**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

# Caracterización química y actividad biológica de extractos etanólicos de propóleo del estado de Sinaloa

# Tesis

Que presenta

**IBT. PERLA DINORAH GARAY RENTERIA**

Para obtener el Grado de

**MAESTRA EN CIENCIA**
**Y**
**TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Directores

**DRA. GABRIELA LÓPEZ ANGULO**

**DR. FRANCISCO DELGADO VARGAS**

**Culiacán de Rosales, Sinaloa, México  Mayo de 2018**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos y la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”, ambos de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La investigación fue dirigida por los doctores Gabriela López Angulo y Francisco Delgado Vargas y asesorada por el Dr. José Ángel López Valenzuela. Esta investigación contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Asimismo, se agradece la beca otorgada por CONACYT a Perla Dinorah Garay Renteria.

# *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA*

## *CARTA CESION DE DERECHOS*

En la Ciudad de _Culiacán de Rosales, Sinaloa el día __21__ del mes __Mayo__ del año _2018, el (la) que suscribe _Perla Dinorah Garay Renteria_ alumno (a) del Programa de _Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos_ con número de cuenta _____, de la Unidad Académica _Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de __Gabriela López Angulo y Francisco Delgado Vargas_ y cede los derechos del trabajo titulado "CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO DEL ESTADO DE SINALOA", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Perla Dinorah Garay Renteria

Nombre completo y firma

## AGRADECIMIENTOS

A la vida, que me ha dado tanto… y permitirme seguir haciendo lo que más me gusta.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por abrirme las puertas de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas y a la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos por permitirme desarrollar este proyecto

Especialmente al Dr. Francisco Delgado, por permitirme ser parte de la familia LQPN y por jugársela con este proyecto tan importante para mí. Agradezco su dedicación, paciencia, tiempo y lecciones trasmitidas durante todo este periodo. Admiro su disciplina y pasión que expresa por su trabajo.

A la Dra. Gabriela, por ser el mejor látigo; además debo expresar mi enorme gratitud y respeto, por compartirme sus conocimientos, experiencia y paciencia. Es una excelente profesional y amiga, un gran ejemplo a seguir. Que su estrella siga brillando por siempre.

A los apicultores Eliakín Garay, Jorge Osuna, Luis Osuna, César Gaxiola, Rogelio Macedo por su importante colaboración en la aportación del material de estudio, por todas las facilidades brindadas durante los muestreos. Por ser parte de este pequeño gran proyecto.

A mis compañeros y ahora mis amigos del Laboratorio de Química de Productos Naturales; a los que aún están… Belinda, María, Sandra, Almita y

especialmente a Alejandro; y a los que ya no están… Alma, Gisela, Pedro. Por los buenos momentos que pasamos, por su amistad y cariño.

A Brisceida, mi compañera de maestría y mi amiga, por brindarme su amistad, sus consejos y cariño.

A los que siempre están cerca en los momentos adecuados, por ser mis mejores amigos, Pablo y Claudio, por su valioso apoyo durante todo este largo proceso; son excelentes personas.

A los doctores José Ángel López Valenzuela, Julio Montes Ávila y Juan Fernando Pío León por su apoyo en la revisión y recomendaciones aportadas al escrito.

Al personal de la Unidad de Investigación en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”, encabezado por la Dra. Sylvia Páz Díaz Camacho, por permitir la realización de una parte importante de esta investigación en sus instalaciones.

Al Dr. Ignacio Osuna, por su valioso apoyo y asesoría en la sección estadística.

Y por último y más importante, a mi hermosa familia. A mi padre, por ser la inspiración que me llevó a hacer esta investigación, por heredarme un poquito de esa pasión que usted tiene por su trabajo. A mi madre, por ser mi impulso, y la que me hecha porras para seguir adelante y más adelante. A mi hermana Gissel, por siempre estar, y siempre cargar con mi “bendi” para todos lados. A mi hermano Eliakín y su esposa Pamela, que me

dieron el regalo de ser tía de dos hermosas criaturas: Mateo y Valeria. Y a mi linda niña, mi Poh… Sofía, el motivo de mi vida. ¡Son maravillosos, LOS AMO!

# ÍNDICE

**ÍNDICE DE FIGURAS** **v**

**ÍNDICE DE CUADROS** **vi**

**I RESUMEN** **1**

**ABSTRACT** **4**

**II INTRODUCCIÓN** **6**

**III REVISIÓN DE LA LITERATURA** **9**

A PROPÓLEO 9

1 Generalidades 9

2 Historia antigua 9

3 Características físicas del propóleo 10

4 El propóleo en la colmena 11

a Partes de la colmena 11

b Recolección del propóleo por el apicultor 12

5 Importancia económica 12

a Producción en el mundo 12

b Producción en México 15

6 Normas oficiales para evaluar la calidad del propóleo 17

7 Origen botánico y composición química 18

B PROPIEDADES Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL PROPÓLEO 21

a Actividad antioxidante 26

b Actividad antimutagénica 27

c Inhibición de α-glucosidasa 29

d Actividad anti-infecciosa 31

C TIPO DE VEGETACIÓN EN SINALOA 32

**IV JUSTIFICACIÓN 35**

**V OBJETIVOS 36**

A OBJETIVO GENERAL 36

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS 36

**VI MATERIALES Y MÉTODOS 37**

A MATERIALES 37

1 Colección de las muestras de propóleo 37

2 Microorganismos 40

3 Reactivos 40

B MÉTODOS 40

1 Caracterización fisicoquímica del propóleo crudo 40

a Humedad 41

b Cenizas 41

c Sustancias extraíbles en *n*-hexano (ceras) 42

d Resinas solubles en etanol 43

e Impurezas mecánicas 44

f Índice de oxidación 44

g Espectro de absorción de radiación ultravioleta 45

2 Obtención de extractos etanólicos de propóleo (EEP) 45

3 Análisis de composición de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) 46

a Cuantificación de fenólicos totales 46

b Cuantificación de flavonoides 47

c Identificación y cuantificación de componentes individuales de los EEP por CG-EM 47

4 Métodos de evaluación de actividad biológica 48

a Actividad antioxidante 48

1) Método del radical ABTS 49

2) Método del radical DPPH 49

3) Método ORAC 50

b Actividad antimutagénica 52

1) Ensayo de mutagenicidad/antimutagenicidad 52

2) Construcción de la curva dosis-respuesta 53

3) Preparación de la mezcla de cofactores 53

4) Ensayo de microsuspensión 53

c Actividad inhibitoria de $\alpha$-glucosidasa 55

5 Análisis estadístico 56

**VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN 57**

A CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS PROPÓLEOS CRUDOS 57

B RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN 62

C ACTIVIDADES BIOLÓGICAS 63

1 Actividad antioxidante 63

2 Actividad inhibitoria de la enzima α-glucosidasa 65

3 Actividad antimutagénica 66

D COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO 72

1 Fenólicos totales 72

2 Flavonoides 74

E ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA con COMPUESTOS FENÓLICOS totales y flavonoides totales 75

F IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPONENTES INDIVIDUALES POR CG-EM 78

G RECURSOS BOTÁNICOS 85

**VIII CONCLUSIONES 90**

**PERSPECTIVAS 92**

**IX BIBLIOGRAFÍA 93**

**ABREVIATURAS 117**

**ANEXOS 120**

## ÍNDICE DE FIGURAS


| Figura | Descripción | Pág. |
|---|---|---|
| 1 | Partes de una colmena artificial | 13 |
| 2 | Métodos de recolección de propóleos. | 14 |
| 3 | Producción de polen y propóleos en México | 16 |
| 4 | Zonas de recolección del propóleo. | 38 |
| 5 | Capacidad antioxidante ORAC expresada como área bajo la curva (AUC) de una muestra analizada. | 51 |
| 6 | Espectro de absorción UV-Vis, representativo de cada región, de extractos etanólicos de propóleos. | 59 |
| 7 | Curva dosis-respuesta de la mutagenicidad del 1-nitropirteno (1-NP) en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium YG1024. | 69 |
| 8 | Cromatogramas de gases-masas de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) de Sinaloa sin derivatizar, zonas (A) norte, (B) centro y (C) sur. | 79 |
| 9 | Cromatogramas de gases-masas de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) de Sinaloa derivatizados, zonas (A) norte, (B) centro y (C) sur. | 80 |

## ÍNDICE DE CUADROS


| Cuadro | Descripción | Pág. |
|---|---|---|
| 1 | Composición química y origen botánico de propóleos de diversas regiones del mundo. | 22 |
| 2 | Actividades biológicas de compuestos identificados en propóleos.[a] | 33 |
| 3 | Lugar de procedencia del propóleo colectado en Sinaloa y el tipo de vegetación predominante (recursos botánicos) en las zonas de muestreo. | 39 |
| 4 | Caracterización fisicoquímica de propóleos crudos de las tres regiones recolectadas de Sinaloa. | 58 |
| 5 | Actividad antioxidante de extractos etanólicos de propóleos (EEP) del estado de Sinaloa mediante los métodos ABTS, DPPH y ORAC.[1] | 64 |
| 6 | Concentración de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) que inhiben el 50% de la actividad de la enzima α-glucosidasa ($IC_{50}$). | 67 |
| 7 | Toxicidad/mutagenicidad de los extractos etanólicos de propóleo (EEP) de tres zonas de Sinaloa (Norte, N; Centro, C; Sur, S).[1] | 68 |
| 8 | Actividad antimutagénica de los extractos etanólicos (EEP) de propóleo de Sinaloa.[1] | 70 |
| 9 | Contenido de fenólicos y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de Sinaloa. | 73 |

10 Correlación de la actividad antioxidante, antimutagénica e inhibitoria de α-glucosidasa con el contenido de fenólicos totales y flavonoides totales. 76

11 Principales componentes químicos de los extractos etanólicos de propóleo (EEP) de diferentes zonas de Sinaloa (Norte, N; Centro, C; y Sur, S), sin derivatizar, determinados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).[1] 82

12 Principales componentes químicos de los extractos etanólicos de propóleo (EEP) de diferentes zonas de Sinaloa (Norte, N; Centro, C; y Sur, S), derivatizados, determinados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).[1] 83

13 Número de especies de las principales familias de plantas representadas en las áreas de estudio. 86

# I RESUMEN

El propóleo tiene múltiples usos en la medicina tradicional de culturas de todo el mundo y es una materia prima común en la industria farmacéutica, cosmetológica y alimentaria. Presenta una composición química compleja que depende de la diversidad florística en la zona del apiario. Sinaloa es un estado rico en biodiversidad y la agricultura es una de las principales actividades económicas, a las que se ha aunado una actividad apícola incipiente y principalmente enfocada a la polinización de cultivos y producción de miel, a pesar de que el propóleo es el producto de mayor valor económico de un apiario. En este contexto, los estudios sobre propóleos de Sinaloa son inexistentes y el presente trabajo es el primero en caracterizar fisicoquímicamente propóleos de tres zonas del estado de Sinaloa (norte, N; centro, C; y sur, S) y la caracterización química y biológica de los Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP). A los propóleos se les determinó la calidad fisicoquímica de acuerdo con lo establecido en la norma argentina IRAM-INTA 15935-1. Los propóleos se extrajeron con etanol al 70% para obtener los EEP y se les determinó el contenido de fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu (FT) y de flavonoides totales (FvT) por el método del $AlCl_3$; así como la composición química por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). Asimismo, se evaluaron actividades biológicas de los EEP: antioxidante (AA) por los métodos ABTS, DPPH y ORAC; inhibitoria de α-glucosidasa; y actividad antimutagénica por el ensayo de Ames. Tres de los siete parámetros de calidad fisicoquímica evaluados cumplieron con la norma IRAM-INTA 15935-1: humedad

(4.47% - 6.27%), cenizas (3.54% - 3.95%), e índice de oxidación (3.6 s - 16.7 s). Los EEP de las tres regiones estudiadas presentaron alto contenido de FT (315.65 - 285.15 mg EAG/g EEP), siendo mayor en los propóleos de la región sur. El contenido de FvT osciló entre 70.23 y 39.28 mg EQ/g EEP, donde la región C presentó el mayor contenido y la región S la menor concentración. Los EEP-S presentaron la mayor AA como equivalentes de Trolox (µmol ET/g EEP) en los ensayos DPPH (1509) y ABTS (4250), mientras que los EEP-N destacaron en ORAC (9412). El análisis por CG-EM indicó la presencia de una mayor diversidad de compuestos para las muestras del EEP-N y EEP-S, aunque la zona sur presentó una menor diversidad de plantas. Algunos de los compuestos identificados en los EEP tienen registradas actividades biológicas; *e.g.*, alcaloides (morfina y tetrahidrocanabinol) y terpenos (*e.g.*, lupeol y amirina). Los EEP de Sinaloa mostraron mayor actividad inhibitoria de $\alpha$-glucosidasa ($IC_{50}$ 0.99-1.44 mg/mL) que acarbosa (3.05 mg/mL) y tienen potencial para ser usados en el tratamiento de la diabetes. Los EEP (250 µg/placa) no fueron tóxicos ni mutagénicos, inhibieron la mutagenicidad del 1-nitropireno (64-71%) y tienen potencial como agentes anticarcinogénicos. Los resultados muestran que las condiciones de producción de propóleos en Sinaloa deben mejorarse para que cumplan las normas de calidad internacionales y que se conviertan en una fuente de ingresos para los apicultores. Asimismo, es pertinente continuar con la caracterización química y de actividad biológica de los propóleos de Sinaloa, haciendo especial énfasis en las evaluaciones *in vivo* para evidenciar de mejor

manera su potencial en la prevención/ tratamiento de enfermedades infecciosas y crónico degenerativas.

## ABSTRACT

Propolis has been used in traditional medicine by many cultures around the world and nowadays is commonly employed as raw ingredient in different industries (*i.e.*, pharmaceutical, cosmetology and alimentary). The chemical composition of propolis is complex and depends on the floristic diversity around the apiary. Sinaloa is rich in biodiversity and agriculture is one of the most important economical activities. On the other hand, apiculture is incipient in Sinaloa and mainly focused on crop pollination and honey production, even though of propolis is the bee product of highest economic value of the apiary. In this regard, studies about propolis of Sinaloa are inexistent and this is the first research that characterizes propolis from three regions of Sinaloa (north, N; center, C; and south, S), as well as their corresponding ethanol extracts (EEP). The physicochemical quality of the propolis was determined according to the Argentine Official Standard IRAM-INTA 15935-1. The propolis were extracted with 70% ethanol to obtain the EEP which were measured for their total phenolics (TP) by the Folin-Ciocalteu method, total flavonoids (TF) by the $AlCl_3$ method, and chemical composition by gas chromatography – mass spectrometry (CG-EM). Some biological activities of the EEP were also evaluated: antioxidant (AA) by three methods (*i.e.*, ABTS, DPPH and ORAC); α-glucosidase inhibition; and antimutagenic by the Ames assay. Three out of the seven evaluated parameters agreed with the official standard IRAM-INTA 15935-1: moisture (4.47% - 6.27%), ash (3.54% - 3.95%), and oxidation index (3.6 s - 16.7 s). The EEP of the three regions showed high content of TP (315.65 - 285.15 mg EAG/g EEP), being the

highest for those of the south. The TF of the EEP varied from 70.23 to 39.28 mg EQ/g EEP; the highest and lowest TF contents were observed in EEP of the center and south, respectively. The EEP-S showed the highest AA as Trolox Equivalents (μmol TE/g EEP) measured by the DPPH (1509) and ABTS (4250) assays, whereas the highest ORAC value was observed in the EEP-N (9412). CG-EM analysis showed a large diversity of compounds for the EEP-N and EEP-S samples, in spite of the lowest plant diversity registered for the south region. Some biological activities have been previously registered for several of the compounds identified in the EEP samples; *e.g.*, alkaloids (morphine and tetrahydrocannabinol) and terpenes (*e.g.*, lupeol and amyrin). The EEP from Sinaloa were better inhibitors of the α-glucosidase enzyme ($IC_{50}$ 0.99-1.44 mg/mL) than acarbose (3.05 mg/mL), and they have potential to be used for the treatment of diabetes. The EEP (250 μg/plate) were neither toxic nor mutagenic against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium YG1024 and inhibited the mutagenicity of 1-nitropyrene (64-71%), suggesting they have potential as anticarcinogenic agents. The results showed that the production conditions of propolis must be improved to meet the international official standards and to increase the income of the beekeepers. In addition, further studies about the chemical and biological characterization of propolis from Sinaloa are required, focusing on *in vivo* evaluations to prove their utility for the prevention/ treatment of infectious and chronic degenerative diseases.

# II INTRODUCCIÓN

El propóleo es un material resinoso elaborado por las abejas (*Apis mellifera L.*) de materiales recolectados de plantas (de Groot 2013); posee una composición química compleja y es utilizado por las abejas para la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena (Farré y col 2004). El propóleo es un remedio natural usado por el hombre desde hace más de 2000 años y no se han registrado efectos secundarios adversos; su composición química depende de la zona geográfica donde se localice la colmena, puesto que está asociada al tipo de flora donde las abejas liben (Alencar y col 2005; Trusheva y col 2006; Barrientos y col 2013; Bertrams y col 2013); Trusheva y col 2006; Barrientos y col 2013; Bertrams y col 2013). Los principales tipos de componentes químicos identificados en el propóleo han sido cetonas, aldehídos, aminoácidos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, cumarinas, sesquiterpenos, quinonas y compuestos inorgánicos (Chaillou y Nazareno 2009; Palomino-García y col 2009). Las principales clases de compuestos encontrados en el propóleo se han asociado con actividades biológicas de importancia para el hombre (*e.g.,* antiinflamatoria, antibacteriana, anticancerígena, antidiabética y antioxidante (Paulino y col 2003; Zhu y col 2011; Jagua-Gualdrón 2012; Daleprane y Abdalla 2013; Kasote y col 2015). Al respecto, diversos estudios se han enfocado en caracterizar la actividad antioxidante del propóleo y evaluar su contribución en la eliminación del exceso de radicales libres (RL). El exceso de estos radicales define el estrés oxidativo en los organismos y conduce al desarrollo de

enfermedades entre las que se incluyen las crónico-degenerativas (*e.g.,* cáncer, diabetes) y que son las principales causa de muerte en México y el mundo.

El mercado mundial del propóleo es muy amplio, principalmente por los beneficios a la salud asociados a su consumo. Esto ha implicado el desarrollo de normas oficiales para el control de calidad y estandarización de este producto; por ejemplo, la norma IRAM, del Instituto Argentino de Normalización – Subcomité de Productos Agroalimentarios del NOA-2008 (Palomino-García y col 2009).

Sinaloa cuenta con gran parte de la riqueza florística de México, por lo que tiene un gran potencial para el desarrollo de la apicultura y la producción de propóleo. Sin embargo, esta característica no ha sido aprovechada debidamente y, a la fecha, nuestro país no cuenta con los lineamientos adecuados que establezcan las pautas para impulsar el desarrollo de la actividad apícola. Asimismo, estudios de calidad y de caracterización químico-biológica de propóleos de México y Sinaloa son prácticamente inexistentes. A finales del 2017, el Diario Oficial de la Federación (DOF) publicó una normativa para evaluar la calidad fisicoquímica de propóleos mexicanos, la cual se apoya de normas internacionales para sustentar sus especificaciones (DOF 2017).

A pesar de que la evidencia señala que el consumo de propóleo ayuda al mantenimiento de la salud, la información científica acerca del propóleo del estado de Sinaloa es inexistente. Es por todo lo anterior mencionado que en esta investigación se busca establecer por primera vez la caracterización fisicoquímica

y biológica de propóleos sinaloenses, lo que en un futuro podría contribuir a mejorar las condiciones de producción y las ganancias generadas para los apicultores.

