Litros

DF= Factor de dilución

g= gramos

Análisis de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (ON) en macrófagos de ratón

Se realizó una inducción de macrófagos mediante un lavado peritoneal en dos ratones machos Swiss de 8 semanas de edad, inyectados con 1mL de tioglicolato [17.5 ppm] por 72h. Las muestras fueron extraídas (1 mL) después de un masaje abdominal y centrifugadas a 1,500 rpm por 10 min. La viabilidad celular se realizó resuspendiendo los botones de las muestras en RPMI-1640, se añadieron 10 μL de células y 90 μL de azul de tripano en una cámara de Neubauer para la obtención del conteo celular total. Los macrófagos fueron cultivados por triplicado expuestos a 20 μL de reactivo NBT e incubados durante 18 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . Se utilizó como blanco una solución de 500 μL de medio RPMI con 20 μL de NBT, un control positivo de células con la adición de LPS, control negativo sin LPS y un control tratamiento con EEP a una concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después se adicionaron 92 μL de DMSO y 108 μL de KOH. Se centrifugaron a 10, 000 rpm por 3 min y se leyeron a una absorbancia de 620 nm.

En el caso del óxido nítrico se realizó una curva de NO_2 [100 μgM] en concentraciones de 0, 1.5, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μL manteniéndolas en condiciones de 4 °C protegido de la luz y mezclando antes de realizar las lecturas colorimétricas, Se emplearon alícuotas de 25 μL de las muestras de los ratones y se les agregó a todos los tubos 500 μL de solución de Griess concentrada, luego fueron puestas a incubación por 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posterior a esto, se añadieron 500 μL de solución de Griess diluida repitiendo las condiciones anteriormente mencionadas y se leyeron finalmente a una absorbancia de 540 nm.

Cicatrización *in vitro* por técnica Scratch Wound Healing Assay.

Los cultivos celulares fueron mantenidos alrededor de 15 días antes de realizar los experimentos en los cuales se monitoreó diariamente la adaptación de las células a través de la formación de la monocapa, realizándose cambio de medio cada 3 días.

Se evaluó la cicatrización *in vitro* a través de la técnica de Scratch Wound Assay, en la cual se valoran los factores que alteran la motilidad y/o el crecimiento de las células lo que puede aumentar o disminuir la tasa de “curación” de la brecha (Lampugnani, 1999).

Para determinar la cicatrización *in vitro* se utilizaron fibroblastos humanos y de ratón: se sembraron 1×10^6 células en placas de cultivo con 96 pocillos por triplicado hasta alcanzar una confluencia del 90 %. Tras tener la confluencia adecuada se realizó un rasguño en el centro de la placa con una puntilla amarilla de pipeta automática con un diámetro de 0.9 mm. En seguida se aplicaron los cuatro tratamientos (0, 300, 450 y 600 $\mu\text{g/ml}$) del extracto de propóleo en medio DMEM suplementado con FBS 2 %.

Se utilizó como control negativo solo medio DMEM y como control positivo medio DMEM suplementado con 10 % de FBS. Después de realizar la exposición se tomaron fotografías a las 0, 6, 12, 24, y 48 h. Se realizó un análisis de los datos con el analizador de ImageJ.

Diseño experimental

Para la experimentación *in vitro* se utilizó un diseño experimental 4 x 4 con tres repeticiones, donde corresponde a las cuatro pruebas establecidas para la capacidad antioxidante: ABTS, DPPH, FRAP y contenido total de polifenoles (4) por las concentraciones de extracto etanólico de propóleo (4).

Para la determinación de ROS y ON en macrófagos de ratón, se utilizó una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ de EEP con un diseño 1x2, con tres repeticiones.

Se utilizaron fibroblastos humanos y de ratón para la experimentación de la cicatrización *in vitro* dentro de un diseño experimental 3 x 5 con tres repeticiones, donde corresponde a las concentraciones del extracto etanólico de propóleo establecidas (3) por el tiempo de monitoreo (5).

