

## Tecnologías sustentables (microondas, ultrasonido y CO<sub>2</sub> supercrítico) para extracción de compuestos bioactivos en propóleo

## Sustainable technologies (microwaves, ultrasound and supercritical CO<sub>2</sub>) for the extraction of bioactive compounds

Javier A. Hernández-Martínez<sup>a</sup>, Abigail Reyes-Munguía<sup>b</sup>, Iridiam Hernández-Soto<sup>a</sup>, Armando Peláez-Acero<sup>a</sup> y Rafael G. Campos-Montiel<sup>a\*</sup>

### Abstract:

Propolis is a substance collected by bees. The propolis extract is of interest due to its great variety of bioactive compounds, for which sustainable technologies have been implemented to improve and potentiate the extraction, among which are ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. Being the ultrasound method the most used and it seems to be the optimal one for propolis extraction taking into account time and performance.

### Keywords:

Extraction, bioactive compounds, sustainable, technology

### Resumen:

El propóleo es una sustancia recolectada por las abejas. El extracto de propóleo es de interés por su gran variedad de compuestos bioactivos, para ello se han implementado tecnologías sustentables con el fin de mejorar y potencializar su extracción, entre las técnicas utilizadas se encuentran la extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas y la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Siendo el método de ultrasonido el más utilizado y parece ser el óptimo para la extracción de propóleo tomando en cuenta el tiempo y rendimiento.

### Palabras Clave:

Extracción, compuestos bioactivos, sustentable, tecnología

### Introducción

El propóleo es una sustancia recolectada y procesada por las abejas a partir de resinas excretadas de las yemas, hojas y exudados de plantas. El aspecto del propóleo es resinoso, el color puede ser rojo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, su sabor es amargo y olor dulce. Sus propiedades físicas y químicas

dependerán principalmente de las plantas que se encuentren cerca de la colmena.

Las plantas son consideradas “fabricas químicas verdes” debido a su gran diversidad en compuestos químicos. Las abejas concentran estos compuestos químicos en el propóleo otorgándole una variedad de propiedades y actividades biológicas.

En México la apicultura es una de las principales actividades pecuarias debido a su importancia

<sup>a</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Javier Alonso Hernández-Martínez, <https://orcid.org/0000-0002-9562-0207>, Email: [he467858@uaeh.edu.mx](mailto:he467858@uaeh.edu.mx); Armando Peláez-Acero, <https://orcid.org/0000-0001-7004-4824>, Email: [pelaeza@uaeh.edu.mx](mailto:pelaeza@uaeh.edu.mx); Iridiam Hernández-Soto, <https://orcid.org/0000-0002-0307-1651>, Email: [he245812@uaeh.edu.mx](mailto:he245812@uaeh.edu.mx); Rafael Germán Campos-Montiel, <https://orcid.org/0000-0001-7382-5538>, Email: [rcampos@uaeh.edu.mx](mailto:rcampos@uaeh.edu.mx)

<sup>b</sup>Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Abigail Reyes-Munguía, <https://orcid.org/0000-0002-2151-7979>, Email: [abigail.reyes@uaslp.mx](mailto:abigail.reyes@uaslp.mx)

<sup>c</sup>Universidad de la Cañada, Lucio González-Montiel, <https://orcid.org/0000-0001-6222-3259>, Email: [lucio.gonzalez@unca.edu.mx](mailto:lucio.gonzalez@unca.edu.mx)

\* Autor de Correspondencia: [rcampos@uaeh.edu.mx](mailto:rcampos@uaeh.edu.mx)

Fecha de recepción: 16/05/2022 Fecha de aceptación: 11/05/2022, Fecha de publicación: 15/05/2023

DOI: <https://doi.org/10.29057/icap.v9iEspecial.9260>

social y ecología, donde, la miel es el principal producto y los subproductos como el propóleo son menos conocidos y poco aprovechados. Se sabe que el propóleo es utilizado en diferentes regiones de México para picaduras, cicatrizar heridas, golpes, emplasto de hierbas curativas e infecciones respiratorias, de piel, oídos, intestinales, de encías y hongos. Actualmente se le atribuyen actividades biológicas, como; actividad antioxidante, antibacteriana, antimicótico, anticancerígena, antiséptico, antihemorrágico, antiviral, antiinflamatoria, entre otras, así como, propiedades inmunoestimulantes, hepatoprotectoras, y cicatrizantes. A pesar de la información mencionada son pocos los apicultores que aprovechan la utilidad del propóleo, por lo que es importante la investigación y conocer las diferentes técnicas de extracción.