# III REVISIÓN DE LA LITERATURA

## A PROPÓLEO

### 1 Generalidades

Entre los productos que se pueden obtener de la colmena se encuentran la cera, la miel, la jalea real y el propóleo. Este último tiene una composición compleja que le confiere una variedad de propiedades biológicas de gran interés para fines terapéuticos.

La palabra *própolis* proviene del Griego *pro* = antes y *polis* = ciudad, que se traduce como al frente de la ciudad o defensor de la ciudad (Castaldo y Capasso 2002), lo cual se adapta bien al papel protector del propóleo en la colmena (Bogdanov 2015). El propóleo es un material resinoso colectado de recursos vegetales por las abejas (*e.g.*, *Apis mellifera* L*., Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula*) (Fernandes y col (2001). La materia prima que utilizan las abejas para producir el propóleo incluye metabolitos generados en diferentes partes de las plantas (*e.g.*, productos de secreción, exudado de heridas, materiales lipofílicos de hojas, mucílagos, gomas y resinas). La especie *Apis mellifera* obtiene sus propóleos a partir de diversas especies vegetales tales como olmo, álamo, sauce, abedul, castaño de indias, pino, abeto, roble y algunas herbáceas (Farré y col 2004). Los materiales colectados son mezclados con la enzima β-glucosidasa de la saliva de las abejas, parcialmente digeridos y adicionados con cera para la obtención del producto final (de Groot 2013).

### 2 Historia antigua

El propóleo o “penicilina rusa” es conocido por el hombre desde tiempos remotos. La referencia más lejana data del antiguo Egipto, donde los egipcios lo empleaban para elaborar vasos y otros ornamentos, además de utilizarlo para aliviar muchas dolencias (Kuropatnicki y col 2013). Los egipcios también lo emplearon para embalsamar los cuerpos de los faraones; técnica que aprendieron de las abejas, las cuales cubren con propóleo y cera los cadáveres de invasores que no pueden ser transportados fuera de la colmena (Ara-Roldán 2004; Kuropatnicki y col 2013). Por su parte, los antiguos judíos consideraban al propóleo como una medicina (Kuropatnicki y col 2013). Más tarde los griegos lo utilizaron como ingrediente principal del “*polyanthus”*, perfume que combinaban con propóleo, olíbano, benzoina de *Styrax* y hierbas aromáticas (Bogdanov 2015). El propóleo fue mencionado en Grecia por Aristóteles, en su historia de *animalium*, y lo consideraba como un remedio para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones. Además, el propóleo se empleó masivamente durante la guerra en África del Sur, en el tratamiento de heridas infectadas y como cicatrizante, razón por la cual su uso se ha mantenido hasta el día de hoy (Luna-Limaico 2011).

Actualmente, herbolarios modernos recomiendan el propóleo por sus propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales, hepatoprotectoras y antiinflamatorias, que incrementan de manera natural la resistencia a infecciones y para tratar úlceras gastroduodenales (Castaldo y Capasso 2002).

## 3 Características físicas del propóleo

El propóleo pude presentar colores que van del amarillo al castaño oscuro, propiedad que varía con su origen botánico y época de recolección. El sabor ha sido descrito como amargo, ligeramente picante o insípido (Farré y col 2004). Es soluble en alcohol, éter, amonio y benceno-cloroformo. El solvente más utilizado para la extracción comercial es el alcohol etílico (Rios y col 2014).

El propóleo almacenado a 20 – 45 °C presenta una consistencia suave, flexible y adhesiva, que al enfriarse alrededor de los 15 °C se vuelve duro y quebradizo. A temperaturas arriba de 45 °C su consistencia es más pegajosa y aproximadamente a 60 °C se vuelve líquido; en algunos casos son líquidos hasta los 100 °C. Después de almacenar el propóleo a temperaturas de congelación no recupera sus características (Luna-Limaico 2011).

## 4 El propóleo en la colmena

En el interior de la colmena las abejas utilizan el propóleo con diversos fines entre los que se pueden mencionar cerrar grietas, reducir al mínimo las vías de acceso, recubrir y aislar restos de animales que se hayan introducido en la colmena, y barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes (Chaillou y col 2004).

### a Partes de la colmena

La colmena artificial tiene medidas optimizadas para aumentar la productividad de la industria apícola. La madera es el material preferido para construirla y consta de partes diseñadas para facilitar la cría, el control, el transporte, y la cosecha de los productos recolectados o secretados por las

abejas. La ranura o el orifico de entrada y salida de las abejas se conoce como piquera. Generalmente, la cámara de cría está separada de las alzas o la cámara de reservas. La colmena artificial presenta un piso y un techo, y puede haber tapas intermedias conocidas como entretecho (**Figura 1**) (Vit 2004).

### b Recolección del propóleo por el apicultor

El método tradicional para colectar el propóleo de la colmena se conoce como “raspado” y consiste en raspar las paredes internas de la colmena con ayuda de una espátula. Sin embargo, mediante esta técnica se obtienen impurezas y contaminantes tales como metales pesados (plomo, hierro y cobre), así como restos de madera e insectos. Por lo anterior se han desarrollado otros métodos de recolección, entre los más utilizados se encuentran las mallas y rejillas, dispositivos colocados debajo de la tapa de la colmena (**Figura 2**) (Martínez y col 2012).

## 5 Importancia económica

El valor comercial del propóleo depende de su calidad, la cual se establece con base en normas oficiales. El propóleo brasileño se cotiza entre 25 - 100 dólares por kilogramo de producto (Valles-Peticholi 2015) y el mexicano entre 300-700 pesos por kilogramo de producto bruto. El precio del propóleo procesado en forma de extracto oscila alrededor de los 2500 a 3000 pesos/L, de acuerdo a los precios registrados en el mercado local (Mercado Libre 2018).

### a Producción en el mundo

Los principales países productores de propóleo son China (≅300 toneladas/ año),

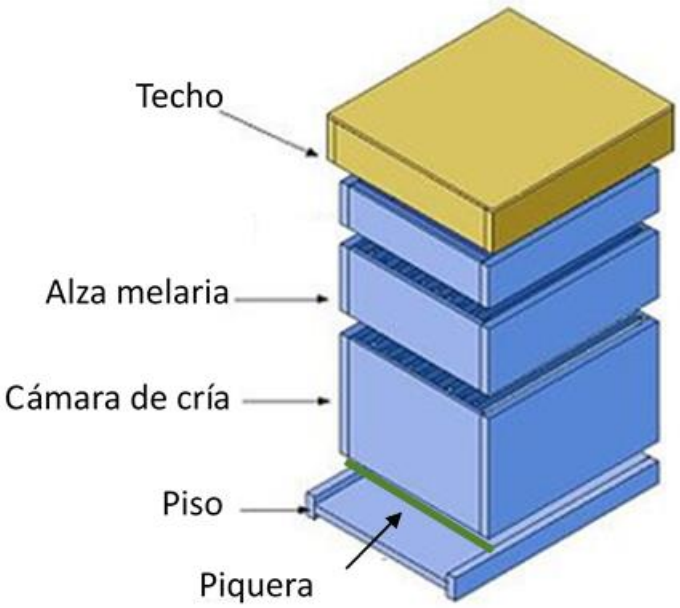


**Figura 1.** Partes de una colmena artificial

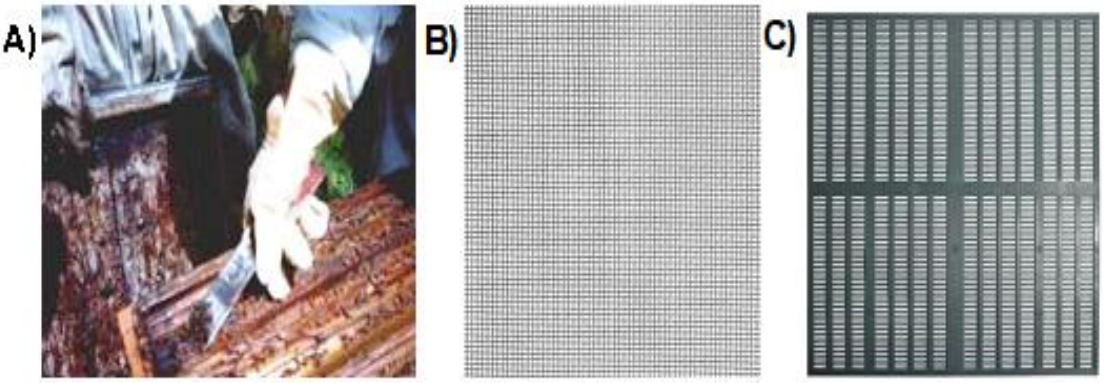


**Figura 2.** Métodos de recolección de propóleos. A) raspado; B) malla; C) rejilla

Brasil (≅ 100 toneladas/ año), Argentina, Cuba, Chile, Uruguay y Canadá; en tanto que los principales importadores son Dinamarca, Francia, Alemania y Hungría (SAGARPA 2010).

**b Producción en México**

Aunque México ocupa el quinto lugar de producción de miel, el mercado del propóleo es limitado. En el 2014 se produjeron más de 60000 toneladas de miel, con una ganancia mayor a 2000 millones de pesos (SIAP 2004), mientras que de propóleos se obtuvieron únicamente 7 toneladas (Toche 2015). Actualmente, la producción de propóleos es un área de oportunidad para incrementar los ingresos de los productores, ante un mercado interno en crecimiento y en el cual aún no se ha alcanzado la autosuficiencia de México (Martínez de Leo y col 2010) (**Figura 3**). En el estado de Sinaloa se reportó una producción de miel de 194 toneladas para el año 2016 (SIAP 2016) pero no existen reportes estadísticos acerca de su producción de propóleo.

El propóleo es el producto del colmenar con mayor valor económico. En México este potencial no ha sido explotado adecuadamente, considerando su infraestructura, recursos humanos y naturales. Datos de SAGARPA (2010) muestran que en México sólo algunos apicultores e industriales producen propóleo. Esto se debe principalmente al tipo de apicultura practicado en nuestro país, que básicamente se enfoca a la miel. Adicionalmente, la mayoría de los apicultores mexicanos requieren de mayores habilidades técnicas y conocimientos sobre las propiedades del propóleo para fomentar su producción y

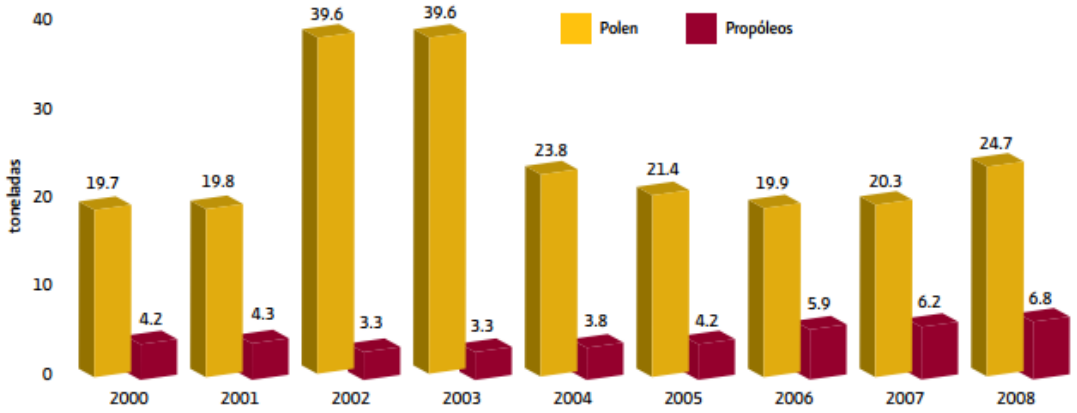


**Figura 3.** Producción de polen y propóleos en México

Fuente: Martínez de Leo y col (2010)

comercialización. Lo anterior aunado a que no existen empresas nacionales que se interesen en la producción de propóleo de calidad mundial y de alto valor comercial. Al respecto, el generar información sobre la composición química y actividades biológicas distintivas del propóleo de Sinaloa podría contribuir a explotar de mejor manera este recurso en esquemas que contribuyan a la sustentabilidad en el uso de los recursos del estado.

## 6 Normas oficiales para evaluar la calidad del propóleo

Para dictaminar la calidad del propóleo se determinan características sensoriales (*e.g.,* color, olor, sabor y consistencia) y fisicoquímicas (*e.g.,* humedad, cenizas, ceras, impurezas mecánicas, compuestos fenólicos, flavonoides, índice de oxidación y espectro de absorción UV-Vis) (Palomino-García y col 2010). En México, el DOF (2015) informó que para fines de 2015 se tendría la norma de calidad para el propóleo; sin embargo, dicha norma fue publicada hasta finales del 2017 (DOF 2017). Por lo anterior, en la determinación de calidad de propóleo se han tomado como base diferentes normas internacionales, entre las que se incluyen la norma IRAM, del Instituto Argentino de Normalización – Subcomité de Productos Agroalimentarios del NOA-2008 (IRAM-INTA 15935-1 2008), la Norma Ramal del Ministerio de Agricultura de Cuba-1994, la Norma Ramal Rusa RST 317-1977, y el Reglamento Técnico para la Fijación de Identidad y Calidad de Propóleos del Ministerio de Agricultura de Brasil-1999 (Palomino-García y col 2010).

Con respecto a los estudios sobre la determinación de la calidad del propóleo, Woisky y Salatino (1998) propusieron métodos de control basados en la determinación de sus propiedades fisicoquímicas y aplicaron una metodología para establecer los perfiles químicos de extractos etanólicos absolutos y acuosos (70%) de propóleos brasileños, en los que se logró obtener una mejor extracción de compuestos fenólicos y menor cantidad de cera en el extracto. Por su parte, Maldonado (2000) determinó características fisicoquímicas y organolépticas de propóleos argentinos con la finalidad de estandarizar y normalizar este producto; dentro de sus resultados destacaron la importancia de un elevado contenido de compuestos fenólicos y flavonoides.

Hernández y col (2005) determinaron las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de propóleos recolectados en la provincia de Ñuble, VIII región de Chile; las muestras del sector costero presentaron mayor calidad, así como un alto contenido de flavonoides. En general, todas las regiones cumplieron con la normativa establecida por el Ministerio de Agricultura de Brasil, entre las que se incluyen humedad menor a 8% y contenido de fenólicos totales mayor a 5%.

## 7 Origen botánico y composición química

La zona de recolección está comúnmente ligada a la calidad del propóleo, debido a que la flora contribuye a muchas de sus propiedades físicas como el color, sabor y textura (Vargas-Sánchez y col 2013); por la misma razón, la estación del año es otro factor que influye en su calidad (Trusheva y col 2006; Lotti y col 2010; Barrientos y col 2013). Hasta ahora, en propóleo de diferentes

zonas geográficas del mundo se han identificado más de 300 componentes como principales constituyentes, entre los que se pueden mencionar compuestos fenólicos tales como flavonoides y derivados del ácido cinámico, ácidos fenólicos y ésteres de ácidos fenólicos, aldehídos, cetonas, alcoholes, quinonas, sesquiterpenos, ésteres, cumarinas, aminoácidos y compuestos inorgánicos (Christov y col 1998; Nagai y col 2003; Guo y col 2011; Yang y col 2011).

Los propóleos pueden agruparse en propóleos de zonas templadas (*e.g.*, Europa, Norte América, Nueva Zelanda, Asia occidental) y de áreas tropicales. Los de zonas templadas incluyen exudados resinosos de árboles de álamos, principalmente el álamo negro (*Populus nigra*); en la zona septentrional de Rusia las resinas provienen de los brotes de abedul (*Betula verrucosa*) y de *Populus tremula*; mientras que en las regiones mediterráneas al sur de Europa los exudados se obtienen de las choperas y de las hojas de *Cistus* spp. Estos propóleos son ricos en compuestos fenólicos como flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres. Por otro lado, los propóleos de áreas tropicales incluyen exudados de diferentes recursos botánicos (*e.g*., *Baccharis dracunculifolia* en propóleos brasileños y *Clusia rosea* en propóleos cubanos). Estos propóleos contienen fenilpropanoides, derivados del ácido cinámico, artepilina C, y flavonoides en menor proporción (Salatino y col 2005).

Un importante número de estudios se han enfocado a la caracterización del propóleo y en ellos se ha descrito que su composición varía directamente en función de la flora local, de la fenología de los recursos botánicos, e indirectamente de la localidad y tiempo de recolección (Bankova y Marcucci

2000). Garcia-Viguera y col (1992) evaluaron la composición química y origen botánico de propóleo de las regiones Nerpio y La Alcarria, España; los principales componentes encontrados para todas las muestras fueron ácido cafeico, ácido ferúlico y sus ésteres, pinocembrina y pinobanksina y sus derivados, y algunas flavonas. Las muestras provenientes de Nerpio contenían pequeñas cantidades de dihidrochalconas, mientras que en muestras de La Alcarria estuvieron ausentes. Las altas concentraciones de ácidos cafeico y ferúlico, los bajos niveles de ácidos cinámico y cumárico y de dihidrochalconas, así como la ausencia de terpenoides es típico de exudados de *Populus nigra* L*,* álamo negro Europeo presente en la zona de estudio.

En un estudio de propóleos indonesios, Trusheva y col (2011) encontraron que estos provenían principalmente de las plantas *Macaranga tanarius* L. y *Mangifera indica* L. Asimismo, aislaron e identificaron 11 compuestos, entre ellos alka(en)il resorcinoles y prenilflavonoides, ambos con potencial en medicina alternativa.

En cuanto a propóleos mexicanos, Lotti y col (2010) estudiaron propóleo mexicano rojo, reportando la presencia de tres nuevos compuestos 1-(3',4'-dihidroxi-2'-metoxifenil)-3-(fenil)propano, *(Z)*-1-(2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil)-2-(-3-fenilpropano, y 3-hidroxi-5-6-dimetoxiflavan. Así como siete compuestos conocidos: las flavanonas (-)-7-hidroxiflavanona y (+)-pinocembrina; las isoflavonas (-)-mucronulatol, (-)-arizonicanol A, y (+)-vestitol; y los pterocarpanos (-)-melilotocarpano A y (-)-melilotocarpano D.

Como se ha indicado, la mayoría de los compuestos aislados de propóleos incluyen fenólicos los cuales presentan un importante efecto protector contra las reacciones de oxidación; asimismo, flavonas, cumarinas y otros compuestos fenólicos muestran propiedades reductoras y quelantes (Gülcin y col 2010). En el **Cuadro 1** se muestra el origen botánico y los principales constituyentes químicos identificados en propóleos recolectados en diversas regiones del mundo.

Pese a que la composición química del propóleo no es constante, ya que varía en función de las condiciones geográficas de las zonas de recolección y la diversidad botánica, de manera general se caracteriza por tener un 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% de granos de polen (Tolosa y Cañizares 2002).