Análisis de datos

Los valores fueron expresados como % para determinar el rendimiento del extracto e inhibición de radicales libres en la evaluación de capacidad antioxidante, así como medidas de tendencia central (medias), para determinar la concentración de polifenoles, capacidad antioxidante, niveles de ROS y ON. Para la medición de las imágenes de monitoreo celular (% de cicatrización) se utilizó el programa ImageJ y GraphPad Prism 9 para comparar las medias de los niveles de cicatrización de las líneas celulares de fibroblastos humanos y de

ratón en diversos intervalos de concentración y diferentes tiempos de exposición. Lo anterior, mediante un ANOVA de dos vías con un post-hoc de Dunnett, considerando una $p < 0.001$ como estadísticamente significativa.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1, se representan el peso inicial, final y porcentaje de rendimiento del EEP luego de ser expuesto a una estufa de vacío a 40 °C. Los datos obtenidos arrojaron un rendimiento de 47.51 %, según la fórmula utilizada para el porcentaje de rendimiento del extracto etanólico de propóleo. Aunque la NOM-003-SAG/GAN-2017 para la producción y especificaciones en el procesamiento del propóleo, no cuenta con un parámetro establecido para dicho resultado; un alto porcentaje de rendimiento puede indicar una mayor posibilidad de obtener mayor cantidad de componentes activos como los son polifenoles a los que se les atribuye propiedades antioxidantes.

Rodríguez *et al.* (2020), encontraron similitudes en EEP de Michoacán con un 43 % de rendimiento. Esta asociación contradice a lo establecido en la literatura, ya que, a pesar de que ambos propóleos tienen distinta procedencia, flora, fauna circundante, entre otros factores, la diferencia de rendimientos es mínima. De igual manera, es importante señalar que la proporción de compuestos bioactivos tales como los polifenoles, terpenoides, esteroides y aminoácidos, pueden variar por las razones anteriormente mencionadas.

En otro estudio realizado por Delgado Aceves *et al.* (2015) en Jalisco México, se encontró un rendimiento de 33 %. De igual manera el propóleo de este estudio demostró tener un mejor porcentaje frente a otro cuya procedencia es muy diferente. Siendo el porcentaje de rendimiento un indicador muy importante ya que en este recae la calidad de la materia prima, cuanto mayor sea el valor de esta fracción, mejor será el producto final, debido a que es en ella donde están los compuestos de interés. Por consiguiente, se hace evidente que todo lo anterior sugiere una actividad biológica sinérgica de los diferentes compuestos.

Tabla 1. Diferencia del rendimiento del extracto etanólico de propóleo en gramos de base seca (gdb).

<i>Peso inicial (g)</i>	<i>Peso final (g)</i>	<i>Porcentaje de rendimiento</i>
25	11.879	47.51

Contenido total de polifenoles del extracto etanólico de propóleo

La presencia de compuestos polifenólicos en un extracto está directamente relacionada a la capacidad antioxidante debido a que son una de las principales clases de metabolitos secundarios de los vegetales a los cuales se les atribuye esta propiedad (Rodríguez Pérez *et al.*, 2020).

El valor de contenido de polifenoles totales del EPP entre 5000 y 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se muestra en la Tabla 2, mismo en el que el resultado de las concentraciones osciló entre 3771.8 y 241.39 mgEAG/gbs.

Tabla 2. Contenido en miligramos equivalentes de ácido gálico (mgEGA)/gramos de base seca (gdb) de las concentraciones del extracto etanólico de propóleo (EPE).

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	mgEGA/gdb
5000	3771.8
1000	754.36
620	467.70
320	241.39

Karapetsas *et al.* (2019), indicaron que el EEP griego a concentraciones similares, es decir, entre 5000 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contenía de 4114 hasta 107.73 mgEAG/gbs. Aunque comparten factores en la determinación de estos componentes como el método de recolección, almacenamiento, solvente utilizado y método de extracción; existen otros que influirían de manera crucial en el resultado observado como la zona geográfica de la que provienen además de la temporada en la que ambos fueron recolectados, ya que mientras el propóleo griego fue almacenado en época primaveral, el obtenido en este estudio fue en la invernal, por lo que las temperaturas representarían según la literatura un impacto importante en el contenido total de polifenoles y por consiguiente en su capacidad antioxidante. Sin embargo, los factores ambientales no fueron una limitante ya que presentan capacidades antioxidantes similares.

Otro estudio realizado por Talla *et al.* (2014), con propóleo de Camerún, África, haciendo una comparación entre diferentes solventes, encontraron en extractos etanólicos una concentración de 4510 mgEAG/gbs. Si bien este no fue el solvente con mejor resultado en contenido polifenólico en la investigación, estas observaciones concuerdan con otras realizadas por distintos autores, lo que supondría el papel destacado tanto del solvente utilizado para el extracto, así como su método de extracción en la determinación de contenido total de polifenoles.