El método de extracción del propóleo afecta el rendimiento y la calidad del extracto, los cuales están relacionados con el tipo de disolvente, la naturaleza y la preparación de la muestra. Otros factores que intervienen en la obtención de los compuestos bioactivos del propóleo son: temperatura, tiempo de extracción y relación del solvente.

Actualmente, es indispensable buscar tecnologías sustentables para la obtención de extractos de propóleo con un bajo consumo de energía y uso de solventes no tóxicos, o utilizarlos en cantidades mínimas, entre los disolventes propuestos, se encuentran el agua, fluidos supercríticos con CO<sub>2</sub> y agrosolventes. Con la implementación de estas tecnologías se obtienen extractos más seguros y de alta calidad, evitando el impacto a la salud humana y al medio ambiente.

La incidencia y propagación de nuevas enfermedades como el COVID-19, al igual que, la mejora hacia un estilo de vida natural y saludable, han aumentado el interés de las investigaciones de compuestos naturales y sus derivados. El uso de tecnologías sustentables para la obtención de extractos de propóleo juega un papel importante para el mejoramiento de propiedades y actividades biológicas.

En esta revisión se discute la información de los métodos de extracción sustentable y los resultados que se han reportado en la extracción del propóleo.

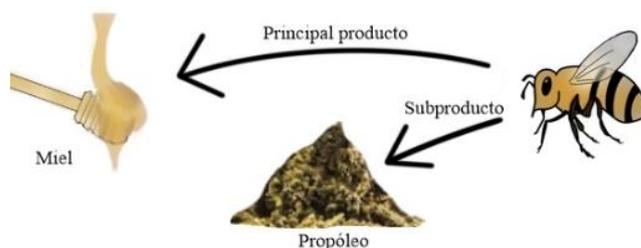


Figura 1. Propóleo.

## Tecnologías de extracción sustentables y verdes en la extracción de propóleo

El término “tecnologías verdes” hace referencia a que el proceso es amigable con el medio ambiente. El término “tecnologías sustentables”, considerando el significado de tecnología y sustentable, de acuerdo con la Real Academia Española, son el conjunto de técnicas que permiten el aprovechamiento práctico sustentado en el conocimiento científico.

Los métodos de extracción se pueden clasificar en dos grupos:

- Los métodos convencionales como: maceración, extracción por destilación, hidrodestilación, por arrastre con vapor, extracción soxhlet, lixiviación, infusión y extracción con solvente orgánico.

- Los métodos no convencionales o emergentes: microondas, extracción por altas presiones, extracción por ultrasonido y sistemas de puntos críticos.

En la extracción con técnicas convencionales, los compuestos bioactivos se degradan y pierden su funcionalidad, por factores como: temperatura elevada y el tiempo de extracción. En estos métodos los solventes más utilizados son compuestos orgánicos volátiles tóxicos, que presentan un impacto en la salud, la seguridad y el medio ambiente. Por lo que se busca que las tecnologías sean verdes y sustentables para la extracción de compuestos bioactivos.

Existen una variedad de propóleos con diferentes propiedades y actividades bioactivas de acuerdo con el lugar de procedencia. Por lo que la realización de extractos es una práctica muy habitual en diversas culturas, siendo la extracción por maceración la más utilizada, pero este tipo de extracción convencional es muy tardada.

## Métodos de Extracción

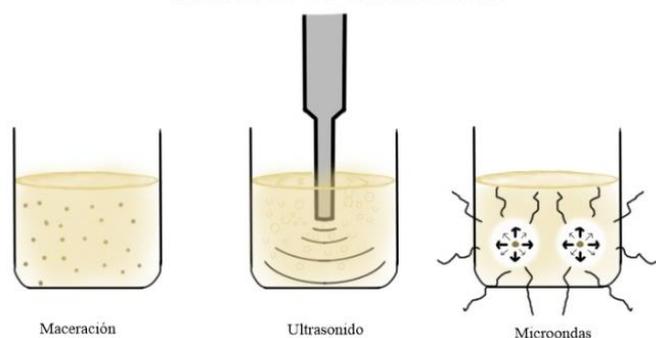


Figura 2. Principales métodos de extracción del propóleo.