## B PROPIEDADES Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL PROPÓLEO

Las actividades biológicas y los constituyentes químicos de los propóleos han sido ampliamente estudiadas. Existen reportes que dan evidencias de al menos 20 actividades biológicas (*e.g.*, antimicrobiana, anticolesterolémica, antiinflamatoria, antioxidante, inmunomoduladora, antialérgica, analgésica, hipotensora y termoestabilizadora), características que han sido asociadas a su composición química (Ahn y col 2004; Sforcin 2007; Castillo-García y Woolrich-Zavaleta 2009; Szliszka y col 2011; Trusheva y col 2011; Daleprane y Abdalla 2013; de Groot 2013; Bankova y col 2014). En cuanto a las propiedades antioxidantes, en Arabia Saudita, Al-Ghamdi y col (2015) evaluaron el efecto de la suplementación dietética con propóleos sobre los perfiles de citocinas en plasma,

**Cuadro 1**. Composición química y origen botánico de propóleos de diversas regiones del mundo.

| Lugar de origen | Compuestos identificados | Fuente botánica | Referencia |
|---|---|---|---|
| Argelia | Pinostrobina chalcona, pinocembrina, tectocrisina, ácido *p*-hidroxicinámico etil éster, ácido hexadecanóico 15-metil- metiléster, ácido 6-octadecanóico metil éster, ácido 1,2-bencenodicarboxílico diisooctil éster | Desconocida | Lahouel y col (2010) |
| Argentina | Quercetina, kaempferol, pinocembrina, ácido clorogénico, ácido gálico, apigenina, crisina | *Geoffroea decorticans, Prosopis alba, Prosopis nigra,* *Schinopsis quebracho* colorado, *Acacia aroma*, *Cercidium praecox*, | Chaillou y Nazareno (2009) |
| Brasil | Ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinámico, pinobanksina, kaempferol, apigenina, isosacuranetina, kaempferido, artepillina C, 2-alfa-pineno, 3-beta-pineno, ácido butanedióico 4-dimetil éster, ácido hidroxicinámico – metil éster, ácido hidroxicinámico 6-etil éster, ácido 4-metoxibenzóico 7- metil éster, farnesol, α-amirina, β-amirina, cicloartenol, lupeol, eugenol, isosativan, medicarpina, guaicol, ácido cafeico-4-*O*-hexósido, naringenina-*C*-hexósido, liquiritigenina, isoliquiritigenina, vesitol, gliricidina, 3,4,2',3'-Tetrahidroxichalcona, (3*S*)-7-*O*-metilvesitol, neovesitol, medicarpina, homopterocarpina, biocanina, formononetina, vesticarpan, 3,8-dihidroxi-9-metoxi-pterocarpano | *Baccharis dracunculifolia*, *Dalbergia ecastophyllum* | (Alencar y col 2005; Trusheva y col 2006; Alencar y col 2007; Piccinelli y col 2011; Righi y col 2011) |

**Cuadro 1**. Continuación…

| | | | |
|---|---|---|---|
| Chile | Ácido cafeico, miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, ácido cafeico fenetil éster (CAPE), galangina | *Trevoa quinquenervia*, *Aristotelia chilensis*, *Lithrea caustica*, *Retanilla trinervia*, *Quillaja saponaria*, *Escallonia* spp., *Lotus uliginosus*, *Aextoxicon punctatum*, *Baccharis linearis* | Barrientos y col (2013) |
| China | Apigenina, crisina, pinocembrina, galangina, CAPE, ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico | *Populus* | Zhang y col (2015b) |
| Cuba | Plukenetiona A, mucronulatol, nemorosona, isoliriquitigenina, liriquitigenina, formononetina, biocanina, vesitol, neovesitol, 7-*O*-metilvesitol, medicarpina, homopterocarpina, vesticarpan, 3,8-dihidroxi-9-metoxi-pterocarpano, 3,4-dihidroxi-9-metoxi-pterocarpano, 3-hidroxi-8,9-dimetoxi-pterocarpano | *Dalbergia ecastophyllum* | (Diaz-Carballo y col 2008; Piccinelli y col 2011) |
| España | Ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, pinobanksina, ácido cinamildenacético, crisina, pinocembrina, galangina, pinobanksina 3-acetato, cinamil cafeato, CAPE | *Castanea sativa*, *Quercus* sp., *Populus* sp., *Eucalyptus* sp., *Salix* sp., *Pinus* sp. | Kumazawa y col (2013) |

**Cuadro 1**. Continuación…

| | | | |
|---|---|---|---|
| Italia | Apigenina, crisina, galangina, kaempferol, quercetina, naringenina, pinocembrina, pinostrobina, pinobanksina, ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico. | Desconocido | Papotti y col (2012) |
| Turquía | Naringenina, crisina, acatequina, ácido benzoico, ácido ferúlico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, ácido 3-hidroxicinámico, ácido 4-pentenóico, ácido 1,3-bencenodicarbolxílico, ácido 2-propenóico. | *Populus alba*, *Populus pyrimidalis*, *Populus tremuloides*, *Salix alba* y *Salix fragillis* | Silici y Kutluca (2005) |
| Egipto | Pinocembrina, galangina, crisina, pinostrobina, pinobanksina, 3-*O*-acetilpinobanksina, ácido benzoico, ácido *trans*-*p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido dimetoxicinámico, isopentenil cafeato, dimetilalil cafeato, dodecil cafeato, tetradecil cafeato, tetradecenil cafeato, hexadecenil cafeato, bencil cafeato, feniletil cafeato. | *Populus nigra* | Christov y col (1998) |
| Australia | 2',3',4'-trimetoxichalcona, 2'-hidroxi-3', 4'dimetoxichalcona, 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona, 5,7-dihidroxi-2,3-dihidroflavonol 3-acetato (pinobanksina 3-acetato, 5,7-dihidroxi-6-metoxi-2,3-dihidroflavonol 3-acetato | *Acacia paradoxa* | Tran y col (2012) |
| Venecia | Apigenina, ácido cafeico, crisina, CAPE, galangina, naringenina, kaemferol, pinocembrina, quercetina, 1,1-dimetilalil cafeato (DMAC), catequina | Desconocido | Gregoris y Stevanato (2010) |
| Alemania | Quercetina, apigenina, kaemferol, crisina, ácido cafeico, naringenina, CAPE, galangina, pinocembrina | *Populus* x *canadensis* and *P. nigra* 'Italica' | Bertrams y col (2013) |

**Cuadro 1**. Continuación…

| | | | |
|---|---|---|---|
| África | Ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, quercetina, crisina, tectocrisina, galangina, galangina-5-metil-éter, pinocembrina, pinobanksina, pinobanksina-5-metil.éter, pinobanksina-3-*O*-acetato, pinobanksina-3-*O*-propionato, pinobanksina-3-*O*-butirato, pinobanksina-3-*O*-pentanoato, pinobanksina-3-*O*-hexanoato | *Populus* sp. | Kasote y col (2014) |
| Sonora | Pinocembrina, pinobanksina 3-acetato, CAPE, crisina, galangina, acatequina | Desconocido | Valencia y col (2012) |

los niveles de radicales libres, el perfil lipídico, proliferación de linfocitos y la quimiotaxis en ratones con diabetes tipo I inducida por estreptozotocina. El tratamiento con propóleo reveló una mejoría en la quimiotaxis de células B y T en ratones diabéticos. Estos resultados sugieren que el propóleo atenúa los perfiles anormales de lípidos, la inflamación y la alteración de la proliferación de linfocitos y la migración hacia las quimiocinas para mantener la respuesta inmune. Por otra parte, Cabral y col (2009) analizaron extractos etanólicos de propóleos brasileños, sus fracciones y subfracciones, las cuales demostraron alta actividad antioxidante siendo la fracción hexánica la más eficiente para eliminar radicales libres (74.4 %) comparada con los extractos etanólicos y la fracción clorofórmica.

Como se ha mencionado, el propóleo se usa desde tiempos remotos, se han desarrollado un gran número de investigaciones que lo asocian con múltiples actividades biológicas, y registrado un elevado número de patentes que relacionan su uso con algún efecto terapéutico (Lopez y col 1980; Nobukawa y col 2003; Wang 2008; Gao 2009; Hong 2015).

**a Actividad antioxidante**

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son producto del metabolismo celular y existen los mecanismos para su control; si éstos fallan, las ERO atacan biomoléculas y estructuras celulares, fenómeno que se ha asociado al envejecimiento y a un gran número de patologías (*e.g.*, insuficiencia renal, hipertensión arterial, insuficiencia hepática, cáncer y diabetes). Al respecto, el consumo de antioxidantes exógenos se ha asociado con la prevención y

tratamiento de estas condiciones fisiológicas (Montero 1996; Elejalde-Guerra 2001; Daleprane y Abdalla 2013).

La actividad antioxidante de propóleos de diferente origen geográfico ha sido ampliamente investigada como una alternativa natural para los padecimientos asociados al exceso de ERO (Elejalde-Guerra 2001). En particular, los flavonoides presentes en el propóleo son potentes agentes antioxidantes, capaces de secuestrar radicales libres y de este modo proteger la membrana celular contra la peroxidación lipídica. Diversos compuestos en el propóleo se han descrito como potentes inhibidores del estrés oxidativo (Daleprane y Abdalla 2013). Kalogeropoulos y col (2009) evaluaron la actividad antioxidante de extractos etanólicos de propóleo mediante los ensayos DPPH y FRAP, asociando la actividad antioxidante con el contenido de ácidos fenólicos (cinámico, ferúlico, vanílico y ursólico), crisina, antraquinonas y flavonoides (apigenina, pinocembrina, y kaemferol).

**b Actividad antimutagénica**

El cáncer es una de las primeras causas de muerte tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (INEGI 2014). El daño oxidativo del ADN se ha relacionado con el desarrollo de cáncer. La iniciación y promoción del cáncer se asocian con defectos a nivel cromosómico y con la activación de oncogenes inducidos por radicales libres (Pham-Huy y col 2008). El tratamiento de este padecimiento incluye cirugía, radiación y quimioterapia,

desafortunadamente la mayoría de los fármacos utilizados inducen severos efectos secundarios (*e.g.,* vómito, nausea, pérdida de cabello, depresión).

La búsqueda de tratamientos alternativos ha llevado hacia productos naturales, entre los que se incluye el propóleo, con componentes con potencial anticarcinogénico. Por ejemplo, el flavonoide galangina está presente en altas concentraciones en el propóleo y tiene propiedades quimiopreventivas (Heo y col 2001). Turan y col (2015) investigaron el contenido total de compuestos bioactivos de extractos etanólicos de propóleos turcos y establecieron que los extractos son antioxidantes potentes y reducen la proliferación de células cancerosas de próstata (PC-3), hepatocelular (HepG2), colon (WiDr), cervix (HeLa) y mama (MCF-7).

Fu y col (2004) evaluaron la actividad antimutagénica *in vitro* e *in vivo* de extractos alcohólicos de propóleos chinos por el método de Ames; demostraron que los extractos no fueron tóxicos/mutagénicos para *Salmonella* Typhimurium (cepas TA98 y TA100) hasta la máxima concentración evaluada (5000 µg/placa), además de inhibir la mutagenicidad inducida por los mutágenos daunomicina (DMC) y 2-aminofluoreno (2-AF) en la cepa TA98 (2000 y 3000 µg/placa). Los resultados de la antimutagenicidad *in vivo* revelaron que el propóleo puede inhibir la formación de micronúcleos ($P<0.05$), en dosis de 45.0 y 135.0 mg/kg de peso, y disminuir la frecuencia de aberraciones cromosómicas en dosis de 135.0 mg/kg de peso.

Por otra parte, Moreno-Nieva y col (2005) evaluaron el efecto tóxico, genotóxico/mutagénico, y antimutagénico de extractos etanólicos de propóleos argentinos. La concentración letal media ($CL_{50}$) en el ensayo de citotoxicidad sobre *Artemia salina* fue de 100 µg/mL. Mientras que ninguna de las muestras mostró genotoxicidad y mutagenicidad mediante el ensayo de Ames. Además, la capacidad de los extractos de inhibir el 50% de la mutagenicidad inducida por isoquinolina (IQ) y 4-nitro *o*-fenilenediamina (NPD) se alcanzó a 40 y 20 µg/placa, respectivamente. De dichos extractos se aisló el compuesto 2',4'-dihidroxichalcona, el cual mostró un efecto citotóxico ($CL_{50}$ de 0.5 µg/mL) en *A. salina*, pero no genotóxico o mutagénico en el ensayo de Ames, características que lo vuelve un potencial anticarcinógeno.

**c Inhibición de α-glucosidasa**

La diabetes es la enfermedad endocrina más común causada por la deficiencia hereditaria o adquirida en la excreción de insulina y por la disminución de la capacidad de respuesta de los órganos a la insulina secretada. Esta enfermedad se caracteriza por niveles anormales de glucosa en el plasma. Las $\alpha$-glucosidasas son una serie de enzimas, incluidas la sacarasa y la maltasa, situadas en el borde en cepillo de las células intestinales. Estas enzimas catalizan el paso final en el proceso digestivo de los carbohidratos para liberar monosacáridos absorbibles que resultan en un aumento de los niveles de glucosa en sangre. Si la α-glucosidasa es inhibida, la liberación de D-glucosa a partir de carbohidratos complejos de la dieta disminuye. En este sentido, los inhibidores de α-glucosidasa se han convertido en candidatos idóneos para disminuir la

hiperglicemia postprandial (Zhang y col 2015). Muchos científicos han dirigido su atención a los inhibidores naturales como el propóleo para desarrollar productos nutracéuticos y promover su uso para el manejo de la diabetes (Vongsak y col 2015). Lo anterior resulta importante ya que los inhibidores de α-glucosidasa de uso farmacológico (*e.g.*, acarbosa, miglitol, voglibosa) inducen efectos secundarios, entre ellos flatulencia, diarrea y dolores abdominales, todos asociados con la absorción incompleta de carbohidratos (Zhang y col 2015a).

Varios estudios han mostrado que el propóleo puede disminuir los niveles de glucosa en pacientes con diabetes. Kitamura y col (2013) suministraron propóleos brasileños a ratones con diabetes (100 mg/kg de peso) durante 12 semanas y registraron una mejora en la tolerancia a la glucosa y a la resistencia a la insulina. Por otra parte, Babatunde y col (2015) trabajaron con ratas con diabetes inducida por aloxano, les administraron dietas suplementadas con extractos etanólicos de propóleos nigerianos (200 y 300 mg/kg de peso) durante 28 días y encontraron que disminuían la hiperglicemia, y protegían al hígado y páncreas del estrés oxidativo.

Asimismo, Wu y col (2012) evaluaron el efecto antidiabético de extractos etanólicos de propóleo en combinación con el complejo malato de cromo (III) en ratones con diabetes inducida con aloxano. El tratamiento en dosis de 1.0-5.0 g/kg de peso corporal durante 2 semanas resultó en protección contra el daño hepático y efecto antidiabético; disminuyeron los niveles de glucosa en sangre y de las enzimas aspartato transaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT), y fosfatasa alcalina (ALP); así como el incremento de glucógeno hepático. Por su

parte Vongsak y col (2015) lograron separar los compuestos γ-mangostino y α-mangostino, identificándolos como compuestos activos de extractos etílicos de propóleos que las abejas obtuvieron de resinas de la especie *Tetragonula pagdeni*. El γ-mangostino presentó fuerte actividad inhibitoria de α-glucosidasa y actividad secuestradora de radicales libres. Matsui y col (2004) evaluaron extractos etanólicos de propóleos brasileños y sus fracciones (acuosa y hexánica). En la fracción acuosa identificaron los compuestos ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico, y ácido 3,4,5-tri-*O*-cafeoilquínico, mismos que presentaron actividad inhibitoria de α-glucosidasa.

La información existente sobre actividad biológica y composición química del propóleo muestra su elevado potencial para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento y el control de la diabetes.

**d Actividad anti-infecciosa**

La actividad anti-infecciosa del propóleo también ha sido ampliamente investigada (Alencar y col 2007; Quintero-Mora y col 2008; Castro y col 2009; Arslan y col 2012; Aygun y Sert 2013; Ozkirim y col 2014; Kasote y col 2015). Salomao y col (2008) determinaron el efecto de extractos etanólicos de propóleos brasileños sobre *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico de la enfermedad de Chagas) y diferentes especies de bacterias (*e.g.*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*) y hongos (*e.g.*, *Candida albicans, Sporothrix schenckii* y *Klebsiella pneumoniae*). Los resultados mostraron la efectividad de los extractos de propóleos sobre los tres tipos de patógenos humanos. Adicionalmente,

identificaron algunos compuestos asociados con la actividad antibacteriana (*i.e.*, ácido *p*-cumárico, ácido 3-(4-hidroxi-3-(oxo-butenil)-fenilacrílico, 3-metoxi-4-hidroxicinamaldehído, vanilina, ácido cafeico, ácido dicafeoilquínico, ácido monocafeoilquínico y 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2*H*-1-benzopirano) y tripanocida (*i.e.,* ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinámico, 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2*H*-1-benzopirano y 2-(1-hidroximetil)-vinil-6-acetil-5-hidroxicumarano).

El grupo de compuestos con actividad biológica más comúnmente evaluados en extractos de propóleos son los conocidos como compuestos fenólicos y los principales son flavonoides (**Cuadro 2**).

## C TIPO DE VEGETACIÓN EN SINALOA

En el estado de Sinaloa los tipos de vegetación que predominan son las selvas secas, seguida por los bosques de coníferas y bosque de encinos que se ubican en las zonas montañosas de la Sierra Madre Occidental. El bosque mesófilo se ubica en la zona serrana donde prevalece el clima húmedo y a la vez fresco, mismo que se distribuye en lugares con declive pronunciado, a alturas que oscilan entre los 1800 hasta casi los 2200 msnm. El bosque espinoso se ubica en la zona árida del noroeste de la entidad. En los terrenos cercanos a la costa se establece el manglar, mientras que la actividad agrícola ocupa el 35% de la superficie (Vega-Aviña 2000). Debido a esta diversidad botánica, es posible obtener propóleos con una composición química variada que se asocie a variabilidad en su actividad biológica.

**Cuadro 2.** Actividades biológicas de compuestos identificados en propóleos.[a]

| Bioactividad | Compuesto | Denominación IUPAC | Numeración CAS |
|---|---|---|---|
| Antioxidante | Acacetina | 5,7-dihidroxi-2-(4-metoxifenil)-croman-4-ona | 4080-44-4 |
| | Ácido cafeico | Ácido-(*E*)-3-(3,4-dihidroxifenol)-2-propenoico | 331-39-5 |
| | Ácido cinámico | Ácido (*E*)-3-fenil-propil-2-enoico | 140-10-3 |
| | Ácido ferúlico | Ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propil-2-enoico | 537-98-4 |
| | Ácido sinápico | Ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)propil-2-enoico | 530-59-6 |
| | Ácido *p*-cumárico | Ácido (*E*)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico | 501-98-4 |
| | Apigenina | 5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona | 520-36-5 |
| | Galangina | 3,5,7-trihidroxi-2-fenilcroman-4-ona | 548-83-4 |
| | Kaemferol | 3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona | 520-18-3 |
| | Pinocembrina | (2*S*)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-ona | 480-39-7 |
| | Quercetina | 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicroman-4-ona | 117-39-5 |
| Antibacteriana | Ácido cafeico | (*E*)-3-(3,4-dihidroxifenol)-2-propenoico | 331-39-5 |
| | Ácido *p*-cumárico | Ácido (*E*)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico | 501-98-4 |
| | Crisina | 5,7-dihidroxi-2-fenilcroman-4-ona | 480-40-0 |

**Cuadro 2.** Continuación…

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE) | Ácido (*E*)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoico, 2-fenetil éster | 104594-70-9 |
| | Galangina | 3,5,7-trihidroxi-2-fenilcroman-4-ona | 548-83-4 |
| | Naringenina | (2*S*)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidrocroman-4-ona | 10236-47-29 |
| | Pinobanksina | (2*R*,3*R*)-3,5,7-trihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-ona | 548-82-3 |
| | Pinobanksina-3-acetato | [(2*R*,3*R*)-5,7-dihidroxi-4-oxo-2-fenil-2,3-dihidrocroman-3-il] acetato | 52117-69-8 |
| | Pinocembrina | (2*S*)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-ona | 480-39-7 |
| | Quercetina | 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicroman-4-ona | 117-39-5 |
| Antifúngica | Acacetina | 5,7-dihidroxi-2-(4-metoxifenil)croman-4-ona | 4080-44-4 |
| | Ácido cafeico | Ácido (*E*)-3-(3,4-dihidroxifenol)-2-propenoico | 331-39-5 |
| | Ácido cinámico | Ácido (*E*)-3-fenil-propil-2-enoico | 140-10-3 |
| | Ácido ferúlico | (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propil-2-enoico | 537-98-4 |
| | Ácido *p*-cumárico | Ácido (*E*)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenóico | 501-98-4 |
| | Galangina | 3,5,7-trihidroxi-2-fenilcroman-4-ona | 548-83-4 |
| | Pinocembrina | (2*S*)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-ona | 480-39-7 |

[a](Vargas-Sánchez y col 2013)

# IV JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el propóleo es el componente de la colmena con mayor valor económico, en México la industria apícola está enfocada a la producción de miel, sub-aprovechando este valioso recurso. La alta riqueza florística y climática de México, y en particular de Sinaloa, permiten contar con una alto potencial para el desarrollo de la apicultura, incluyendo el aprovechamiento del propóleo. Numerosos estudios han asociado el consumo de propóleo con efectos benéficos en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas y crónico degenerativas (*e.g.,* diabetes y cáncer), asociado principalmente a la presencia de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras. Las propiedades benéficas del propóleo dependen de su origen geográfico y no existen estudios sobre las características químico-biológicas de los propóleos de Sinaloa. La caracterización de este producto agroalimentario podrá ser la base para establecer estrategias que contribuyan al desarrollo de la apicultura, que al depender de la biodiversidad necesariamente debe realizarse en condiciones de sustentabilidad, fuertemente soportada en la fabricación de productos de alto valor agregado y en beneficio de los pobladores de las regiones donde otras actividades económicas son inviables.