Actividad antioxidante del extracto etanólico de propóleo

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Para la IC_{50} en el radical DPPH monitoreando su reducción por un antioxidante con la disminución en absorbancia y cambio de coloración de morado a amarillo, se obtuvo el resultado de 4020 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 3). Dicho resultado fue obtenido en base a la Ecuación 4. Se observa además una correlación entre la determinación de polifenoles totales y la actividad antioxidante en los métodos de DPPH y ABTS, así como también se aprecia que el porcentaje de inhibición de ambos métodos aumenta a medida que aumenta la concentración del extracto de propóleo.

Tabla 3. Contenido en porcentaje (%) y miligramos equivalentes a trolox (mgET)/gramos base seca (gdb) de las concentraciones del extracto etanólico de propóleo (EPE).

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición (%)	mgET/gdb
5000	62.13	41.33
1000	12.42	8.26
620	7.70	5.12
320	3.97	2.64

En estudios comparativos entre propóleos mexicanos, se encuentra el realizado por Rodríguez *et al.* (2020) en el estado de Veracruz, en el cual observaron una concentración inhibitoria media en 950 $\mu\text{g/mL}$. Si bien, resalta el hecho de que ambas zonas pueden ser consideradas como extremos geográficos del país y por consiguiente vegetación, clima y tipo de especie de abeja recolectora distinto, serían motivos a los cuales atribuirles el variado resultado.

ABTS (2, 2-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico)

La decoloración del radical ABTS por presencia de compuestos antioxidantes en el extracto se realizó mediante la fórmula para porcentaje de inhibición y mgET/gbs (Tabla 4). La IC_{50} se reportó en 4800 $\mu\text{g/mL}$. El porcentaje de inhibición fue evaluado mediante la ecuación 3.

Los resultados del extracto etanólico de propóleo para ABTS se muestran en el Tabla 4, en donde las concentraciones de 5000 a 320 $\mu\text{g/mL}$ oscilaron entre 60.53 y 3.87 mgEAG/gbs.

Aunque en este estudio, los datos encontrados en el contenido total de polifenoles y DPPH presentan una relación proporcional con el método de ABTS, comparando nuestros resultados, con los de otros estudios realizados en Latinoamérica, se han observado marcadas diferencias, principalmente en esta técnica. Un ejemplo, es la realizada por Benavidez (2017), con propóleo peruano en el que se encontró un IC_{50} en 1069 $\mu\text{g/mL}$.

Por otro lado, Yang *et al.* (2011) con EEP chino, encontró un IC_{50} en 42 $\mu\text{g/mL}$, está marcada diversidad se observa no solo en propóleos de Latinoamérica, si no también, en otros países.

Tabla 4. Contenido en porcentaje de inhibición (%) y miligramos equivalentes a trolox (mgET)/gramos de base seca (gdb) de las concentraciones del extracto etanólico de propóleo (EPE).

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición (%)	mgET/gdb
5000	51.98	60.53
1000	10.39	12.10
620	6.44	7.50
320	3.32	3.87

FRAP (Ferric reducing/antioxidant power)

En el caso del método de FRAP observándose el cambio de incoloro a un azul verdoso intenso en presencia de antioxidantes, se encontró un IC_{50} en 3190 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 5), deduciendo una mayor presencia de antioxidantes no enzimáticos.

Tabla 5. Contenido en miligramos equivalente a trolox (mgET)/gramos de base seca (gdb) de las concentraciones del extracto etanólico de propóleo (EPE).

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	$\mu\text{MET/gdb}$
5000	280
1000	56
620	34
320	17

En un estudio realizado por Touzani *et al.* (2019) con extracto hidroalcohólico de propóleo de Marruecos, África encontraron un IC_{50} en 1080 $\mu\text{g/mL}$, mientras que Yang *et al.* (2011) con EEP establecieron un IC_{50} en 5 $\mu\text{g/mL}$. Ambos, aunque distan a las observaciones encontradas en este estudio, tienen en común que fueron los resultados encontrados en menor cantidad en sus respectivos propóleos, lo que, en teoría, indicarían una mayor presencia de componentes no enzimáticos que reducen el hierro férrico a su forma ferrosa teniendo una actividad antioxidante. Resulta de interés la manera en la que independientemente de su ubicación, el propóleo de manera general, tiene un mejor desempeño en esta técnica ampliamente utilizada.