### Extracción por ultrasonido

El ultrasonido consiste en ondas sónicas, el rango para el procesamiento de alimentos se encuentra entre 20 y 100 Hz. La extracción asistida por ultrasonido utiliza estas ondas sónicas, el fundamento de esta tecnología está basado en la transmisión de dichas ondas en un medio líquido, creando ciclos alternos de compresión y rarefacción, en los cuales, se forma una presión negativa que rompe el líquido para establecer vacío y posteriormente burbujas o cavidades. En las células, las ondas ultrasónicas causan la ruptura de su pared liberando sus componentes.

El estudio de la extracción por ultrasonido ha tomado relevancia en las últimas dos décadas, se ha demostrado que es un método eficaz, limpio, sencillo, rápido y verde. El ultrasonido destaca en comparación de los métodos convencionales por ser de baja inversión, tiempos de extracción más cortos, aumento en rendimiento, capacidad en la extracción compuestos bioactivos, sustancias de bajo peso molecular y otros metabolitos de las plantas.

La técnica de extracción ultrasónica ha tenido un gran impacto en la preparación de extractos de propóleo, siendo una alternativa propuesta en la norma NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones en su procesamiento. El etanol es el solvente más utilizado en distintas concentraciones.

Se han reportado la eficiencia y las condiciones óptimas para extracción por ultrasonido. Golmahi y colaboradores (2021), reportaron alto contenido fenólico y elevada actividad antioxidante en extracto de propóleo, utilizando una relación 1:10 con a una

temperatura de 34 °C y tiempo de 30 min en ondas ultrasónicas con una frecuencia constante de 35 kHz.

Rodríguez y colaboradores (2020), reportaron ocho propóleos obtenidos por ultrasonido de diferentes estados de la República Mexicana, los provenientes del Estado de México y Michoacán, presentaron una mayor cantidad flavonoides, mientras que los de Puebla, Guanajuato y Veracruz tenían menor cantidad de flavonoides y fenoles.

Para optimizar y garantizar la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos en una extracción por ultrasonido, se debe de conocer la relación frecuencia/potencia/tiempo de extracción/temperatura. De acuerdo con resultados obtenidos por Aboulghazi y colaboradores (2022), indicaron que el tiempo de sonicación, la concentración y la relación solvente/material fueron estadísticamente significativos y que pueden influir en las actividades químicas y biológicas del extracto de propóleo.

Hay áreas de oportunidad para seguir mejorando los extractos del propóleo, como lo hicieron Zainal y colaboradores en el 2021, al combinar la técnica de maceración y la de ultrasonido obteniendo mejores resultados. Otra oportunidad sería implementar la combinación de frecuencias, utilizando ultrasonido multifrecuencia en este tipo de muestras.

### Extracción asistida por microondas

Las microondas son campos electromagnéticos situados en un rango de 300 MHz a 300 GHz o entre la longitud de onda de 1 cm y 1 m del espectro electromagnético. Las ondas están formadas por dos campos: campo eléctrico y campo magnético. La extracción asistida por microondas utiliza estos campos electrostáticos. Este método se fundamenta en aplicar directamente las ondas en un material que puede absorber parte de la energía electrostática y transformarla en calor. La energía del microondas interactúa con los componentes polares que están presentes en el solvente para generar calor, por lo que, es importante los parámetros de constante dieléctrico y el factor de disipación. Los instrumentos de microondas usualmente utilizan una frecuencia de 2450 MHz, el cual, produce una energía entre 600 a 700 vatios.

La extracción por microondas tiene varias ventajas en comparación con los métodos convencionales

como son: tiempos más cortos de extracción, mayor redimiendo, utilización de menor cantidad de reactivos, una mayor selectividad de compuestos y un mayor nivel de automatización. El equipo que se utiliza no es convencional, debido a que tiene mayores medidas de seguridad, controladores de intensidad y temperatura, los costó varían de 90 a 300 mil pesos (MXN). Mientras que el ultrasonido es un método menos agresivo, los equipos de laboratorio de baño ultrasónico tiene un costo de 10 a 50 mil pesos (MXN).