# V OBJETIVOS

## A OBJETIVO GENERAL

Establecer la calidad fisicoquímica de propóleos de Sinaloa e identificar en sus extractos etanólicos compuestos asociados a actividades biológicas *in vitro*.

## B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la calidad fisicoquímica de propóleos de Sinaloa en base a la norma IRAM-INTA 15935-1 del Instituto Argentino de Normalización.
2. Determinar las actividades biológicas *in vitro* (*i.e.*, antioxidante, antimutagénica e inhibitoria de $\alpha$-glucosidasa) de extractos etanólicos de propóleos de Sinaloa.
3. Caracterizar los propóleos de Sinaloa de acuerdo a sus componentes químicos principales.
4. Relacionar componentes químicos específicos de propóleos de Sinaloa con su origen geográfico y con sus actividades biológicas *in vitro* (*i.e.*, antioxidante, antimutagénica e inhibitoria de $\alpha$-glucosidasa).

# VI MATERIALES Y MÉTODOS

## A MATERIALES

### 1 Colección de las muestras de propóleo

La presente investigación es de tipo exploratorio. Los propóleos frescos se obtuvieron de apiarios de las empresas localizadas en el Sur (Apícola del Yauco; municipio El Rosario), Centro (Apícolas Gaxiola; municipio Culiacán) y Norte (Agroapícola San Ambrosio) de Sinaloa (municipio El Fuerte). Cada empresa tiene un diferente número de apiarios en la zona y cada apiario un diferente número de colmenas (**Figura 4**). Los recursos botánicos potenciales de los que deriva el propóleo se enlistan en el **Cuadro 3**. El muestreo se realizó entre los meses de mayo y diciembre de 2016, dependiendo de la producción de los apiarios. De cada región se obtuvieron 15 muestras de propóleo (~20-50 g/muestra/colmena) (Boisard y col 2014). Los propóleos de la región norte fueron colectados en 5 puntos: La Calera (Lat. N. 26°25'50", Long. O. 108°37'54"), orilla de presa (Lat. N 26°.25'50", Long O. 108°40'01"), cercanía de presa (Lat. N. 26°25'22", Long. O. 108°39'42"), junto al río-arándanos (Lat. N. 26°19'10", Long. O. 108°43'52"), y Misión-Chaparral (Lat. N. 26°16'24", Long. O. 108°48'19"). Los propóleos del centro fueron colectados en la sindicatura Alcoyonqui (± 170 msnm; Lat. N. 24°44'45", Long. O. 107°12'30") y los propóleos de la región sur se colectaron en dos puntos cerca del poblado de Agua Verde (primer punto, Lat. N. 22°50.793', Long. O. 106°01.588'; segundo punto, Lat. N. 22°50.729', Long. O.

**Figura 4.** Zonas de recolección del propóleo.

**Cuadro 3.** Lugar de procedencia del propóleo colectado en Sinaloa y el tipo de vegetación predominante (recursos botánicos) en las zonas de muestreo.

| Lugar de procedencia | Tipo de vegetación[1] |
|---|---|
| Norte | Bosque espinoso: *Prosopis julifora* (Sw.) DC. (**mezquite**), *Lysiloma divaricatum* (Jacq.) J.F. Macbr. (**mauto, tepemezquite**), *Piscidia mollis* Rose (**palo blanco**), *Haematoxylum brasiletto* H. Karst. (**brásil**).<br>A orillas del río Fuerte: *Haematoxylum brasiletto* H. Karst. (**brásil**); así como vegetación riparia y subacuática, predominando la presencia de *Populus mexicana* Wesm (**álamo**). |
| Centro | Bosque espinoso: *Piscidia mollis* Rose (**palo blanco**), *Acacia farnesiana* (L.) Willd. (**vinorama, huizache**); así como las cactáceas *Acanthocereus occidentales* Britton & Rose (**tasajo, pitaya**), *Opuntia rileyi* J.J. Ortega (**nopal**), *Pachycereus pecten-aboriginum* (Engel. ex S. Watson) Britton & Rose, (**cardón, pitaya barbona**). |
| Sur | Bosque tropical caducifolio: *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex. Dc.) Mattos (**amapa, amapa rosa**), *Piscidia mollis* Rose (**palo blanco**), *Guazuma ulmifolia* Lam. (**guásima**), *Microlobius foetidus* (Jacq.) M. Sousa y G. Andrade (**conchi**) y cactáceas. |

[1] Para cada tipo de vegetación se indican las especies más representativas y entre paréntesis y negritas se mencionan nombres comunes.

106°01.643'). Cada muestra se obtuvo de una colmena seleccionada aleatoriamente. Las muestras fueron etiquetadas y transportadas (4 °C/ oscuridad) al Laboratorio de Química de Productos Naturales donde se almacenaron a -70 °C/ oscuridad hasta su procesamiento y análisis.

### 2 Microorganismos

En el ensayo de antimutagenicidad se utilizó la cepa YG1024 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, proporcionada por el Dr. Takehiko Nohmi de la división de genética y mutagénesis, Instituto Nacional de Ciencias de la Salud, Japón.

### 3 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico. De Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) se obtuvieron: 1-nitropireno (1-NP), 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH), ácido 2,2'-azino-*bis*(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ác. gálico), 2,2'-azo-*bis*(2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH), 3',6'-dihidroxispiro [isobenzofuran-1[3*H*],9´[9*H*]-xanten]-3-ona (fluoresceína), butilhidroxitolueno (BHT), α-glucosidasa, *p*-nitrofenilglucopiranósido. Los solventes orgánicos grado HPLC se obtuvieron de Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, EE.UU.).

## B MÉTODOS

### 1 Caracterización fisicoquímica del propóleo crudo

Todos los métodos de ensayo para determinar las características fisicoquímicas corresponden a los establecidos por la Norma Argentina IRAM-INTA 15935-1 del Instituto Argentino de Normalización. En las evaluaciones de calidad se reporta el promedio de 3 muestras de propóleo crudo de cada región por triplicado.

**a Humedad**

La humedad se determinó por el método gravimétrico. En una cápsula (previamente tarada) se colocaron 4 g de propóleo crudo y se secaron en estufa a 105 °C durante 2 h. Posteriormente la cápsula se retiró y se llevó a temperatura ambiente en un desecador para finalmente ser pesada. La muestra se consideró seca cuando dos pesadas sucesivas no difirieron en más de ± 5 mg.

El porcentaje de humedad se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$H = 100 * [1 - \frac{C_{TS} - P_{100}}{C_{TH} - P_{100}}]$$

Dónde, H es la pérdida de peso por calentamiento (humedad) (g/ 100 g), $C_{TS}$ el peso de la cápsula con la muestra seca (g), $C_{TH}$ el peso de la cápsula con la muestra húmeda (g) y $P_{100}$ el peso de la cápsula vacía (g).

**b Cenizas**

Las muestras evaluadas provienen del ensayo humedad, es decir son muestras de propóleos en bruto previamente sometidas a calentamiento a 105 °C durante 2 h.

Las cenizas se determinaron por gravimetría (Figueroa-Benavides 2012). La muestra de propóleo se calcinó en la mufla (500 ± 25 ° C) hasta obtener las cenizas. Posteriormente se enfriaron en un desecador hasta peso constante (dos pesadas sucesivas no difieren entre sí en ± 5 mg). El resultado se expresó como porcentaje de ceniza (%C), calculado con mediante la fórmula siguiente:

$$C = \frac{C_Z - P}{C_{Ph} - P} * 100$$

Dónde: $C$ = Porcentaje cenizas (g/100 g), $C_Z$ = Peso de la cápsula con cenizas (g), $C_{Ph}$ = Peso de la cápsula con la muestra (g) y $P$ = Peso de la cápsula (g).

**c Sustancias extraíbles en *n*-hexano (ceras)**

El contenido de ceras se determinó por gravimetría (Figueroa-Benavides 2012). En un equipo Soxhlet se colocó un cartucho de celulosa conteniendo 2 g de propóleo crudo y extrajo con n-hexano a reflujo durante 6 h. El solvente con las ceras disueltas se concentró en un evaporador rotatorio a 40 °C hasta sequedad y el residuo se colocó en un desecador hasta peso constante. La norma oficial Argentina considera como límite máximo un 35% de ceras.

El porcentaje de ceras se calculó como sustancias extraíbles ($S_E$) mediante la siguiente fórmula:

$$S_E = \frac{B_{C1} - B_{C0}}{P} * 100$$

Dónde: $\%S_E$ = Contenido de sustancias extraíbles en n-hexano (g/100 g), $B_{C1}$ = Peso de la cápsula de Petri con sustancias extraíbles (g), $B_{C0}$ = Peso de la cápsula vacía (g) y $P$ = Peso de la muestra de propóleo (g).

**d Resinas solubles en etanol**

El residuo de cada una de las muestras resultantes del procedimiento anterior (es decir el propóleo en bruto agotado con *n*-hexano) fue extraído con alcohol etílico de 96°. La extracción se realizó en un equipo Soxhlet y se mantuvo a reflujo hasta que el etanol en contacto con la muestra fuera incoloro o bien durante 6 h como mínimo. Para determinar el punto final de la extracción, a un 1 mL del extracto etanólico (color verde amarillento) se le añadió 0.1 mL de $FeCl_3$ al 10% y el color debe permanecer; el vire a un color verdoso indica la presencia de compuestos fenólicos y una extracción insuficiente. La solución etanólica obtenida se aforó a 100 mL con etanol. Cincuenta mililitros de esta solución se concentraron en un evaporador rotatorio a 40 °C y los residuos de solvente se eliminaron en una estufa a 80 °C. La muestra se llevó a peso constante en un desecador. El valor mínimo aceptable para las resinas solubles en etanol es de 35% (p/p) (Figueroa-Benavides 2012).

El porcentaje de resinas solubles se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$R = \frac{B_{R1} - B_{R0}}{m} * 200$$

Dónde: $R$ = Contenido de resinas (g/100 g), $B_{R1}$ = Peso del matraz con resinas secas (g), $B_{R0}$ = Peso del matraz vacío seco (g) y $P$ = Peso de la muestra de propóleo (g).

**e Impurezas mecánicas**

Las impurezas mecánicas (restos de maderas, metales, mallas, hilos, polillas y similares) se determinaron por gravimetría del residuo insoluble que quedó en el cartucho del Soxhlet luego de las extracciones de cera. El cartucho se secó a 80 °C, posteriormente fue depositado en un desecador hasta peso constante. El valor máximo para impurezas mecánicas establecido en la norma es de 25% (Figueroa-Benavides 2012).

El contenido de impurezas mecánicas (IM) fue calculado mediante la fórmula siguiente:

$$IM = \frac{(P_2 - P_1)}{P} * 100$$

Dónde: *IM* = Contenido de impurezas mecánicas (g/100g), $P_2$ = Peso del cartucho (o el papel) seco después de extraer la muestra empleando el equipo Soxhlet (g), $P_1$ = Peso del cartucho (o el papel) vacío seco (g) y *P* = Peso de la muestra (g).

**f Índice de oxidación**

Para la determinación del índice de oxidación, 0.2 g de propóleo crudo se mezclaron con 5 mL de etanol al 96% en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se dejaron en reposo durante 1 h. Posteriormente, se agregaron 100 mL de agua destilada, la mezcla se agitó a 150 rpm/temperatura ambiente durante 1 min y se filtró el extracto a través de papel filtro. El filtrado se recuperó y en un tubo de ensayo se mezclaron 2 mL del filtrado con 1 mL de ácido sulfúrico al 20% y la solución se agitó en vórtex (Maxi Mix II Modelo M37615 Barnstead/Thermolyne,

EE. UU.) durante 1 min. Transcurrido el tiempo de agitación se agregó a la mezcla una gota de solución de permanganato de potasio ($KMnO_4$) 0.1 N y se registró el tiempo (s) en que la solución se decoloró. El permanganato al reducirse cambia de un color rosado fuerte a incoloro. El tiempo máximo para el índice de oxidación es de 22 s (Figueroa-Benavides 2012).

### g Espectro de absorción de radiación ultravioleta

El espectro de absorción UV-Vis se determinó para el extracto etanólico del propóleo, obtenido como se describe en el apartado “e” (resinas solubles en etanol) de esta sección. Los extractos se analizaron en un espectrofotómetro UV-Vis de haz sencillo (SQ-2802, UNICO, EE. UU.) en modo barrido (200-600 nm). Las mediciones se realizaron en celdas de cuarzo de 1 mL (SUMILAB S.A. De C.V.). Los extractos deben presentar un pico de absorción entre 270 nm y 310 nm (Figueroa-Benavides 2012).

## 2 Obtención de extractos etanólicos de propóleo (EEP)

Para la preparación de los extractos etanólicos se siguió la metodología descrita por Benhanifia y col (2013) con algunas modificaciones. Las muestras de propóleos crudos fueron cortadas en trozos pequeños y molidas en un molino (KRUPS GX410011V). El polvo de propóleo crudo de 30 muestras (10/región) se maceró con etanol al 70% (15 g de propóleo molido/150 mL), manteniendo los matraces en agitación por 7 días (150 rpm/temperatura ambiente) protegidos de la luz directa. El solvente se recuperó por filtración a través de papel filtro Whatman no. 1, el etanol se evaporó a vacío en un rotavapor a 40 °C (BÜCHI R-

125 Brinkamm Instruments, EE.UU.) y el agua mediante liofilización (The VirTis Company, EE.UU). Los extractos etanólicos de propóleo (EEP) obtenidos se almacenaron a -20 °C y protegidos de la luz hasta su uso.

## 3 Análisis de composición de los extractos etanólicos de propóleos (EEP)

### a Cuantificación de fenólicos totales

La cuantificación de fenólicos totales se determinó por espectrofotometría utilizando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu de acuerdo a lo reportado por Singleton y Rossi (1965) con ligeras modificaciones. El método mide la reducción química de una mezcla de tungsteno y molibdeno. Los productos de la reacción de los óxidos metálicos son cromógenos de color azul intenso, la intensidad de absorción de luz es proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen-Tiitto 1985). La determinación se realizó en microplaca de 96 pozos. Diez microlitros del EEP (250 µg/mL), estándar (ácido gálico) o agua destilada (control negativo) se mezclaron con 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua (1:10 v/v). La microplaca se agitó suavemente y se dejó en reposo durante 2 min, posteriormente se añadieron 90 µL de una solución de carbonato de sodio al 10% ($Na_2CO_3$), la mezcla se agitó y se incubó a 40 °C durante 30 min en oscuridad. Finalmente, las absorbancias se leyeron en un lector de microplaca (Multiskan Bichromatic, Fisher Scientific, EE.UU) a 620 nm. La cuantificación se llevó a cabo usando una curva de calibración de ácido gálico (0-250 µg/mL) y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de EEP (mg EAG/100 g EEP).

**b Cuantificación de flavonoides**

Los flavonoides se cuantificaron por espectrofotometría del complejo flavonoide-$AlCl_3$ en medio metanólico (Figueroa-Benavides 2012). En una microplaca de 96 pozos se mezclaron 20 µL del EEP con 180 µL de una solución al 2% de tricloruro de aluminio ($AlCl_3 \bullet 6H_2O$) en metanol (1:1 v/v). La placa se incubó durante 1 h (25 °C/oscuridad). Transcurrido el tiempo se leyeron las absorbancias a 425 nm en un lector de microplaca (Multiskan Biochromatic, Fisher Scientific, EE.UU). La cuantificación se llevó a cabo usando una curva de calibración de quercetina (0 – 100 µg/mL) y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina (mg EQ/100 g EEP).

**c Identificación y cuantificación de componentes individuales de los EEP por CG-EM**

**1) Preparación de la muestra para extracción**

El EEP se derivatizó siguiendo la metodología reportada por Popova y col (2010) con ligeras modificaciones. El EEP (3 mg) se mezcló con 100 µL de piridina seca y 100 µL de *bis*(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA). La mezcla se calentó a 70 °C en horno durante 90 min bajo una atmósfera de nitrógeno, posteriormente las muestras se llevaron a sequedad y se resuspendieron en 1 mL de hexano para su análisis por CG-EM.

**2) Condiciones de análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)**

El análisis se realizó a muestras sin derivatizar y derivatizadas en un

cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (HP 6890 GC Instruments, 5973 Network, Agilent Technologies, Wilmington, EE.UU.). La separación se realizó en una columna capilar QUADREX 007 CARBOWAX 20M (30 m x 0.25 mm i.d., espesor de película 0.25 µm) usando helio como gas de arrastre a un flujo de 0.9 mL/min. El programa de temperatura del horno se inició a 60 °C por 1 min, gradiente de 5 °C/min hasta alcanzar 200 °C y posteriormente de 10 °C/min hasta 275 °C, permaneciendo a 275 °C por el resto del análisis; fuente de iones 245 °C; y cuadrupolo 150 °C. La temperatura de inyección se fijó en 250 °C. Un volumen de 1 µL fue inyectado sin división de flujo. El espectrómetro de masas (EM) operó en modo de ionización por impacto electrónico a un voltaje 70 eV. La identificación de los componentes se realizó por comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del NIST (NIST08.LIB) y el porcentaje relativo de área de cada componente se calculó por comparación del área del pico con las áreas totales.

## 4 Métodos de evaluación de actividad biológica

### a Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de los EEP se evaluaron por tres métodos: ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), DPPH (1,1-difenil2-picrilhidracil) y ABTS (2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico]). Estos métodos miden la neutralización de radicales libres por transferencia de electrones y protones (DPPH y ABTS) y de hidrógenos (ORAC).