Análisis de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (ON) en macrófagos de ratón

La concentración de ROS y óxido nítrico realizada con tratamiento de EEP en una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ mostró un porcentaje de inhibición de 32.96 y 39.93 % como se muestran en la Figura 1 y Figura 2.

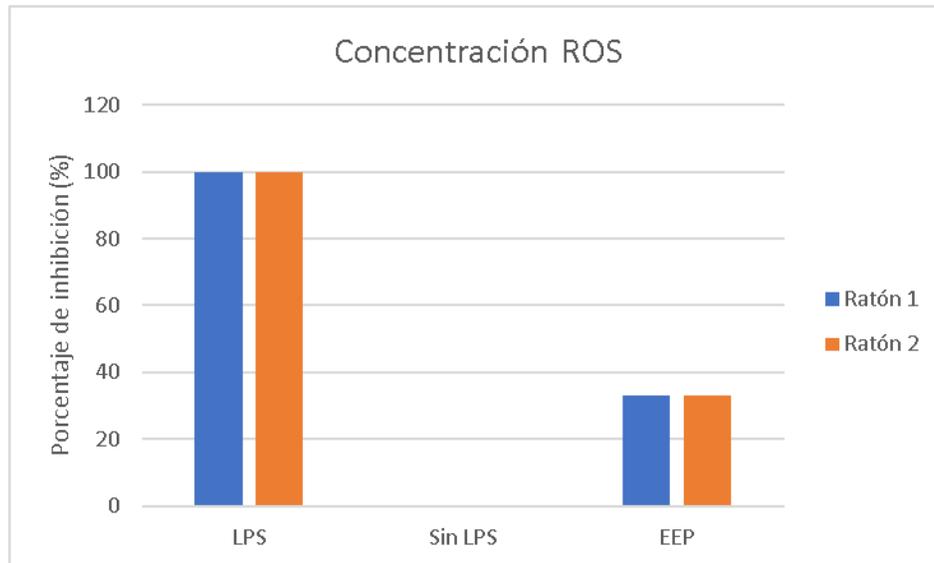


Figura 1. Muestras tratadas con control positivo (LPS), control negativo (Sin LPS) y el extracto etanólico de propóleo (EEP) en las que se mostró una inhibición del 32,96 %.

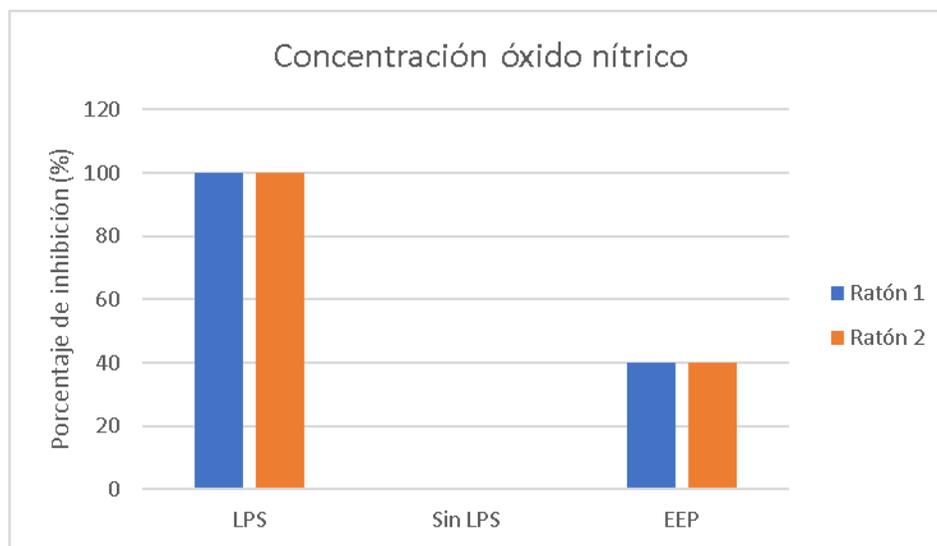


Figura 2. Muestras tratadas con control positivo (LPS), control negativo (Sin LPS) y extracto etanólico de propóleo (EEP) en las que se demostró una inhibición del 39,93 %.