Margeretha y colaboradores (2012), realizaron extractos de propóleo con el método de microondas, donde el tiempo de extracción, la concentración de etanol y los factores del instrumento de microondas influyen significativamente en el rendimiento de fenoles y flavonoides totales.

Pellati y colaboradores en el 2013, reportaron que el método de microondas en comparación con métodos tradicionales en extractos de propóleo principalmente reduce el tiempo y el uso de solventes. Además, indicaron que este método es equiparable con la extracción por ultrasonido y métodos convencionales.

Hamzah y Léo (2015) concluyeron que, la extracción asistida por microondas puede ser alternativa para procesar propóleos siempre que se controle la temperatura, de esta manera obtuvieron resultados óptimos a una temperatura máxima de 115 °C con una relación 1:5 (entre propóleo crudo y etanol 80%) y una potencia de microondas de 300 W durante 20 min.

### **Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico**

La extracción con fluidos supercríticos se caracteriza por utilizar solventes inertes y son considerados disolventes ecológicos "verdes", como son el CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> es uno de los más utilizados por sus características solvatantes, económicas y ecológicas, sin mencionar su accesibilidad y alta efectividad.

El dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>) se utiliza para obtener los componentes de una matriz, esto gracias a sus condiciones del cambio de fase a supercrítico (37 °C y baja presión), su afinidad con componentes polares como biomoléculas (proteínas, cadena de polisacáridos), los cuales se protegen de la desnaturalización durante el proceso de extracción. Las moléculas en condiciones CO<sub>2</sub>

supercrítico se comportan simultáneamente con una solubilidad de soluto similar al líquido y capacidad de difusión similar al gas, lo que facilita la penetración en estructuras y solubilidad en moléculas no polares.

Chen en 2009, realizó extractos de propóleo brasileño comparado los métodos de CO<sub>2</sub> supercrítico y Soxhlet, en donde el método CO<sub>2</sub> tuvo una extracción superior. También concluyó que el propóleo brasileño inhibió eficazmente el crecimiento de células cancerosas humanas.

Zordi y colaboradores (2014), optimizaron la extracción CO<sub>2</sub> supercrítico, utilizando propóleo italiano, teniendo como condiciones óptimas para un máximo rendimiento de 317 bar, 45 °C, y 6.5 horas. Además, Hacen una comparación con el método tradicional, concluyendo que, la extracción supercrítica produce buena cantidad de flavonoides y fenoles.

Santos y colaboradores (2021) concluyeron que el extracto de propóleo rojo y marrón de origen brasileño por CO<sub>2</sub> supercrítico presentó actividad antibacteriana contra *C. pseudotuberculosis* y puede evitar la formación de biopelícula de esta.

### **Conclusión**

El propóleo es un producto que brinda múltiples beneficios a la salud por la presencia de compuestos bioactivos, para poder obtenerlos es necesario el uso de métodos de extracción no convencionales, sustentables y amigables con el ambiente, porque permiten utilizar solventes no tóxicos y reducir el tiempo de extracción. Aunque la mayoría de los métodos brindan la calidad en el extracto, el más destacado es el de ultrasonido, ya que, brinda un mayor rendimiento y requiere baja inversión.

### **Referencias**

- [1] Robleda Sánchez M. G., Moo Huchin M. I., Kantún Ramírez M.A. *Progressio: perspectivas científicas del poniente de Yucatán*. 1<sup>o</sup> Edición. Editorial Pearson; 2019. 120–128 p.
- [2] Sosa López Á. A., Cabrera M. G., Álvarez M. Y. Parámetros físicos y características organolépticas de propóleos provenientes de la Provincia de Misiones, Argentina. *Journal of the Selva Andina Biosph.* 2017;5(1):51–58.
- [3] Vilorio B. J. D., Gil G. J. H., Durango R. D. L., Garcia P. C. M. Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del bajo Cauca Antioqueño (Antioquia, Colombia). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2012;10(1):77–86.
- [4] Niazian M. Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*. 2019 Apr 11; 249(4):953–73.