**1) Método del radical ABTS**

La actividad antioxidante por el método ABTS se determinó con la metodología propuesto por Re y col (1999). El radical $ABTS^{\bullet+}$ se generó mediante la reacción de 5 mL del reactivo ABTS (7 mM) con una solución de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) (140 mM), la cual se dejó reaccionar durante 12 - 16 h a 25 °C en la obscuridad. La solución de $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó para obtener una absorbancia de 1.500 ± 0.020 a 590 nm en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (7 mM, pH 7.4). Para el ensayo espectrofotométrico, en una microplaca de 96 pozos se mezclaron 180 µL de la solución del radical $ABTS^{\bullet+}$ con 20 µL de EEP (100 mg/mL) o estándar Trolox (100, 50, 25 y 12.5 mg/mL) en metanol. Como blanco se utilizó metanol. La lectura se ajustó a cero con 200 µL de PBS, la mezcla se dejó reposar durante 10 min a 37 °C en la obscuridad para luego tomar lectura de la absorbancia a 620 nm. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de EEP (µmol ET/ g EEP).

**2) Método del radical DPPH**

La capacidad de los EEP para estabilizar el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) se determinó de acuerdo al método propuesto por Brand-Williams y col (1995) con algunas modificaciones. Para la evaluación, los EEP se disolvieron en metanol (300 µg/mL). En una microplaca de 96 pozos se mezclaron 180 µL de solución DPPH en metanol (150 mM) con 20 µL del EEP o el estándar Trolox (0 - 100 µg/mL), la mezcla se homogenizó y se incubó durante 30 min (37 °C/obscuridad), posteriormente se tomó lectura de la absorbancia a

620 nm (Labsystems Multiskan RC, Fisher, Scientific, Finlandia). Como corrector de color se empleó una mezcla de 20 µL de la muestra y 180 µL de metanol. Los resultados de la actividad antioxidante fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de EEP (µmol ET/ g EEP).

**3) Método ORAC**

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Huang y col (2002) con ligeras modificaciones. Este ensayo mide la capacidad de compuestos antioxidantes para inhibir la disminución en la fluorescencia de fluoresceína (FL) que es inducida por un generador de radicales peroxilo 2,2'-azo*bis*(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro (AAPH) mediante un mecanismo de transferencia de hidrógenos. Los EEP de las regiones N, C y S se disolvieron en metanol (1 mg/mL) y se realizaron diluciones 1:80 y 1:90 v/v de los extractos con PBS (75 mM, pH 7.4). El ensayo se realizó en microplacas de 96 pozos con fondo claro. En las microplacas se adicionaron con 25 µL de la muestra, 25 µL PBS (blanco) o 25 µL de Trolox (6.25-125 µM) (curva estándar) y se colocaron en el equipo de lectura de flourescencia (Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek Instruments, EE.UU.). El equipo añadió automáticamente soluciones recién preparadas de flouresceína 0.96 µM (150 µL) y de AAPH 95.8 µM (50 µL), la reacción se llevó a cabo a 37 °C. La fluorescencia fue medida y registrada durante 70 min a la excitación de 485 nm y emisión de 580 nm. Los valores finales de ORAC fueron calculados mediante el uso de una ecuación de regresión entre la concentración de Trolox y el área neta bajo la curva (**Figura 5**) de la

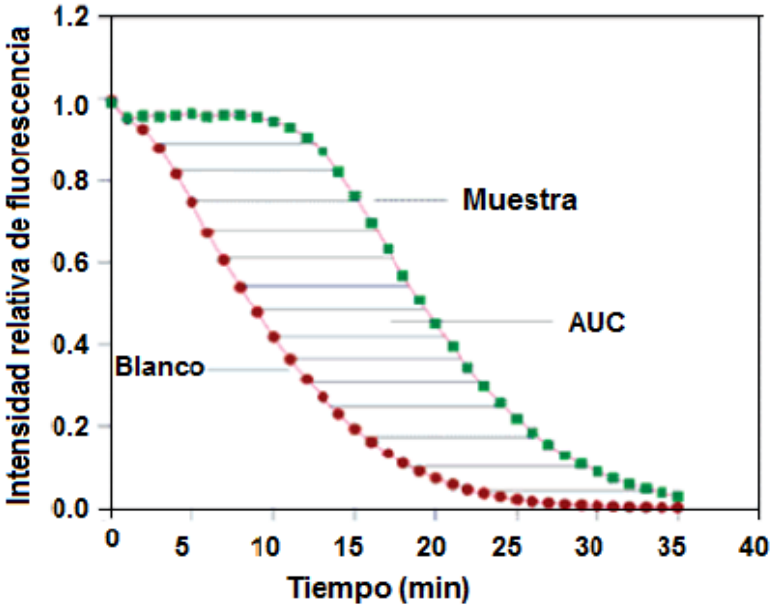


**Figura 5** Capacidad antioxidante ORAC expresada como área bajo la curva (AUC) de una muestra analizada.

Fuente: Prior y col (2005)

disminución de la fluorescencia de la fluoresceína y se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de EEP (µmol ET/ g EEP).

**b Actividad antimutagénica**

La actividad mutagénica/antimutagénica de los EEP se evaluó mediante el método de microsuspensión en caldo de acuerdo a lo reportado por Kado y col (1983). Este método representa una modificación simple del ensayo de Ames que aumenta su sensibilidad.

**1) Ensayo de mutagenicidad/antimutagenicidad**

Para el ensayo de antimutagenicidad se utilizó la cepa YG1024 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, misma que se caracteriza por presentar un elevado nivel de actividad *N*-hidroxilamina-*O*-acetil transferasa, lo cual la hace altamente sensible a la acción mutagénica de *N*-hidroxilaminas derivadas de aminas aromáticas y nitroarenos como el 1-nitropeno (1-NP) (Watanabe y col 1994). Las bacterias fueron cultivadas en medio líquido nutritivo Oxoid Núm. 2 (Oxoid LTD, Hants, Inglaterra) (157.5 µL de ampicilina/ 50 mL de medio líquido nutritivo), la incubación se realizó a 37 °C (16 -24 h) en un baño metabólico (3540, Lab-Line Instruments, INC. EE.UU.). Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación (4500 rpm/10 min, 4 °C) y resuspendidas en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.15 M, pH 7.4) a una concentración aproximada de 1 x $10^{10}$ bacterias/mL. Los extractos etanólicos de propóleo se evaluaron a las concentraciones que no indujeron genotoxicidad. La concentración del mutágeno a utilizar se obtuvo a partir de la construcción de una

curva dosis-respuesta de 1-nitropireno (1-NP); se seleccionó la concentración en la que se obtuvo al menos el doble de células mutantes en relación con las revertantes espontáneas. Todas las muestras fueron disueltas en DMSO y esterilizadas por filtración (0.22 μm). La mezcla de cofactores se preparó de acuerdo a lo reportado por Ames y col (1975).

**2) Construcción de la curva dosis-respuesta**

El mutágeno se disolvió en DMSO (0-400 ng/placa), 5 µL de las diferentes concentraciones de 1-NP se adicionaron en tubos y se realizó el ensayo como se indica en el apartado anterior de esta sección. Se utilizaron testigos negativos con DMSO (Espinosa 1980).

**3) Preparación de la mezcla de cofactores**

Para la preparación de la mezcla de cofactores, los reactivos se adicionaron en el siguiente orden: 385 µL agua, 500 µL de amortiguador NAP (0.2 M pH 7.4), 20 µL de una mezcla de cloruro de magnesio 0.4 M y de cloruro de potasio 1.65 M, 40 µL NADP 0.1 M, y 5 µL glucosa-6-fosfato 1 M.

**4) Ensayo de microsuspensión**

Para el ensayo de microsuspensión se preparó una solución de 1-NP (40 mg/mL) como control positivo. La evaluación de la actividad antimutagénica se realizó en tubos de cultivo estériles (12 x 75 mm), los cuales se colocaron en un baño con hielo y se les adicionaron los siguientes componentes en orden secuencial: 95 µL de la mezcla de cofactores, 100 µL de bacteria (1 x $10^{10}$

células/mL PBS), 10 µL de la muestra a evaluar y 5 µL de 1-NP. Al control positivo se le adicionó 10 µL de DMSO y 5 µL de 1-NP y en el control negativo se utilizaron 15 µL de DMSO. La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C durante 90 min en agitación vigorosa (150 rpm), posteriormente los tubos se colocaron en baño con hielo hasta el momento de adicionar el agar de superficie.

El agar de superficie se preparó con 90 nmoles de histidina/biotina, siguiendo la técnica de Maron y Ames (1983). Se transfirieron 2 mL de agar de superficie a tubos de cultivo estériles y se mantuvieron a 45 °C en un bloque de calentamiento (Fisher Scientific, IN. EE.UU.). Transcurridos los 90 min de preincubación, a cada una de las mezclas a evaluar descritas anteriormente se les adicionaron 2 mL de agar de superficie, la mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex y fue distribuida en cajas Petri con medio mínimo de Vogel-Boner. El agar se dejó solidificar a temperatura ambiente y posteriormente se incubó en oscuridad a 37 °C durante 48 h; después de terminada la incubación se contaron las colonias (contador SOL-BAT Modelo Q-20 SOL-BAT Co., México). La mutagenicidad/toxicidad de los extractos se evaluó para la concentración más alta utilizada en la prueba de antimutagenicidad, para esto, las muestras fueron tratadas como se describe anteriormente pero sin la adición de 1-NP.

Las evaluaciones se registran como el promedio del triplicado de dos experimentos independientes. Para los ensayos de mutagenicidad se calculó el índice mutagénico (IM) para cada concentración como:

$$IM = \frac{Rm}{Rsm}$$

Dónde **Rm** y **Rsm** son el número promedio de revertantes/placa con y sin la muestra evaluada, respectivamente. La muestra evaluada se considerará mutagénica si IM ≥ 2 y citotóxica si IM ≤ 0.6.

La actividad anti-mutagénica se calculó como porcentaje de inhibición de la actividad mutagénica:

$$\% \, Inhibición = [1 - (X1/X2)]100$$

Dónde **X1** es el número de revertantes/placa en presencia de la muestra, y **X2** es el número de revertantes/placa en ausencia de la muestra.

La actividad antimutagénica se clasificó como fuerte (40% o más de inhibición), moderada (25-40% de inhibición), o débil/negativa (inhibición ≤25%) (Basgedik y col 2015).

**c Actividad inhibitoria de α-glucosidasa**

El ensayo se realizó de acuerdo a lo reportado por da Silva Pinto y col (2008) con algunas modificaciones. En una microplaca se mezclaron 50 µL de los EEP a cinco diferentes concentraciones (5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 µg/mL) con 100 µL de α-glucosidasa (0.5 U/mL) (de *Saccharomyces cerevisiae*) en PBS (0.1 M, pH 6.9), la placa se incubó por 10 min a 37 °C (Stat Fax-2200, AWARENESS TECHNOLOGY, EE.UU.). Después de la preincubación, se adicionaron en cada pozo 50 µL de una solución 5 mM de *p*-nitrofenil-α-D-glucopiranósido en PBS. La placa se incubó nuevamente por 10 min a 37 °C. Terminada la incubación se registró la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de microplaca (Labsystems Multiskan RC, Fisher, Scientific, Finlandia). Se utilizó una solución sin la muestra

como control, mientras que una solución sin el sustrato se utilizó como blanco. Como estándar de referencia se utilizó acarbosa. El experimento se realizó por triplicado y el porcentaje de inhibición de α-glucosidasa se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$\%\, Inhibición = \left(\frac{Abs_C - Abs_M}{Abs_C}\right) 100$$

Dónde **$Abs_C$** es la absorbancia del control, y **$Abs_M$** la absorbancia de la muestra.

## 5 Análisis estadístico

Las diferentes variables se analizaron mediante un análisis de varianza de un factor (región de muestreo) con tres niveles (Sur, Centro y Norte), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Fisher, la prueba de Duncan en el caso de α-glucosidasa. Los datos se analizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Francia para determinar la normalidad de los datos. En cada región se determinó si las variables mostraban correlación, empleando la prueba de *Pearson* para datos normales y *Spearman* en caso contrario. En los análisis estadísticos se utilizó el programa STATGRAPHICS plus versión 5.1 (Statistical Graphics Corporation™, EE.UU.). Para los cálculos de $IC_{50}$ en los ensayos de inhibición de α-glucosidasa se empleó el software GraphPad Prism versión 6.1 (GraphPad Prism ® software, Inc., EE.UU.). El análisis de correlación se realizó con el paquete estadístico PASW Statistics versión 18 (SSPS Inc., Chicago IL). Para cada variable/muestra, se realizaron al menos dos mediciones independientes por triplicado. La significancia estadística se estableció a un nivel del 5%.

# VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## A CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS PROPÓLEOS CRUDOS

Las determinaciones fisicoquímicas de los propóleos crudos del estado de Sinaloa (norte, centro y sur) mostraron que cumplieron con cuatro de los siete parámetros de calidad (*i.e.,* humedad, cenizas, impurezas mecánicas e índice de oxidación) establecidos por la norma Argentina (Paulino y col 2003) (**Cuadro 4** y **Figura 6**).

Los propóleos presentaron valores de humedad muy similares y dentro de norma (≤ 10%), lo cual evita el desarrollo de microorganismos (*e.g.,* mohos y levaduras) que pueden asociarse a procesos fermentativos que producen sustancias tóxicas para el consumidor (Palomino-García y col 2010). Los valores de humedad de propóleos argentinos (1.4% - 6.2%) (Tosi y col 2006) y de la región central de México (4%) (Delgado y col 2015) fueron similares a los obtenidos en esta investigación.

En cuanto al contenido de cenizas, sólo los propóleos de la región norte fueron superiores a lo permitido por la norma. Los minerales contribuyen al valor de cenizas y en algunos propóleos se han identificado metales tóxicos como el plomo (Palomino-García y col 2010), por lo que en estudios futuros será conveniente determinar el perfil de minerales de los propóleos de Sinaloa.

**Cuadro 4.** Caracterización fisicoquímica de propóleos crudos de las tres regiones recolectadas de Sinaloa.

| Parámetro de calidad | Valor de los parámetros (%) por región[1] | | | Valor de Referencia (%)[2] |
|---|---|---|---|---|
| | Norte | Centro | Sur | |
| Humedad | 5.52 ± 0.60$^{a,b}$ | 4.47 ± 0.88$^{a}$ | 6.89 ± 1.03$^{b}$ | ≤10 |
| Cenizas | **6.55 ± 2.62$^{a}$** | 3.54 ± 0.43$^{a}$ | 4.05 ± 1.05$^{a}$ | ≤5 |
| Ceras | **55.24 ± 13.5$^{a}$** | **67.82 ± 5.74$^{a}$** | **50.63 ± 6.68$^{a}$** | ≤35 |
| Resinas | **12.77 ± 5.87$^{a}$** | **12.27 ± 3.30$^{a}$** | **12.25 ± 3.94$^{a}$** | ≥35 |
| Impurezas mecánicas | **36.16 ± 5.38$^{b}$** | **30.44 ± 0.51$^{ab}$** | 22.44 ± 2.16$^{a}$ | ≤25 |
| Índice de oxidación (s) | 4.0 s ± 1.32$^{a}$ | 3.6 s ± 0.53$^{a}$ | 16.7 s ± 5.59$^{b}$ | ≤22 |

[1] Los valores son la media ± desviación estándar de tres réplicas. En negrita se resaltan los valores que están fuera de la Norma. Diferentes superíndices en la misma fila (a, b) indican diferencia estadística (Fisher, $p<0.05$).[2] Valores de referencia establecidos en la Norma IRAM, del Instituto Argentino de Normalización – Subcomité de Productos Agroalimentarios del NOA-2008 (IRAM-INTA 15935-1 2008).

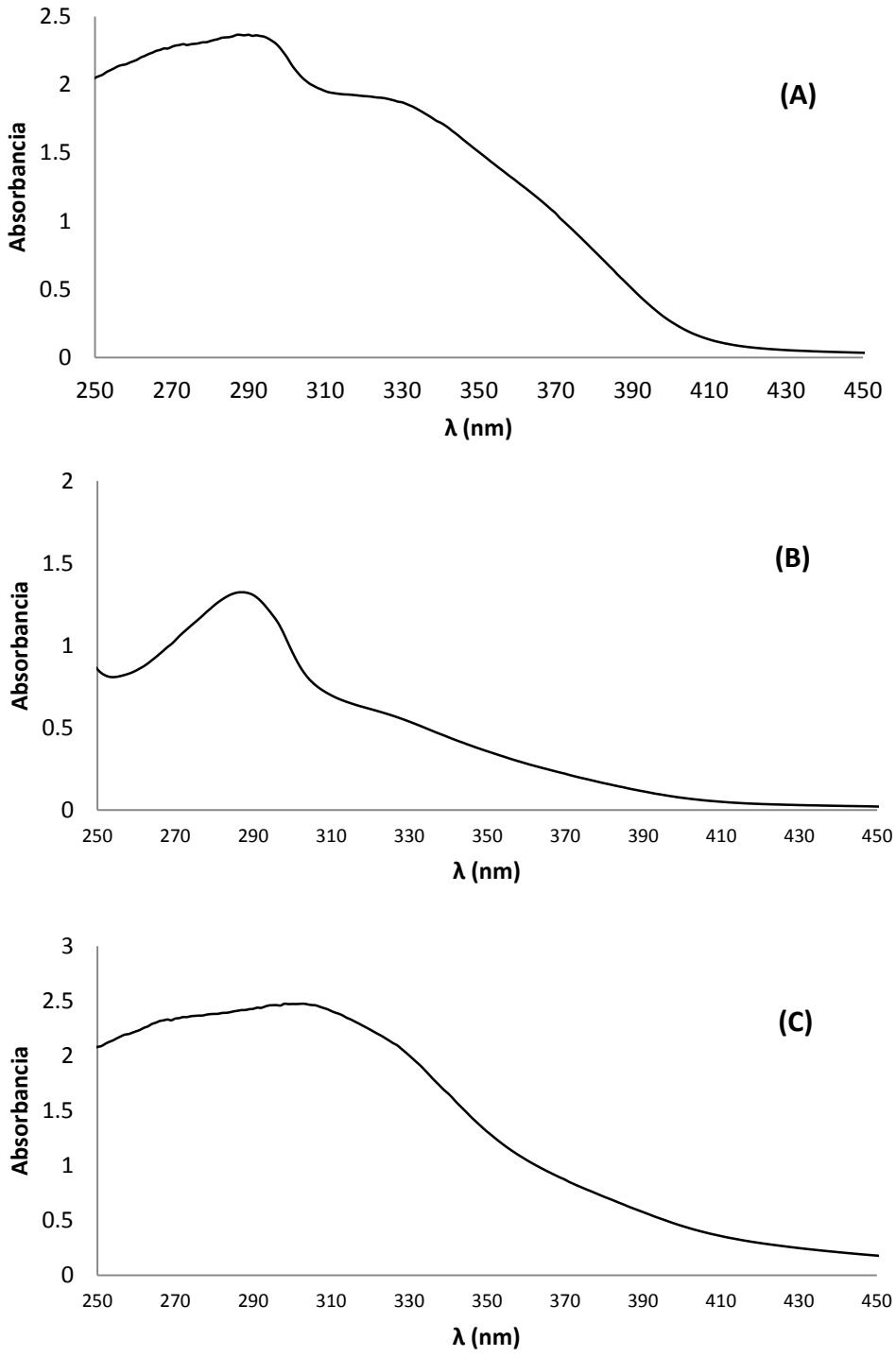


**Figura 6**. Espectro de absorción UV-Vis, representativo de cada región, de extractos etanólicos de propóleos.

(A) Región norte ($\lambda_{max}$ 290 nm), (B) región centro ($\lambda_{max}$ 285 nm), y (C) región sur ($\lambda_{max}$ 300 nm).