El extracto etanólico de Propoleo Iraní demostró que macrófagos de ratón tratados a concentraciones de 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ redujeron significativamente la producción de ROS inducida por LPS (>50 %). Pero a mayores concentraciones (1.5 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no pudieron inhibir estas especies reaccionantes (Asgharpour *et al.*, 2019) lo que indicaría una mayor inhibición en menor concentración utilizada a la de este estudio. No obstante, aunque en el presente, solo fue expuesta una concentración de extracto, según las pruebas de citotoxicidad, a mayor concentración no se observaban efectos tóxicos por lo que se podría suponer que emplear una mayor o menor dosis podría lograr observarse o no dichos resultados obtenidos con el propóleo iraní en el que el efecto dosis-respuesta tuvo un impacto importante. Por el contrario, Eyng *et al.* (2015) adicionaron EEP brasileño en concentraciones de hasta 5000 ppm en la dieta de pollos sin encontrar ningún efecto en macrófagos ni en eritrocitos.

Cicatrización *in vitro* por técnica Scratch Wound Healing Assay

Los porcentajes de cicatrización de las distintas concentraciones de EEP son representados a diferentes tiempos de monitoreo en fibroblastos humanos (Figura 3) y fibroblastos de ratón (Figura 4).

En ambas líneas, a las 12 h se observó una diferencia significativa ($p < 0.0001$) en las concentraciones de 450 y 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, el mayor porcentaje de cicatrización se observó a 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En fibroblastos humanos con un 37.23 % y en fibroblastos de ratón con un 57.45 % a las 48 h. De igual manera, ninguna de las concentraciones administradas obtuvo una cicatrización completa en el tiempo de monitoreo determinado.

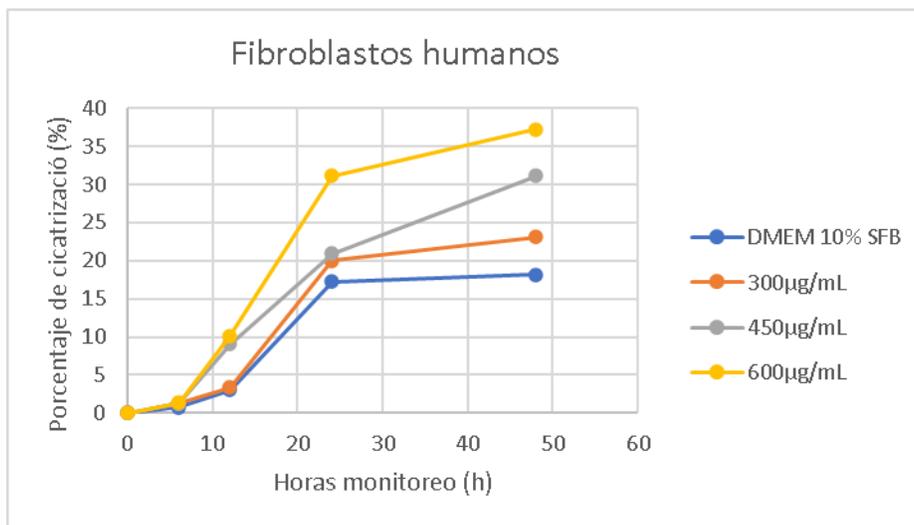


Figura 3. Porcentajes de cicatrización a diferentes concentraciones de EEP en diferentes intervalos de tiempo en fibroblastos humanos

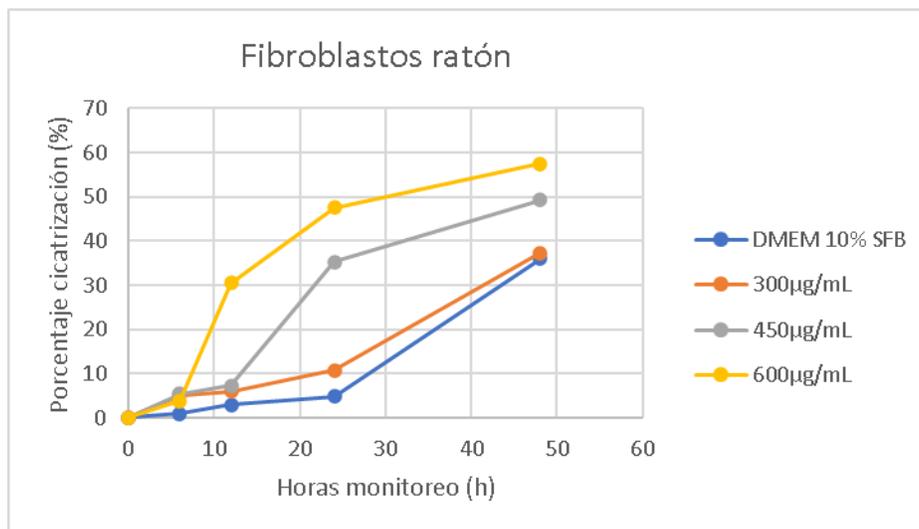


Figura 4. Porcentajes de cicatrización a diferentes concentraciones de EEP en diferentes intervalos de tiempo en fibroblastos de ratón