- [5] INEGI. Atlas Nacional de las Abejas y Derivados Apícolas [Internet]. 2018. Disponible en: <https://atlas-abejas.agricultura.gob.mx/cap4.html>
- [6] Herrera-López M. G., Calvo-Irabián L. M., Peña-Rodríguez L. M. El propóleo y su potencial económico como producto de la industria apícola. Desde el Herbario CICY. 2019; 11:190-4.
- [7] Sánchez Elizalde K. V., Marquéz Hernández I. Composición química y potencial biológico de una muestra de propóleos ecuatoriano. Universidad Técnica de Machala; 2017.
- [8] Anjum S. I., Ullah A., Khan K. A., Attaullah M., Khan H., Ali H., et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. Saudi Journal of Biological Sciences. 2019 Nov 1;26(7):1695-703.
- [9] Arias D. A. Efecto de dos tipos de secado en los compuestos antioxidantes de cáscara de papa (*Solanum tuberosum*) variedad diacolo capiro para la fabricación de una infusión. Ingeniería de Alimentos. 2018 Jan 1
- [10] Moreno Romero W., Velásquez I., Salinas N. Uso de aceites comestibles como solventes para la extracción de compuestos bioactivos: Una revisión (parte A). Revista Ciencia e Ingeniería. 2022; 43:41-52.
- [11] Godoy Cancho C. B. Composición bioactiva de materiales lignocelulósicos: Determinación de compuestos fenólicos y elagitaninos con propiedades antioxidantes y anticancerígenas mediante técnicas analíticas diversas. 2017
- [12] Khalifa S. A. M., Yosri N., El-Mallah M. F., Ghonaim R., Guo Z., Musharraf S. G., et al. Screening for natural and derived bio-active compounds in preclinical and clinical studies: One of the frontlines of fighting the coronaviruses pandemic. Phytomedicine. 2021 May 1; 85:153311.
- [13] Melo-Guerrero M. C., Ortiz-Jurado D. E., Hurtado-Benavides A. M., Melo-Guerrero M. C., Ortiz-Jurado D. E., Hurtado-Benavides A. M. Comparación de la composición y de la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos y otras técnicas verdes. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2020 Sep 1; 44(172):845-56.
- [14] Stashenko E., Martínez R. J., Castrillón J. Application of the matrix solid-phase dispersion method to hydrocarbon isolation from bituminous rocks. Boletín de Geología. 2014; 36:29-35.
- [15] Arana Torres N. M. Una revisión de los beneficios en la salud humana y métodos de extracción de compuestos bioactivos de *Vaccinium meridionale*. [Sullana, Perú]; 2021
- [16] Yara-Varón E., Li Y, Balcells M., Canela-Garayoa R., Fabiano-Tixier A. S., Chemat F. Vegetable Oils as Alternative Solvents for Green Oleo-Extraction, Purification and Formulation of Food and Natural Products. Molecules. 2017 Sep; 22(9):1474.
- [17] Robles-Ozuna L. E., Ochoa-Martínez L. A. Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. Rev. Iber. Tecnología Postcosecha. 2012;13(2):109-22.
- [18] Fernández Rivero D., Proaño Tapia J. K. Extracción asistida por ultrasonido de licopenos provenientes de residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) con capacidad antioxidante. [Ambato - Ecu]; 2021.
- [19] Rojas T., Fuentes Campos M. E., Contreras-López E., Gómez S., Muñoz-Jáuregui A. M. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de *Sanky* (*Corryocactus brevistylus*). Revista de la Sociedad Química del Perú. 2019 Apr;85.
- [20] Golmahi Z., Hossein Elhamirad A., Golmahi Z., Hossein Elhamirad A. Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolics and Antioxidants from Propolis for Stabilization of Sunflower Oil. Revista de Ciencias Agrícolas. 2021 May 7; 38(1):4-19.
- [21] Rodríguez Pérez B., Canales Martínez M. M., Penieres Carrillo J. G., Cruz Sánchez T. A., Rodríguez Pérez B., Canales Martínez M. M., et al. Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. Acta Univ. 2020; 30:1-30.
- [22] Ramón C., Gil-Garzón M. A., Ramón C., Gil-Garzón M. A. Efecto de los parámetros de operación de la extracción asistida por ultrasonido en la obtención de polifenoles de uva: una revisión. TecnoLógicas. 2021 Jun 18; 24(51):263-77.