El contenido de ceras en las tres regiones evaluadas superó el límite establecido por la norma Argentina (<35%), lo que disminuye su valor debido a que presentan un menor contenido de metabolitos secundarios asociados con actividades biológicas. Las abejas añaden ceras proveniente de plantas al propóleo y debido a su origen se presentarán variaciones asociadas al tipo de vegetación, estación del año, manejo del apiario y método de recolección, entre otros factores (Krell 1996). Propóleos crudos recolectados en Antioquia (Colombia) mostraron mayores porcentajes de ceras (72.32%) (Palomino-García y col 2010) que los registrados para los propóleos de Sinaloa. Martínez y col (2012) emplearon dos métodos de recolección de propóleo (raspado y mallas), encontrando un mayor contenido de ceras en el propóleo obtenido por raspado (59%), lo que en parte justificaría nuestros resultados puesto que fue el método utilizado en esta investigación.

El contenido de resinas solubles en etanol de los propóleos de las tres regiones evaluadas fue bajo (≈ 12%) (**Cuadro 4**). Este parámetro influye grandemente en la calidad del propóleo, debido a que en esta fracción se presenta la mayor proporción de los compuestos con actividad biológica y valores altos se asocian a mejores propóleos (Arrate 2008). El bajo porcentaje de resinas y alto contenido de ceras puede deberse a que las especies vegetales en las áreas de los apiarios presentan un bajo contenido de resinas (Chaillou y col 2004), así como al método de recolección, siendo mejor el uso de mallas que el raspado (Isla y col 2009). Al comparar con propóleos de otras regiones, los valores del presente estudio para resinas solubles estuvieron en el límite inferior

del rango determinado para un producto de la región noreste de Argentina (5.57 - 60.80%) (Maldonado 2000) y superior al registrado para propóleos de la región de Caldas en Colombia (10.44%) (Martínez y col 2012).

Considerando el contenido de impurezas mecánicas, los propóleos de las regiones norte y centro (**Cuadro 4**) no cumplen con la norma Argentina (≤ 25%) y como se mencionó anteriormente, dichos propóleos presentaron un mayor contenido de ceras en detrimento de su calidad. Por otro lado, el propóleo de la región sur se caracterizó por presentar impurezas mecánicas (22.44%) por debajo de establecido en la norma de referencia y un menor contenido de ceras, lo que sugiere una mejor calidad. Las impurezas mecánicas son elementos insolubles e indeseables presentes en los propóleos; las abejas tienden a incorporar estos elementos durante la adición de resinas y con esta fracción se incluyen restos de plantas, animales u otros residuos que se adhieren durante el proceso de recolección del propóleo. Asimismo, es pertinente mencionar que el propóleo colectado por raspado presenta valores más altos para este parámetro (Casanova 2009). Martínez y col (2012) registraron el doble de impurezas mecánicas en propóleos obtenidos por raspado (28.23%) que con el uso de mallas (14.37%). Un incremento en impurezas mecánicas implica un menor contenido de compuestos bioactivos y una menor calidad del propóleo (Arrate 2008).

Los índices de oxidación de los propóleos de Sinaloa cumplieron con la norma Argentina (tiempo < 22 s) (**Cuadro 4**). Este parámetro sugiere que los propóleos contienen compuestos con actividad antioxidante, siendo mayor para

los de la zona centro. En contraste con propóleos de otras regiones, los de Sinaloa fueron mejores que propóleos colombianos (17 - 37 s) (Martínez y col 2012), argentinos (4 - 120 s) (Maldonado 2000) y los obtenidos en Zapopan (Jalisco, México) (7 s) (Delgado y col 2015).

Los espectros UV-Vis de los propóleos de Sinaloa presentan bandas amplias entre 280 y 330 nm (**Figura 6**) que son características de propóleos (Yoong 2004; Martínez y col 2012). El máximo de absorción de los propóleos del norte ($\lambda_{max}$ 290 nm) y centro ($\lambda_{max}$ 285 nm) estuvo más desplazado hacia la región UV que los del S ($\lambda_{max}$ 300 nm) (**Figura 6C**); los espectros de los propóleos del norte y el centro presentaron un hombro a ≅ 330 nm (**Figuras 6A-B**). Las diferencias en composición de los propóleos están influenciadas por el tipo de vegetación (Maldonado 2000), la cual fue similar sólo entre las regiones norte y centro (**Cuadro 3**), y esto puede reflejarse en el espectro UV-Vis (**Figuras 6A-B**).

## B RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

El rendimiento de extracción del EEP de la zona norte (33.88±3.89 b.s.) fue mayor que los del centro (19.49±5.98 b.s.) y sur (15.44±1.23) ($P \leq 0.05$). Los rendimientos de los EEP del norte fueron mayores que los de Campeche, México (14.94%) (Tolosa y Cañizares 2002) y ligeramente inferiores que los de Brasil (36.78%) (Paviani y col 2015). Al respecto, Woisky y Salatino (1998) reportan que periodos largos de extracción (7-30 días) generan extractos más concentrados en compuestos fenólicos. En este sentido, la maceración de propóleos durante 7 días aseguró una mayor disponibilidad de los compuestos bioactivos presentes

en los propóleos de Sinaloa para ser caracterizados en sus actividades biológicas.

## C ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

### 1 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los EEP por los métodos ABTS y DPPH siguió el orden EEP-sur > EEP-centro > EEP-norte, mientras que por el método ORAC el orden se invirtió ($P \leq 0.05$). Los valores más altos de actividad antioxidante se obtuvieron con ORAC y los menores con DPPH (**Cuadro 5**). Los valores por ABTS fueron dos veces más altos que los obtenidos por DPPH; lo cual se puede atribuir a que el método de ABTS es menos selectivo favoreciendo la detección de compuestos en un mayor rango de polaridad (Palomino-García y col 2009). Las diferencias observadas justifican la evaluación de la actividad antioxidante por diferentes métodos, cada uno de los cuáles funcionan bajo condiciones específicas y permiten detectar diferentes compuestos y mecanismos; lo que aunado al uso de controles positivos apropiados facilitan la comparación de resultados entre diferentes investigaciones.

Contrastando la actividad antioxidante por ABTS (µmol ET/g EEP), los valores fueron superiores a los de propóleos colombianos (1091 – 455 µmol ET/g) (Palomino-García y col 2009) (1918 – 739 µmol ET/g) (Rodríguez y col 2012) e inferiores a los del noreste de Brasil (2913 – 1868 µmol ET/g) (Andrade y col 2017).

**Cuadro 5**. Actividad antioxidante de extractos etanólicos de propóleos (EEP) del estado de Sinaloa mediante los métodos ABTS, DPPH y ORAC.[1]

| Región de origen | Actividad antioxidante (µmol ET/g EEP)[2] (IC 95%) | | |
|---|---|---|---|
| | **ABTS** | **DPPH** | **ORAC** |
| Norte | 2802.0 ± 1218.8[a] (1930.1, 3673.9) | 1012.7 ± 491.2[a] (661.3, 1364.1) | 9412.0 ± 425.6[a] (9107.5, 9716.4) |
| Centro | 3857.7 ± 1181.6[b] (3012.4, 4703.0) | 1215.1 ± 316.5[ab] (988.7, 1441.5) | 7982.5 ± 812.7[b] (7401.1, 8563.9) |
| Sur | 4251.0 ± 517.6[b] (3880.7, 4621.3) | 1505.9 ± 298.1[b] (1292.7, 1719.2) | 5169.58 ± 1565.1[c] (4050.0, 6289.2) |

[1]Los valores son la media y desviación estándar de dos experimentos independiente por triplicado (n = 10), entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza a un nivel de significancia del 5%. Letras diferentes, en un mismo método (columna), indican diferencia significativa, Fisher, α = 0.05 (LSD: ABTS = 940.223; DPPH = 347.511; ORAC = 961.101). [2]µmoles equivalentes de Trolox/gramo de extracto etanólico de propóleo (µmol ET/g EEP).

En la actividad antioxidante por DPPH, los valores de los EEP de Sinaloa (1012.7 – 1505.9 µmol ET/g) fueron mayores que los de extractos metanólicos de propóleos de Guanajuato (México) (39 – 54 µmol ET/g) y los etanólicos de propóleos colombianos (65.1-190.4 µmol ET/g) (Palomino-García y col 2009; Rodríguez y col 2012).

Las capacidades antioxidantes evaluadas por ORAC en los EEP de las regiones norte (9412 µmol ET/g EEP) y centro (7982 µmol ET/g EEP) fueron similares a las reportadas para propóleos uruguayos (9000 - 7100 µmol ET/g EEP). El valor más bajo de ORAC fue para las muestras colectadas en la región sur (5169 µmol ET/g EEP), pero fue superior a los reportados para propóleos colombianos (2211 - 475 µmol ET/g EEP) (Rodríguez y col 2012).

Los aumentos en la capacidad antioxidante evaluada sólo por ABTS y DPPH (**Cuadro 5**) corresponden con el incremento en el contenido de contenido de fenólicos, como se discutirá en la sección D de este documento. Considerando la tendencia inversa en las evaluaciones por ORAC, es posible sugerir que la actividad antioxidante de los propóleos es el resultado de interacciones complejas entre los componentes de las mezclas de compuestos de los propóleos; previamente se ha señalado que además de los fenólicos, otras familias de compuestos están contribuyendo a la actividad antioxidante (Huang y col 2005).

## 2 Actividad inhibitoria de la enzima α-glucosidasa

Los valores de inhibición de $\alpha$-glucosidasa de los EEP de Sinaloa fueron de 2 a 3 veces mejores que el control positivo acarbosa ($IC_{50}$ 3.05 ± 0.004

mg/mL) (**Cuadro 6**), resultando con mejor actividad los de las zonas norte y centro. La actividad inhibitoria de $\alpha$-glucosidasa registrada pudiera estar asociada a su contenido de compuestos fenólicos como se hará evidente en las secciones D y E del presente capítulo. Zhang y col (2015a) reportaron que los EEP con un mayor contenido de flavonoides tuvieron un mayor efecto inhibidor que el control positivo. También se ha sugerido que la actividad inhibitoria de $\alpha$-glucosidasa se asocia a otros fitoquímicos como xantonas y ácidos fenólicos (Vongsak y col 2015; Zhang y col 2015a), compuestos que pudieran contribuir a la actividad registrada para los EEP en la presente investigación.

## 3 Actividad antimutagénica

Los extractos etanólicos de propóleos de Sinaloa no indujeron efectos tóxicos (IM<0.6) ni mutagénicos (IM>2.0) **(Cuadro 7)** a las concentraciones evaluadas. Considerando la tasa de reversión espontánea de 42 ± 3 revertantes por placa, la dosis seleccionada de 1-NP contra la cepa YG1024 de *Salmonella enterica* serovar Typhymurium fue de 150 ng/tubo (**Figura 7**) puesto que indujo la formación de 134 ± 6 revertantes, considérese que la concentración seleccionada debe al menos duplicar el número de revertantes espontáneas (Espinosa 1980).

En la evaluación de la actividad antimutagénica de los EEP (250 µg/placa) por el ensayo de Ames, en las tres zonas se registraron valores estadísticamente similares (65.16% – 71.18%) (**Cuadro 8**), resultando superiores para los de la región norte.

**Cuadro 6.** Concentración de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) que inhiben el 50% de la actividad de la enzima α-glucosidasa ($IC_{50}$).

| **Zona de origen del extracto** | **$IC_{50}$ (mg/mL)[1] (IC 95.0%)[2]** |
|---|---|
| Acarbosa | 3.05 ± 0.003[c] |
| Norte | 0.99 ± 0.4[a] (0.70, 1.28) |
| Centro | 1.08 ± 0.3[a] (0.87, 1.30) |
| Sur | 1.45 ± 0.4[b] (1.14, 1.75) |

[1]Valores son la media de (n = 10) de dos ensayos independientes cada uno por triplicado ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa (Duncan, P ≤ 0.05). [2]Intervalo de confianza.

**Cuadro 7**. Toxicidad/mutagenicidad de los extractos etanólicos de propóleo (EEP) de tres zonas de Sinaloa (Norte, N; Centro, C; Sur, S).[1]

| Zona de origen del extracto | Concentración del EEP (µg/placa) | Revertantes/ placa | IM |
|---|---|---|---|
| Norte | 250 | $25 \pm 3^{a}$ | 0.86 ± 0.11 |
| Centro | 250 | $33 \pm 3^{c}$ | 1.15 ± 0.10 |
| Sur | 250 | $25 \pm 3^{ab}$ | 0.86 ± 0.09 |
| Control | 0 | $29 \pm 7^{b}$ | N/A |

[1]Se presenta la media y desviación estándar (n=10) de dos ensayos independientes por triplicado. Letras diferentes indican diferencia significativa (α = 0.05).

IM: Índice de mutagenicidad.

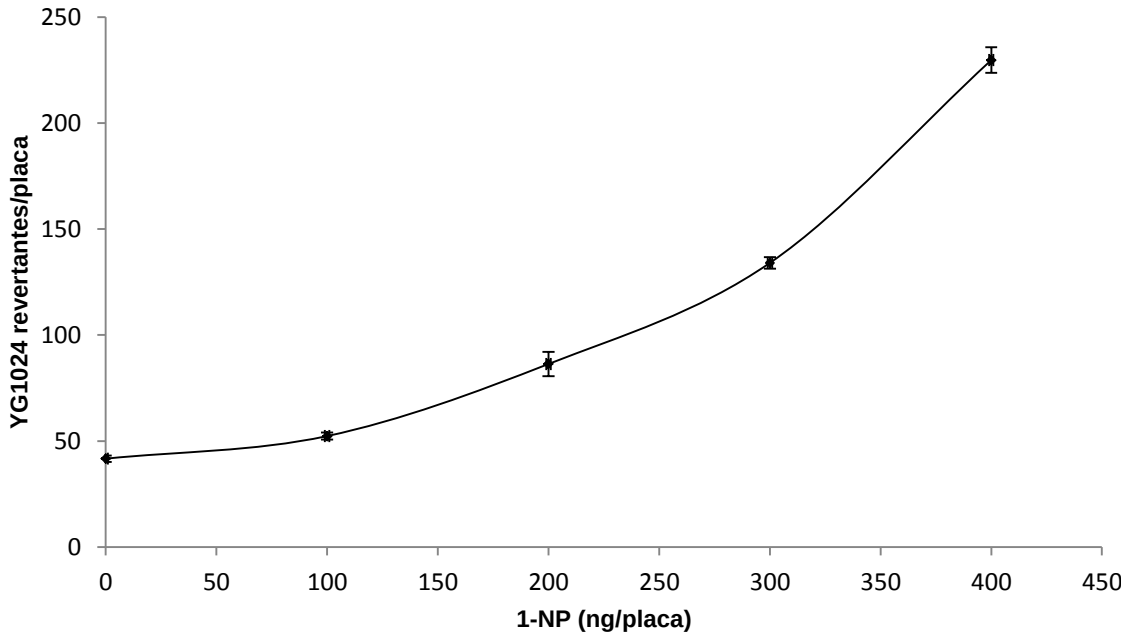


**Figura 7**. Curva dosis-respuesta de la mutagenicidad del 1-nitropireno (1-NP) en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium YG1024.

Cada punto representa la media ± desviación estándar de dos experimentos independientes por triplicado. La frecuencia de mutación espontánea fue de 42 ± 3 revertantes/placa.

**Cuadro 8.** Actividad antimutagénica de los extractos etanólicos (EEP) de propóleo de Sinaloa.[1]

| Zona de origen del extracto | Concentración del EEP (µg/placa) | Inhibición (%) (IC 95.0%)[2] |
|---|---|---|
| **Norte** | 250 | 71.18 ± 6.2[a] (66.72, 75.65) |
| **Centro** | 250 | 64.32 ± 7.6[a] (58.85, 69.78) |
| **Sur** | 250 | 65.16 ± 8.4[a] (56.74, 73.57) |
| **1-NP** | 0 | N/A |

[1] Se utilizó la cepa *Salmonella enterica* serovar Typhimurium YG1024 y el 1-nitropireno (1-NP, 150 ng/placa) como mutágeno. Los resultados son la media y desviación estándar (n=10) de tres placas por dosis. Entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza a un nivel de significancia del 5%

[2] Letras diferentes en la columna indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

La cepa YG1024, empleada en el ensayo de antimutagenicidad es derivada de *Salmonella* Typhimurium TA98 y presenta un alto nivel de actividad de *N*-hidroxilamina-*O*-acetiltransferasa (OAT), lo que incrementa su sensibilidad hacia diversos mutágenos entre los que se incluye al 1-NP (Watanabe y col 1993). El 1-NP es un compuesto carcinogénico para el hombre, de acción directa, y es activado por acetil-CoA.

La actividad antimutagénica de extractos etanólicos de propóleos de otras regiones ya ha sido reportada anteriormente en el modelo (cepa – mutágeno) empleado en este estudio. La inhibición de los EEP de Sinaloa (250 μg/placa) fue superior a la de extractos etanólicos de propóleo Chino (3000 μg/placa) (42.7% - 48.3%) (Fu y col 2004). Por su parte, Rao y col (1992) sintetizaron tres ésteres de ácidos cafeicos presentes en propóleos y demostraron un efecto antimutagénico dosis-dependiente contra el mutágeno 3, 2-dimetil-4-aminobifenilo (DMAB). Jeng y col (2000) evaluaron extractos etanólicos de propóleos brasileños, presentando la misma tendencia dosis-respuesta que los EEP-sinaloenses contra el mutágeno evaluado (80 μg/placa, 1-NP 200 ng/placa) y asociaron dicho efecto al contenido de compuestos flavonoides y/o complejos de ácidos aromáticos al igual que Tavares y col (2006) y Bayram y col (2015); sin embargo, estos autores señalan que hasta el momento no se cuenta con información suficiente que permita establecer los compuestos del propóleo asociados al efecto antimutagénico. No obstante, en la identificación de componentes individuales de los EEP de Sinaloa, se logró identificar taraxasterol, un importante compuesto presente en gran variedad de especies vegetales (*e.g., Prosopis juliflora* (Sw.) DC, Fabaceae;

*Solanum lycopersicum*, Solanaceae; *Ficus carica*, Moraceae). El taraxasterol tiene gran importancia farmacológica por presentar actividades antitumoral y antiinflamatoria (Sharma y Zafar 2015).

Los resultados del presente estudio demuestran que los EEP sinaloenses poseen la capacidad para suprimir la mutación inducida por el 1-NP; lo que sugiere el potencial de los extractos etanólicos de propóleos para la prevención o tratamiento de cáncer.

## D COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO

### 1 Fenólicos totales

Los EEP-S presentaron el mayor contenido de fenólicos totales (FT) (315. 65 mg EAG/100 g EEP), con valores similares para los EEP-N y EPP-C (**Cuadro 9**).