Jacob et al. (2015) en estudios con propóleo de Malasia aplicados en fibroblastos humanos, encontraron datos similares siendo que a 250 µg/mL observaban una tasa de migración rápida y una máxima proliferación a 500 µg/mL. De igual manera, al cabo de 12 h se observaban diferencias significativas en estas dos concentraciones del extracto y después de 48 h la máxima dosis empleada fue la del mejor efecto; sin embargo, aunque esta investigación no fue analizada a manera de porcentaje de curación de la herida, ninguna concentración obtuvo una monocapa completa, lo que significaría la formación total de una cicatriz al término del ensayo. Por su parte, en 2019, Elkhenany et al., encontraron casi el 85 % del cierre de la brecha al cuarto día de exposición, por lo que debido a las condiciones propias de los cultivos celulares, un monitoreo de 48 h normalmente no arrojaría resultados de restauraciones de la monocapa al 100 % aunque sí demostrarían la efectividad de la actividad cicatrizante del propóleo en fibroblastos humanos, independientemente de su origen, la composición general y sinérgica determinarían de manera crucial el impacto en la estrechez de la herida en simulación in vitro.

Conclusiones

Los niveles de polifenoles presentes, así como la actividad antioxidante encontrada en el propóleo analizado son prometedoras, lo cual puede estar ligado a la aceleración del proceso de cicatrización observado en este estudio.

La inhibición mostrada por el extracto en la concentración de especies reaccionantes de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (ON) en macrófagos de ratón confirma la actividad antioxidante

que se le atribuye, evitando con esto un estrés oxidativo propio de la herida o daño celular en la formación de nuevo tejido cicatricial.

Con esto, el presente estudio mostró *in vitro* el efecto cicatrizante del extracto etanólico de propóleo en fibroblastos de ratón y fibroblastos dermales humanos normales, por lo cual sería interesante realizar una caracterización en el extracto así como estudios de seguimiento *in vivo*.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo (Téllez-López M.A., García-Lujan C., Martínez-Rojas P.S., Avalos-Soto J.). Desarrollo de la metodología (Martínez-Rojas P.S., Pedroza-Escobar D., Castillo-Maldonado I.). Manejo de software (Martínez-Rojas P.S., Hernández-González, S.I., Olivas-Calderón, H.E.). Validación experimental y toxicología (Téllez-López M.A., Pedroza-Escobar D., Castillo-Maldonado I.). Análisis de resultados (Martínez-Rojas, Hernández-González, S.I., Olivas-Calderón, H.E., Téllez-López M.A.). Manejo de datos (García-Lujan C., Martínez-Rojas P.S., Avalos-Soto J.). Escritura y preparación del manuscrito (Téllez-López M.A., García-Lujan C., Martínez-Rojas P.S.). Redacción, revisión y edición (Martínez-Rojas, P.S., Pedroza-Escobar, D., Olivas-Calderón, H.E., Avalos-Soto, J., García-Lujan, C., Hernández-González, S.I., Castillo-Maldonado, Téllez-López M.Á.). Administrador de proyectos (Téllez-López M.A.). Adquisición de fondos (Téllez-López M.A., García-Lujan C., Avalos-Soto J.)