- [23] Aboulghazi A., Bakour M., Fadil M., Lyoussi B. Simultaneous Optimization of Extraction Yield, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Moroccan Propolis Extracts: Improvement of Ultrasound-Assisted Technique Using Response Surface Methodology. Processes. 2022 Feb 2; 10(2):297.
- [24] Zainal W. N. H., Azian N. A. A., Albar S. S., Rusli A. S. Effects of extraction method, solvent and time on the bioactive compounds and antioxidant activity of *Tetrigona apicalis* Malaysian propolis. 2021;61(2):264-70.
- [25] Hu A. J., Hao S. T., Zheng J., Chen L., Sun P. P. Multi-Frequency Ultrasonic Extraction of Anthocyanins from Blueberry Pomace and Evaluation of Its Antioxidant Activity. J AOAC. 2021 Jun 12; 104(3):811-7.
- [26] Bagade S. B., Patil M. Recent Advances in Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Complex Herbal Samples: A Review. Crit Rev Anal Chem. 2021; 51(2):138-49.
- [27] Cahuana Pariona S. J. Efecto del solvente y tiempo en la extracción por microondas de glucosinolatos y compuestos fenólicos de *Mashua morada* (*Tropaeolum tuberosum*). [Huancayo-Perú]; 2020.
- [28] Pimentel-Moral S., Borrás-Linares I., Lozano-Sánchez J., Arráez-Román D., Martínez-Férez A., Segura-Carretero A. Microwave-assisted extraction for *Hibiscus sabdariffa* bioactive compounds. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2018 Jul 15;156:313-22.
- [29] Amarante S. J., Catarino M. D., Marçal C., Silva A. M. S., Ferreira R., Cardoso S. M. Microwave-Assisted Extraction of Phlorotannins from *Fucus vesiculosus*. Marine Drugs. 2020 Nov 15; 18(11).
- [30] Ávila W. Á., Vargas O. J. M., Bastidas L. M. M. Aplicación de un diseño factorial 2<sup>3</sup> en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas. 2019 Sep 1; 48(3):643-61.
- [31] Margeretha I., Suniarti D. F., Herda E., Masúd Z. A. Optimization and comparative study of different extraction methods of biologically active components of Indonesian propolis *Trigona* spp. Journal of Natural Products. 2012 Oct 10; 233-42.
- [32] Pellati F., Prencipe F. P., Bertelli D., Benvenuti S. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2013 Jul 1;81-82:126-32.
- [33] Hamzah N., Leo C. P. Microwave-Assisted extraction of trigona propolis: The effects of processing parameters. International Journal of Food Engineering. 2015 Dec 1; 11(6):861-70.
- [34] Barriga-Sánchez M., Churata Huanca A., Tinoco Gómez Ó. Optimización del rendimiento de la extracción de aceite de semillas de *Vitis vinifera* con CO<sub>2</sub> supercrítico. Revista de la Sociedad Química del Perú. 2018; 84(2):217-27.
- [35] Bankova V., Trusheva B., Popova M. Propolis extraction methods: a review. 2021; 60(5):734-43.
- [36] Kim B. S., Kim J. U., So K. H., Hwang N. S. Supercritical Fluid-Based Decellularization Technologies for Regenerative Medicine Applications. Macromolecular Bioscience. 2021 Aug 1; 21(8).
- [37] Chen C. R., Lee Y. N., Lee M. R., Chang C. M. J. Supercritical fluids extraction of cinnamic acid derivatives from Brazilian propolis and the effect on growth inhibition of colon cancer cells. J Taiwan Inst Chem Eng. 2009 Mar 1;40(2):130-5.

- [38] De Zordi N., Cortesi A., Kikic I., Moneghini M., Solinas D., Innocenti G., et al. The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from Propolis: A central composite design approach. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2014 Nov 1; 95:491–8.
- [39] Santos L. M., Rodrigues D. M., Kalil M. A., Azevedo V., Meyer R., Umsza-Guez M. A., et al. Activity of Ethanolic and Supercritical Propolis Extracts in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and Its Associated Biofilm. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021 Sep 1; 8:965. Haga clic o pulse aquí para escribir texto.