Los FT de los EEP de Sinaloa fueron similares a los obtenidos para muestras de España (200-340 mg EAG/g EEP) (Bonvehí y Gutiérrez 2011), mientras que los valores para EEP-C y EEP-S fueron superiores que los de EEP de Brasil (245 mg EAG/ g EEP) (Skaba y col 2013). Por otro lado, los FT de los EEP de Sinaloa fueron inferiores que algunas muestras de extractos metanólicos de propóleos (69 – 500 mg EAG/g extracto) colectados en el estado de Guanajuato, México (Hernández-Zarate y col 2017). Estos resultados podrían estar relacionados con las propiedades del metanol, el cual puede solubilizar compuestos en un rango de polaridad mayor que el etanol. La presencia de compuestos fenólicos en los extractos etanólicos, incluyendo a flavonoides,

**Cuadro 9** Contenido de fenólicos y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de Sinaloa.

| Extracto | Fenólicos totales mg EAG/g EE[1] (IC 95.0%)[2] | Flavonoides totales mg EQ/g EE[3] (IC 95.0%)[2] |
|---|---|---|
| EEP-N | 221.37 ± 76.4[a] (179.42, 263.33) | 50.03 ± 30.33[ab] (19.70, 80.35) |
| EEP-C | 285.15 ± 62.1[ab] (243.18, 327.11) | 73.23 ± 24.13[b] (49.1, 97.36) |
| EEP-S | 315.65 ± 56.1[b] (273.69, 357.61) | 39.28 ± 8.25[ab] (31.04, 47.53) |

[1]Miligramos equivalentes de ácido gálico/ gramo de extracto (mg EAG/ g EEP).

[2]IC: Intervalo de confianza.

[3]Miligramos equivalentes de ácido gálico/gramo en base seca (mg EAG/ g EEP).

FT, LSD = 83.917, FvT, (LSD = 29.344

pueden contribuir a la alta actividad antioxidante reportada para propóleos (Andrade y col 2017).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que otorgan ventajas competitivas a las plantas que los contienen. Asimismo, el consumo de estos compuestos tiene efectos en el mantenimiento de la salud y tratamiento de enfermedades. En particular, diversos estudios han mostrado que los compuestos fenólicos tienen potencial como agentes antioxidantes, antihiperglicémicos, y anticancerígenos, entre otros (Matsui y col 2004; Salamanca y col 2007; Sawicka y col 2012).

## 2 Flavonoides

Los valores de flavonoides totales (FvT) de los EEP sinaloenses (19.70 – 97.36 mg EQ/g EEP) (**Cuadro 9**) fueron superiores a los reportados para los colombianos (42.47 - 4.75 mg EQ/g EEP) y similares a los de extractos etanólicos de propóleos franceses (69.3 mg EQ/g EEP) (Palomino-García y col 2009; Silva y col 2011). Mientras que Hernández-Zarate y col (2017) reportan variación de 13.2 a 379.2 mg EQ/g extracto metanólico en diferentes zonas del estado de Guanajuato. Delgado y col (2015) reportaron contenidos de flavonoides de 130 mg EQ/g EEP en propóleos colectados en Zapopan, Jalisco; estado que se caracteriza por presentar climas templados la mayor parte del año al igual que Guanajuato. Los FvT de propóleos son un parámetro de calidad que se asocia a su potencial biológico. Las normas internacionales (*e.g.,* argentina y brasileña)

han establecido un mínimo de 5 mg EQ/g de EEP (Palomino-García y col 2009), respecto a lo anterior, los EEP sinaloenses satisfacen este requisito.

La variación en el contenido de flavonoides se asocia al tipo de plantas (*e.g.*, *Callistemon citrinus, Eucalyptus camaldulensis*, *Ricinus communis*) (Londono y col 2010) y clima de la región donde se localizan los apiarios, pues las abejas los obtienen de las plantas (Hernández-Zarate y col 2017).

En la cuantificación de FvT es importante mencionar que el método del $AlCl_3$ es bastante inespecífico puesto que sólo detecta flavonoides con hidroxilación tipo catecol o específica en el anillo B o C. Sin embargo, este método es ampliamente utilizado y considerado en normas oficiales (Silva y col 2011).

## E ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA CON COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y FLAVONOIDES TOTALES

Los contenidos de FvT de los EEP-N presentaron la mejor correlación con las actividades biológicas evaluadas ($P \leq 0.05$) (**Cuadro 10**), excepto en la actividad antioxidante por DPPH ($P = 0.0563$). Además, el contenido de FT de los EEP-N fue el único que correlacionó con la actividad inhibitoria de α-glucosidasa ($P \leq 0.05$). Adicionalmente, los FT sólo presentaron correlación significativa con la actividad antioxidante por ABTS (N y C) y ORAC (S).

La actividad antioxidante de propóleos se ha asociado con su contenido de compuestos fenólicos y flavonoides (Ribeiro y col 2012). Sin embargo, los resultados de los propóleos de Sinaloa sugieren la participación de compuestos

**Cuadro 10**. Correlación de la actividad antioxidante, antimutagénica e inhibitoria de α-glucosidasa con el contenido de fenólicos totales y flavonoides totales.

| Método | Coeficiente de correlación (r) (Valor P) | |
|---|---|---|
| | **Fenólicos** | **Flavonoides** |
| ABTS N | **0.9726*** **(0.0000)** | **0.8925*** **(0.0005)** |
| ABTS C | **0.8826*** **(0.0007)** | 0.4490 (0.1930) |
| ABTS S | 0.1885 (0.5718) | <0.3647 (0.2739) |
| DPPH N | 0.6121 (0.0663) | 0.6364 (0.0563) |
| DPPH C | <0.0272 (0.9405) | 0.1292 (0.7220) |
| DPPH S | 0.3233 (0.3622) | <0.3448 (0.3292) |
| ORAC N | 0.4912 (0.1494) | **0.6682*** **(0.0347)** |
| ORAC C | 0.2628 (0.4632) | 0.4046 (0.2461) |
| ORAC S | **0.7630** **(0.0103)** | <0.1435 (0.6924) |
| Inhibición de α-Glucosidasa N | **0.8152*** **(0.0041)** | **0.7483*** **(0.0128)** |
| Inhibición de α-Glucosidasa C | <0.4714 (0.1690) | 0.1410 (0.6977) |
| Inhibición de α-Glucosidasa S | 0.1895 (0.6000) | <0.1785 (0.6217) |
| Antimutagénico N | <0.5809 (0.0783) | **<0.6887*** **(0.0276)** |
| Antimutagénico C | 0.0788 (0.8131) | 0.5152 (0.1222) |
| Antimutagénico S | 0.4430 (0.1998) | <0.1069 (0.7687) |

*Correlación estadísticamente significativa. En negrita se indican los parámetros que muestran valores de P que corresponden a una correlación significativa o que están muy cerca de tal valor.

pertenecientes a otras familias. Por el método DPPH no se observó correlación de la actividad antioxidante con el contenido de FT y FvT, por lo que la actividad antioxidante presentada por los extractos etanólicos podría atribuirse a fenólicos muy activos pero no detectables con el método empleado, a la presencia de otro tipo de compuestos, a sinergismos de éstos compuestos fenólicos o a la suma total del efecto antioxidante de cada compuesto (Olivas-Quintero 2015).

Los EEP-N fueron los únicos que presentaron correlación significativa entre los FT y FvT con la actividad inhibitoria de la enzima α-glucosidasa ($r \cong 1$, $P \leq 0.05$) (**Cuadro 10)**. La actividad inhibitoria de α-glucosidasa de productos naturales ha sido asociada a diferentes fitoquímicos (Chai y col 2016), entre los que se incluyen fenólicos (*e.g*., alfa y gama mangostino, ácido cafeico, curcumina, ácido ferúlico, ácido siríngico) y flavonoides (*e.g*., tectocrisina, 3',4',7-trihidroxiflavona, catequina, daizeína, naringenina) (Kim y col 2010; Vongsak y col 2015; Rasouli y col 2017). Sin embargo, la nula correlación del contenido de fenólicos de los EEP-C y EEP-S con la actividad inhibitoria de α-glucosidasa sugiere que otros compuestos son los responsables. Un fenómeno similar se registró en la ausencia de correlación entre los FT y la actividad antimutagénica.

Ahora bien, la ausencia de correlación entre fenólicos o flavonoides con las actividades biológicas no necesariamente significa que no sean los responsables de dichas actividades. En los EEP pueden estar presentes fenólicos/flavonoides muy activos pero que no contribuyen significativamente a la medición colorimétrica utilizada (Olivas-Quintero 2015).

## F IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPONENTES INDIVIDUALES POR CG-EM

Los EEP estudiados mostraron un gran número de compuestos con diferentes estructuras químicas (*e.g.*, compuestos nitrogenados, fitoesteroles, ácidos grasos, ácidos carboxílicos, azúcares). De manera general, los EEP-N y EEP-C fueron más complejos que los EEP-S, en los extractos derivatizados se observaron un mayor número de compuestos que en los sin derivatizar (**Figuras 8** y **9; ANEXOS 1 - 6**). El cromatograma de CG-EM confirmó que existen diferencias entre las muestras de propóleos de las zonas de Sinaloa, indicando la influencia de características climáticas y florísticas específicas de cada zona.

La identificación a partir de los espectros de masas, en una mezcla compleja como el propóleo, es una tarea difícil debido al número de isómeros y a las diferencias mínimas en los espectros de algunos de los componentes (Pereira y col 2000).

A valores de tiempo de retención entre 16.438 y 28.007 min se detectaron los ésteres etílicos de los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico, los cuales, presentaron abundancias relativas de (0.510 - 7.21%); a los 23.58 min se identificaron alcaloides como *N*-formil-2,4-diol-6-ona-morfina (31.72% abundancia relativa); de los 46 a los 49 min se presentaron vitaminas y tocoferoles; y entre 54.4 a 69.09 min fueron detectados triterpenos. Asimismo se registró la presencia de ácidos fenólicos y alcoholes, entre otros metabolitos. La diversidad y variabilidad de los compuestos registrados en los propóleos de

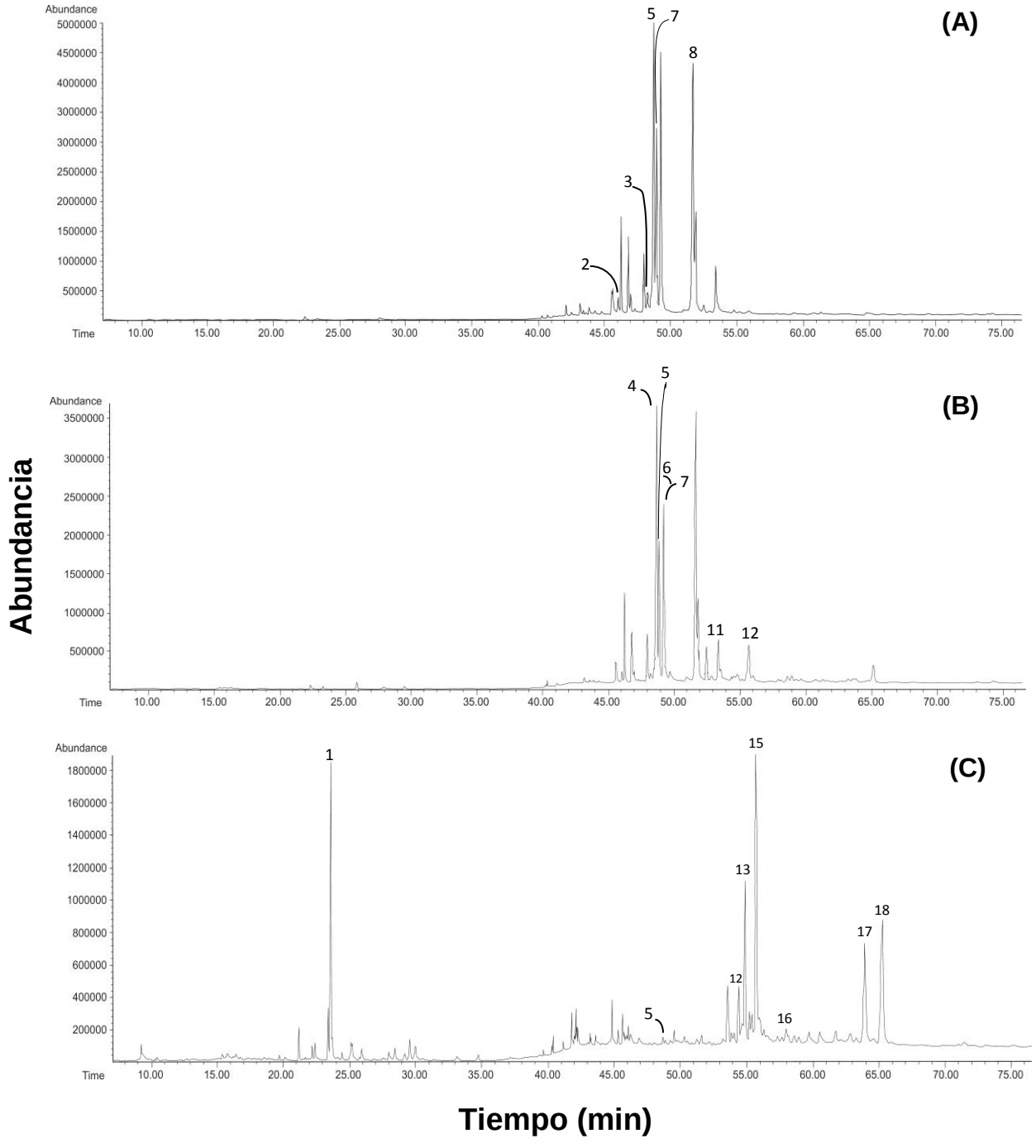


**Figura 8**. Cromatogramas de gases-masas de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) de Sinaloa sin derivatizar de las zonas (A) norte, (B) centro y (C) sur.

Los compuestos correspondientes a los picos principales (numerados) se identifican en el **Cuadro 11**.

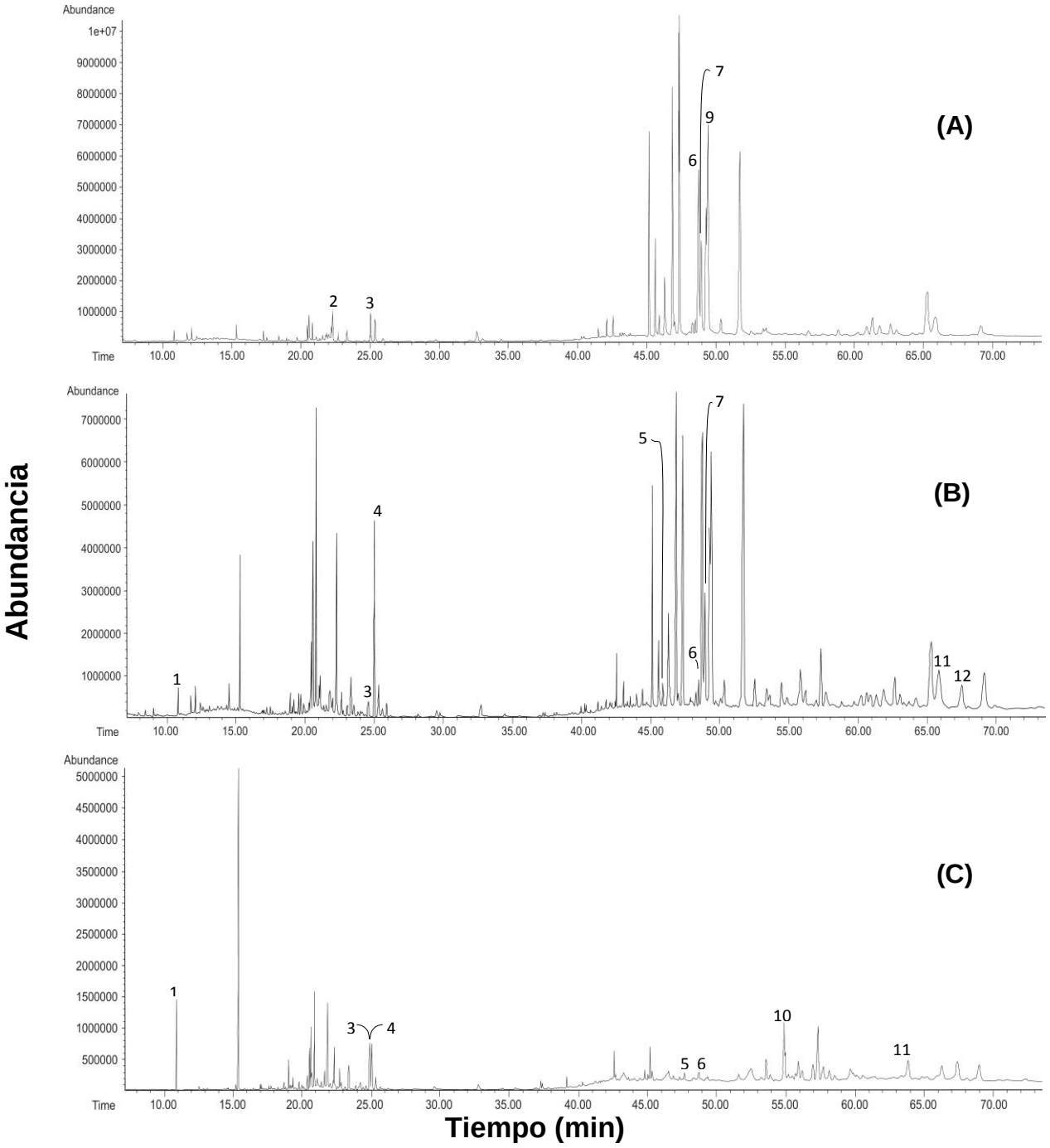


**Figura 9**. Cromatogramas de gases-masas de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) de Sinaloa derivatizados de las zonas (A) norte, (B) centro y (C) sur.

Los nombres de los compuestos de los picos principales (numerados) se indican en el **Cuadro 12**.

Sinaloa, muchos de ellos con actividades biológicas registradas, soportan los usos en medicina tradicional asociados al propóleo. Los resultados muestran que los EEP evaluados poseen una composición compleja, caracterizada principalmente por la presencia de ácidos grasos y sus ésteres, así como triterpenos. Sin embargo, la metodología empleada no permitió la detección de flavonoides o ácidos fenólicos en las muestras.

Los triterpenos son producidos por diversas especies de plantas, en diferentes tejidos (*e.g.*, hojas corteza), y son componentes de resinas o gomas (Al-Ghamdi y col 2017). La importancia de los triterpenoides como fuente de medicamentos para tratar diversas enfermedades crónicas está creciendo rápidamente (Jagan y Chinthalapally 2012). Muchos datos sugieren que tanto los triterpenos naturales como los sintéticos tienen actividades anticancerígenas potenciales, actuando principalmente en la supresión de la inflamación crónica al modular los mediadores proinflamatorios. Al respecto, se identificaron triterpenos tanto en muestras derivatizadas como sin derivatizar, aunque en estos últimos los porcentajes relativos de área fueron menores (**Cuadro 11** y **12**). Se identificaron principalmente α-amirina, lupeol, germanicol, y lup-20(29)-en-3-ona. Estos triterpenos ya han sido reportados por Marquez-Hernandez y col (2010) en propóleos cubanos, pero en pequeñas cantidades. En relación con las actividades biológicas asociada a compuestos específicos, α- y β-amirina aisladas de *Alstonia boonei* inhiben la inflamación en modelo animal (Okoye y col 2014). Por su parte, Trusheva y col (2006) identificaron mediante cromatografía

de gases a los compuestos α-amirina, β-amirina, cicloartenol y lupeol, donde β-amirina fue el más

**Cuadro 11.** Principales componentes químicos de los extractos etanólicos de propóleo (EEP) de diferentes zonas de Sinaloa (Norte, N; Centro, C; y Sur, S), sin derivatizar, determinados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).[1]

| Pico | Compuesto | RT (min) | EEP-N | EEP-C | EEP-S |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | % relativo de área | | |
| 1 | *N*-formil-2,4-diol-6-ona-morfina | 23.58 | - | - | 31.72 |
| 2 | Vitamina E | 46.08 | 4.11 | - | - |
| 3 | Albaspidina | 48.00 | 4.52 | - | - |
| 4 | 5-(2,2-Dimetiletil)-1,3-benzodioxol | 48.72 | - | 18.65 | - |
| 5 | 4-(4'-amino)-2,2',3,3',5,5',6,6'-2,5-ciclohexadien-1-ona, octametil[1,1'-bifenil]-4-il)imino]-2,3,5,6-tetrametil | 48.74 | 21.60 | 19.67 | 5.10 |
| 6 | Etanona, 1-[(5à,25*R*)-espirostan-20-il] | 48.74 | - | 23.43 | - |
| 7 | Triflupromazina | 48.92 | - | 10.32 | - |
| 8 | Ç-Tocoferol | 49.24 | - | 16.03 | - |
| 9 | α-Tocoferol | 49.24 | - | 15.09 | - |
| 10 | Ç-Tocoferol | 49.28 | 17.65 | - | - |
| 11 | Quinina | 51.74 | 22.07 | - | - |
| 12 | α-Amirina | 54.4 | - | - | 8.15 |
| 13 | Lup-20(29)-en-3-ona | 54.88 | - | 8.62 | 26.71 |
| 14 | Lupeol | 55.70 | - | 4.65 | - |
| 15 | Lupeol | 55.73 | - | - | 29.91 |
| 16 | α –Amirina | 58.17 | - | - | 8.62 |
| 17 | Taraxasterol | 65.21 | - | - | 11.85 |
| 18 | Lupeol | 65.19 | - | - | 15.46 |
| 19 | Taraxasterol | 65.21 | | | 18.85 |

[1]Compuestos más abundantes y/o compuestos con potencial bioactivo.