Financiamiento

Esta investigación no recibió financiamiento externo

Declaraciones éticas

Los autores declaran haber cumplido las regulaciones vigentes nacionales e internacionales, que exigen un manejo ético de los animales.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. José Luis Reyes Carrillo del Departamento de Biología de la UAAAN Unidad Regional Laguna, por proporcionar las muestras de propóleo para este experimento, así mismo agradecen al Dr. Pablo Zapata Benavides del laboratorio de Biología Molecular del cáncer de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UAdeNL por proporcionar las líneas celulares denominadas: Primary Dermal Fibroblast Normal; Human, Neonatal (HDFn) y Fibroblastos de ratón 3T3.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Agyare, C., Owusu-Ansah, A., Ossei, P. P. S., Apenteng, J. A., & Boakye, Y. D. (2014). Wound healing and anti-infective properties of *Myrianthus arboreus* and *Alchornea cordifolia*. *Medicinal chemistry*, 4, 533-539. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000191>
- Al-Waili, N. (2018). Mixing two different propolis samples potentiates their antimicrobial activity and wound healing property: A novel approach in wound healing and infection. *Veterinary World*, 11(8), 1188-1195. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1188-1195>
- Arcos, C. A., Wagner, R. M., Serna, E. C., Arcos, C. A., Gaucin, I. E., & Combina, L. N. (2019). Cicatrización normal y patológica: una revisión actual de la fisiopatología y el manejo terapéutico. *Revista Argentina de Cirugía Plástica*, 25(1), 11-15. https://adm.meducatium.com.ar/contenido/articulos/20600110015_1512/pdf/20600110015.pdf
- Asgharpour, F., Moghadamnia, A. A., Motallebnejad, M., & Nouri, H. R. (2019). Propolis attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through intracellular ROS and NO levels along with downregulation of IL-1 β and IL-6 expressions in murine RAW 264.7 macrophages. *Journal of food biochemistry*, 43(8), e12926. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12926>
- Barron, L., & Wynn, T. A. (2011). Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology*, 300(5), G723-G728. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00414.2010>
- Baygar, T. (2020). Characterization of silk sutures coated with propolis and biogenic silver nanoparticles (AgNPs); an eco-friendly solution with wound healing potential against surgical site infections (SSIs). *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(1), 258-266. <https://doi.org/10.3906/sag-1906-48>
- Belvedere, R., Pessolano, E., Porta, A., Tosco, A., Parente, L., Petrella, F., Perretti, M., & Petrella, A. (2020). Mesoglycan induces the secretion of microvesicles by keratinocytes able to activate human fibroblasts and endothelial cells: A novel mechanism in skin wound healing. *European Journal of Pharmacology*, 869, 172894. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172894>
- Benavidez, L. E. (2017). Actividad antioxidante del extracto de propóleos y su incorporación en una formulación cosmética. *Ciencia e Investigación*, 20(2), 3-8. <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/14803>
- Carter, A., & Skilbeck, C. J. (2014). Sutures, ligatures and knots. *Surgery (Oxford)*, 32(3), 117-120. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2013.12.016>
- Castillo, D.P. (2018). Quemaduras. Conceptos para el médico general. *Cuadernos de Cirugía*, 17(1), 58-63. <https://doi.org/10.4206/cuad.cir.2003.v17n1-10>
- Chaa, S., Boufadi, M. Y., Keddari, S., Benchaib, A. H., Soubhye, J., Van Antwerpen, P., & Riazi, A. (2019). Chemical composition of propolis extract and its effects on epirubicin-induced hepatotoxicity in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 294-300. <https://www.scielo.org>

- [br/j/rbfar/a/49G5LwSDDrS8r3vGLM7mnnS/?lang=en](https://doi.org/10.3390/molecules26030702)
- Cortés-Chitala, M. d. C., Flores-Martínez, H., Orozco-Ávila, I., León-Campos, C., Suárez-Jacobo, Á., Estarrón-Espinosa, M., & López-Muraira, I. (2021). Identification and quantification of phenolic compounds from Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) hydroethanolic extracts and evaluation of its antioxidant capacity. *Molecules*, 26(3), 702. <https://doi.org/10.3390/molecules26030702>
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7, 301-311. <https://doi.org/10.2147/ccid.S50046>
- Delgado Aceves, M. d. L., Andrade Ortega, J. Á., & Ramírez Barragán, C. A. (2015). Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 6(28), 74-87. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000200006
- Dunnill, C., Patton T., Brennan J., Barrett J., Dryden M., Cooke J., Leaper D., & Georgopoulos N., (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*, 14(1), 89–96. <https://doi.org/10.1111/iwj.12557>
- Elkhenany, H., El-Badri, N., & Dhar, M. (2019). Green propolis extract promotes in vitro proliferation, differentiation, and migration of bone marrow stromal cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 115, 108861. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108861>
- Eyng, C., Murakami, A., Ospina-Rojas, I., Pedroso, R., Silveira, T., & Lourenço, D. (2015). Effect of diet inclusion of ethanolic extract of propolis on broiler immunity. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(2), 185-192. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2015000200009>
- Farrér, R., Frasquet, I., & Sánchez, A. (2004). El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 45(1), 21-43. <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5105>
- Frykberg, R., & Jaminelli, B. (2015). Challenges in the treatment of chronic wounds. *Advances in wound care*, 4(9), 560-582. <https://doi.org/10.1089/wound.2015.0635>
- Fu, J., Huang, J., Lin, M., Xie, T., & You, T. (2020). Quercetin Promotes Diabetic Wound Healing via Switching Macrophages From M1 to M2 Polarization. *Journal of Surgical Research*, 246, 213-223. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.09.011>
- Guarín-Corredor, C., Quiroga-Santamaría, P., & Landínez-Parra, N. S. (2013). Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Revista de la Facultad de Medicina*, 61, 441-448. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112013000400014&nrm=iso
- Gunde, M. (2018). *Formulation and Evaluation of Topical Gel Containing Some Plant Enzymes for Wound Healing Activity* [Tesis Suresh Gyan Vihar University]. India. <http://hdl.handle.net/10603/212250>
- Harnaj, V., Technology, A. B., & Commission, E. S. (1978). *A Remarkable Hive Product, Propolis: Scientific Data and Suggestions Concerning Its Composition, Properties and Possible Use in Therapeutics*. Apimondia. https://books.google.com.mx/books/about/Propolis.html?id=Oy41twAACAAJ&redir_esc=y
- Huether, S. E., & McCance, K. L. (2015). *Understanding Pathophysiology*. Elsevier Health Sciences. <https://shop.elsevier.com/books/understanding-pathophysiology/huether/978-0-323-63908-8>
- Jacob, A., Parolia, A., Pau, A., & Davamani Amalraj, F. (2015). The effects of Malaysian propolis

- and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 15, 294. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0814-1>
- Karapetsas, A., Voulgaridou, G.-P., Konialis, M., Tsochantaridis, I., Kynigopoulos, S., Lambropoulou, M., Stavropoulou, M.I., Stathopoulou, K., Aligiannis, N., Bozidis, P., Goussia, A., Gardikis, K., Panayiotidis, M.I., & Pappa, A. (2019). Propolis Extracts Inhibit UV-Induced Photodamage in Human Experimental In Vitro Skin Models. *Antioxidants*, 8(5), 125. <https://doi.org/10.3390/antiox8050125>
- Lampugnani, M. G. (1999). Cell migration into a wounded area in vitro. *Adhesion protein protocols*, 177-182. <https://doi.org/10.1385/1-59259-258-9:177>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Rodríguez Pérez, B., Canales Martínez, M. M., Penieres Carrillo, J. G., & Cruz Sánchez, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, 30, e2435. <https://doi.org/10.15174/au.2020.2435>
- Sanchez M. C., Lancel S., Boulanger E., & Nevriere R. (2018). Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. *Antioxidants*. 7(8), 98. <https://doi.org/10.3390/antiox7080098>
- Schencke, C., Vásquez, B., Sandoval, C., & del Sol, M. (2016). El Rol de la Miel en los Procesos Morfofisiológicos de Reparación de Heridas. *International Journal of Morphology*, 34(1), 385-395. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000100056>
- Somerville, N. (2008). *Ethicon Wound Closure Manual* (Second ed.). Johnson & Johnson. https://anwresidency.com/simulation/guide/resources/Ethicon_Wound_Closure_manual.pdf
- Talla, E., Tamfu, A. N., Biyanzi, P., Sakava, P., Asobo, F. P., Mbafor, J. T., Tchuenguem, F.F., & Ndjouenkeu, R. (2014). Phytochemical screening, antioxidant activity, total polyphenols and flavonoids content of different extracts of propolis from Tekel (Ngaoundal, Adamawa region, Cameroon). *The Journal of Phytopharmacology*, 3(5), 321-329. https://www.phytopharmajournal.com/Vol3_Issue5_04.pdf
- Touzani, S., Embaslat, W., Imtara, H., Kmail, A., Kadan, S., Zaid, H., ElArabi, I., Badiaa, L., & Saad, B. (2019). *In Vitro* Evaluation of the Potential Use of Propolis as a Multitarget Therapeutic Product: Physicochemical Properties, Chemical Composition, and Immunomodulatory, Antibacterial, and Anticancer Properties. *BioMed Research International*, 2019, 4836378. <https://doi.org/10.1155/2019/4836378>
- Tresguerres, J., Villanúa, M., & Lopez, A. (2009). *Anatomía y fisiología del cuerpo humano*. Mc Graw Hill. <http://librodigital.sangregorio.edu.ec/librosusgp/B0041.pdf>
- Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., & Li, X. (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules*, 16(4), 3444-3455. <https://doi.org/10.3390/molecules16043444>