**Cuadro 12.** Principales componentes químicos de los extractos etanólicos de propóleo (EEP) de diferentes zonas de Sinaloa (Norte, N; Centro, C; y Sur, S), derivatizados, determinados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).[1]

| Pico | Compuesto | RT (min) | EEP-N | EEP-C | EEP-S |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | % relativo de área | | |
| 1 | Éter de glicerol | 10.82 | - | 10.28 | 10.28 |
| 2 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-D-glucopiranosa(trimetilsililo) | 22.31 | 9.63 | - | - |
| 3 | 2,3,4,5,6-pentakis-O-talopiranosa(trimetilsililo) | 25.05 | 11.06 | 5.78 | 20.91 |
| 4 | *N*-acetilacetato quebracidina (éster) | 25.05 | - | 23.59 | 23.59 |
| 5 | Ácido a *bis*-trimetilsilil-ë-9-tetrahidrocannabinol | 47.33 | - | 4.48 | 4.48 |
| 6 | 1*H*-2,8ª-metanociclopenta[a]ciclopropa[e]ciclodecen-11-ona, 1a,2,5,5a,6,9,10a-octahidro-5,5a,6-trihidroxi-1,4-*bis*(hidroximetil)-1,7,9-trimetil | 47.33 | 4.25 | - | - |
| 7 | 2,5-Ciclohexadien-1-ona, 4-[(4'-amino-2,2',3,3',5,5',6,6'-octametil[1,1'-bifenil]-4-il)imino]-2,3,5,6-tetrametil | 48.71 | 10.16 | 4.48 | 4.48 |
| 8 | Metilprednisolona | 48.73 | 8.38 | - | - |
| 9 | α-Tocoferol | 49.24 | | 15.09 | - |
| 10 | 3,4-Dimetoxi-*dl*-fenilalanina | 49.25 | 10.74 | - | - |
| 12 | Lupeol | 55.75 | - | - | 25.07 |
| 13 | Germanicol | 65.21 | - | 5.95 | 5.92 |
| 14 | α–Amirina trimetilsilil éter | 69.09 | - | 4.93 | - |

[1]Compuestos más abundantes y/o compuestos con potencial bioactivo.

abundante; este tipo de triterpenos son típicos de propóleos brasileños y además aislaron el compuesto puro lup-20(29)-en-3-ona. En relación con nuestros resultados, fueron similares a los registrados para propóleos brasileños; al identificarse α-amirina y lup-20(29)-en-3-ona en EEP-S que en estudios previos han mostrado una fuerte actividad antimutagénica y que pudieran ser los responsables de esta actividad en los EEP de Sinaloa. Kim y col (2001) encontraron que el compuesto lup-20(29)-en-3-ona posee actividades antibióticas contra bacterias y hongos, además presenta actividad antioxidante similar a la del tocoferol. Para demostrar las actividades biológicas de componentes específicos será indispensable llevar a cabo separaciones biodirigidas y el análisis de las actividades biológicas de componentes individuales y mezclas.

Los EEP derivatizados de las tres regiones evaluadas se caracterizaron por la presencia de diferentes tipos de azúcares. Arabinofuranosa, D-glucosa, D-galactopiranosa, talosa, mio-insitol y ribitol fueron identificadas en las tres regiones de estudio. Los azúcares en los propóleos estudiados pueden provenir de azúcares libres o bien de la hidrólisis de compuestos glicosilados y polímeros más complejos presentes en plantas (Huang y col 2014). Ramnath y col (2015) estudiaron propóleos colectados en 6 regiones de la India y registraron carbohidratos similares a los reportados en propóleos de Sinaloa (*e.g.*, D-fructosa y α-D-glucosa).

Los alcaloides son compuestos químicos naturales y tienen una amplia gama de actividades farmacológicas que incluyen antimaláricas, antiasmáticas, anticancerígenas, analgésicas y antibacterianas, y se utilizan en la medicina

tradicional y moderna. El alcaloide morfina sólo fue identificado en el EEP-S (31.72%) (**Cuadro 11**) y el tetrahidrocanabinol en los EEP del C y S (ambos con 4.48%) (**Cuadro 12**); la morfina se ha identificado en propóleos provenientes de Argelia (Soltani y col 2017). Al igual que en propóleos de Sinaloa, en propóleos provenientes de la India se identificaron diversos alcaloides tales como stricano, ciclopropano benzazol, papaverolina, C-homoeritrina y neronina (Ramnath y col 2015). Adicionalmente, en los EEP de las zonas N y S se identificaron vitaminas E y A. Las diferencias en la composición química de los propóleos están ligados a los tipos de vegetación predominantes en las zonas de colecta.

## G RECURSOS BOTÁNICOS

Este es el primer reporte acerca del potencial origen botánico del propóleo de Sinaloa. La información que aportan los recursos botánicos es básica en cuestiones de control de calidad; permiten establecer la asociación entre la vegetación, la composición química y sus actividades biológicas. En el **Cuadro 13** se presentan las principales familias de plantas que se identificaron en cada zona de muestreo. De manera particular, cada región presentó un tipo de vegetación característico; el mayor número de familias y especies se registró para las zonas norte y centro, así como la mayor similitud de flora. Las familias con mayor número de especies fueron Fabaceae (14), Cactaceae (5) y Euphorbiaceae (4) en la zona norte; y Fabaceae (10), Cactaceae (4) y Apocynaceae (3) en la zona Sur. La vegetación predominante de las zonas norte y centro fue bosque espinoso, mientras que los apiarios del sur se encontraban en zonas de manglares

**Cuadro 13.** Número de especies de las principales familias de plantas representadas en las áreas de estudio.

| Familia | Región de estudio | | |
|---|---|---|---|
| | Norte | Centro | Sur |
| Acanthaceae | - | - | 2 |
| Amarantaceae* | 1 | - | - |
| Apocynaceae | 2 | 3 | - |
| Arecaeae | | - | 1 |
| Asparagaceae | 1 | - | - |
| Asteraceae* | 1 | - | - |
| Bignoniaceae | | 2 | - |
| Bixaceae | 1 | - | - |
| Boraginaceae | - | - | 2 |
| Bromeliaceae | - | 1 | 1 |
| Burseraceae* | 1 | 1 | - |
| Cactaceae* | 5 | 4 | - |
| Capparaceae | - | - | 3 |
| Cleomaceae | 1 | - | - |
| Combretaceae* | - | 1 | 2 |
| Convolvulaceae | 2 | 2 | - |
| Cupressaceae | 1 | - | - |
| Euphorbiaceae* | 4 | 1 | - |
| Fabaceae* | 14 | 10 | 3 |
| Fouquieriaceae | 1 | 1 | - |
| Malpighiaceae | - | 1 | - |
| Malvaceae | - | - | 1 |
| Meliaceae | - | - | 1 |
| Moraceae | - | 1 | - |
| Nyctaginaceae | - | 1 | - |
| Poaceae | 1 | - | - |
| Polygonaceae* | 1 | 1 | - |
| Primulaceae | - | 1 | - |
| Rhamnaceae | - | 2 | 1 |
| Rizophoraceae | - | - | 1 |
| Rubiaceae | - | 2 | - |
| Rutaceae | - | 3 | - |
| Salicaceae | 1 | 2 | - |
| Solanaceae | 1 | - | - |
| Verbenaceae | 1 | - | 1 |
| Zygophyllaceae | 2 | 1 | - |
| **Especies totales** | **42** | **42** | **19** |

*****Familias de plantas que incluyen a especies melíferas (Franco Olivares y col 2012)

y cercanos a huertas de mango. En las tres regiones de muestreo se encontraron plantas de *Acacia farnesiana* (vinorama), entre otras plantas pertenecientes al género *Acacia* (*e.g.*, *A. cochliacantha*, *A. angustissima*) en el norte y centro, así como *Cercidium x sonorae*, *Havardia* (*Pithecellobium*) *sonorae, Prosopis julifora,* y *Parkinsonia aculeata* en el norte; estas especies de la familia Fabaceae son ricas en resinas (Quiroz Carranza y Magaña Alejandro 2015). Vargas-Sánchez y col (2016) evaluaron el contenido de polen en propóleos de la zona central del estado de Sonora, y reportaron que la familia principal fue Fabaceae, seguido por Cactaceae, Malvaceae y Asteraceae, lo cual coincide con nuestros resultados.

Para conocer el origen botánico de nuestros propóleos es indispensable realizar un análisis microscópico para identificar gránulos de polen y vellosidades secretoras que permitan identificar las especies de plantas que son visitadas por las abejas (estudios palinológicos).

En las cercanías de los apiarios de las zonas norte y centro, donde los propóleos fueron colectados, se encontraron 42 especies de plantas, cuatro de ellas consideradas como recurso probable de resinas para la producción de propóleos (*e.g.*, *Ricinus communis* L*., "*higuerilla, ricino*"*; *Acacia farnesiana* (L.) Willd*., "*vinorama*"*; *Parkinsonia aculeata* L*., "*palo verde*"*; *Populus mexicana* Wesm., *"*álamo*"*). Mientras que en la región sur, de las 19 especies observadas. Las más abundantes fueron manglares (*e.g.*, *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*), seguidas de *Acacia farnesiana*, esta última tiene una mayor similitud con el origen botánico de los propóleos de Sinaloa, al igual que propóleos mexicanos y brasileños (Barth y Pinto da Luz 2009.

Como se mencionó anteriormente, los extractos de la zona norte presentaron la mayor diversidad de compuestos químicos identificados por CG-EM, la cual podría estar asociada con la mayor variedad de especies observadas para la región. Este tipo de vegetación coincide con lo reportado en propóleos provenientes de Sonora, México, donde se identificaron 42 tipos de polen correspondientes a 22 familias (*e.g.*, Fabaceae, Cactaceae, Malvaceae, Asteraceae) (Vargas-Sánchez y col 2016). En cuanto a los extractos de la región sur, su menor abundancia en componentes, pero mayor variabilidad en composición (*e.g.*, terpenos, alcaloides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, azúcares) proviene de una región con menor diversidad florística que incluye 19 especies pertenecientes a 12 familias botánicas (principalmente, Fabaceae, Capparaceae, Arecaeae, Combretaceae, Acanthaceae, Rhizophoraceae y Verbenaceae); en las que se localizan también huertos de mangos y manglares. Las principales familias de metabolitos identificadas en los EEP de la región sur corresponden a alcaloides (*e.g.,* tetrahidrocanabiol y morfina-2,4-diol-6-uno, N-formil) y terpenos (*e.g.,* lupeol, α–amirina y germanicol). Estos resultados coinciden con lo reportado en propóleos donde la especie *Mangifera indica* es uno de sus principales proveedores de resinas, en los que se han identificado triterpenos (*e.g.,* lupeol, lupeonona y ácido ursólico) (Ghosal y col 1978; Popova y col 2013).

En general, los EEP de Sinaloa presentaron buena actividad inhibitoria de la enzima α-glucosidasa respecto al control utilizado (acarbosa). Las familias y especies identificadas en las regiones circundantes a los apiarios de Sinaloa

coinciden con las registradas para el estado de Oaxaca; algunas de estas plantas se utilizan en la herbolaria mexicana para tratar la diabetes (*e.g.*, *Plumeria rubra*, Apocynaceae; *Acacia farnesiana*, Fabaceae; *Rhizophora mangle*, Rhizophoraceae) y para las cuales se han identificado metabolitos asociados a dicha actividad biológica tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Castro-Juárez y col 2014). En *Acacia farnesiana* se han identificado compuestos como ácido gálico, galato de metilo, miricetina, naringenina, geranil y quercetina (Delgadillo-Puga y col 2015). La familia Fabaceae está altamente representada en las tres regiones de Sinaloa y pueden contribuir de manera importante con componentes químicos identificados en los propóleos de estado de Sinaloa y a su vez con sus actividades biológicas. Adicionalmente, cabe destacar que los EEP-N fueron los únicos que presentaron correlación significativa entre FT y FvT con la actividad inhibitoria de α-glucosidasa. En la zona N se registraron especies de la familia Cactaceae, predominado especies de *Opuntia*, entre las que se incluyen las conocidas comúnmente como “nopal” (Hwang y col 2017). Para extractos de algunas especies de la familia Cactaceae se ha reportado actividad inhibitoria de α-glucosidasa y antidiabética. Adicionalmente, en plantas de esta familia se acumulan compuestos que presentan una fuerte actividad antioxidante, entre los que se incluyen flavonoides, ácidos fenólicos, triterpenos, saponinas y esteroles (Ammar y col 2015).

# VIII CONCLUSIONES

- El estudio que se presenta constituye la primera descripción fisicoquímica de propóleo procedente del estado de Sinaloa.

- La calidad fisicoquímica de los propóleos obtenidos de apiarios de Sinaloa es inadecuada, probablemente debido a que en el estado la explotación del propóleo es incipiente y las condiciones de producción son inapropiadas.

- Los extractos etanólicos de propóleos (EEP) de Sinaloa presentaron mayor actividad antioxidante que propóleos colectados en otras regiones del mundo y de México, siendo las muestras de la región sur las que presentaron los valores más altos.

- Los EEP de Sinaloa tienen potencial antidiabético al resultar mejores inhibidores de la enzima α-glucosidasa que la acarbosa, destacando los EEP-N.

- Los EEP son inocuos, considerando que no fueron tóxicos ni mutagénicos en el ensayo de Ames.

- Los EEP de Sinaloa tienen potencial anticarcinogénico asociado a su antimutagenicidad fuerte.

- Los EEP de Sinaloa tienen un alto potencial como fuente de compuestos bioactivos, presentaron un mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides que propóleos de otras regiones de México y el mundo.

- Los EEP de las diferentes zonas de muestreo pueden distinguirse por sus componentes mayoritarios: $\alpha$-tocoferol y fitoesteroles en la zona norte; así como alcaloides (*e.g.*, morfina y tetrahidrocanabiol) y terpenos (*e.g.,* lupeol y amirina) en las zonas centro y sur. Compuestos para los que se han demostrado actividades biológicas en otras investigaciones y que pueden estar contribuyendo a las actividades registradas en esta investigación.

- La diversidad florística del estado de Sinaloa se refleja en las zonas donde se ubicaron los apiarios muestreados, las familias más representadas fueron Fabaceae, Capparaceae, Arecaeae, Combretaceae, Acanthaceae, Rhizophoraceae y Verbenaceae. Especies de estas familias se han caracterizado como fuente de compuestos con potencial nutracéutico y farmacológico.

## PERSPECTIVAS

- Producir propóleos empleando mallas/rejillas en apiarios de Sinaloa y evaluar su rendimiento y calidad.
- Caracterizar los propóleos usando cromatografía de líquidos y cromatografía de líquidos acoplada a masas para detectar la presencia de otras familias de fitoquímicos (*e.g.,* flavonoides, taninos, esteroides, saponinas).
- Realizar estudios palinológicos para determinar el origen botánico de los propóleos.
- Encontrar el (los) compuesto (s) responsable (s) de las actividades antioxidante, inhibitoria de α-glucosidasa y antimutagénica de los extractos etanólicos de propóleos de Sinaloa.
- Evaluar la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de los extractos etanólicos de propóleos.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de propóleos *in vivo.*

# IX BIBLIOGRAFÍA


Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS,Nakayama T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(24):7286-7292.

Al-Ghamdi AA, Badr G, Hozzein WN, Allam A, Al-Waili NS, Al-Wadaan MA,Garraud O. 2015. Oral supplementation of diabetic mice with propolis restores the proliferation capacity and chemotaxis of B and T lymphocytes towards CCL21 and CXCL12 by modulating the lipid profile, the pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress. BMC Immunology 16:54.

Al-Ghamdi AA, Bayaqoob NIM, Rushdi AI, Alattal Y, Simoneit BRT, El-Mubarak AH,Al-Mutlaq KF. 2017. Chemical compositions and characteristics of organic compounds in propolis from Yemen. Saudi Journal of Biological Sciences 24(5):1094-1103.

Alencar SM, Aguiar CL, Paredes-Guzmán J,Park YK. 2005. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Ciencia Rural 35(4):909-915.

Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL,Ikegaki M. 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: red propolis. Journal of Ethnopharmacology 113(2):278-283.

Ames BN, McCann J,Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research 31:347-364.

Ammar I, Ennouri M,Attia H. 2015. Phenolic content and antioxidant activity of cactus (*Opuntia ficus-indica* L.) flowers are modified according to the extraction method. Industrial Crops and Products 64:97-104.

Andrade JKS, Denadai M, de Oliveira CS, Nunes ML,Narain N. 2017. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from brazilian northeast region. Food Research International 101:129-138.

Ara-Roldán. 2004. Los grandes remedios naturales. 2ª ed. Madrid, España: EDAF. 261 p.

Arrate L. 2008. Propóleo, el “antibiótico” natural de la colmena. Agropesquera 85:56-61.

Arslan S, Silici S, Percin D, Koc AN,Er O. 2012. Antimicrobial activity of poplar propolis on mutans streptococci and caries development in rats. Turkish Journal of Biology 36(1):65-73.

Aygun A,Sert D. 2013. Effects of prestorage application of propolis and storage time on eggshell microbial activity, hatchability, and chick performance in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. Poultry Science 92(12):3330-3337.

Babatunde IR, Abdulbasit A, Oladayo MI, Olasile OI, Olamide FR,Gbolahan BW. 2015. Hepatoprotective and pancreatoprotective properties of the ethanolic extract of nigerian propolis. Journal of Intercultural Ethnopharmacology 4(2):102-108.

Bankova V,Marcucci MC. 2000. Standardization of propolis: present status and perspectives. Bee World 81(4):182-188.

Bankova V, Popova M,Trusheva B. 2014. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. Chemistry Central Journal 8(1):1-8.

Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S, Midorikawa K, Matsushige K,Kadota S. 2002. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology 80(1):67-73.

Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas AA,Kadota S. 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. Journal of Ethnopharmacology 72(1-2):239-246.

Barrientos L, Herrera CL, Montenegro G, Ortega X, Veloz J, Alvear M, Cuevas A, Saavedra N,Salazar LA. 2013. Chemical and botanical characterization of chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Brazilian Journal of Microbiology 44(2):577-585.

Barth OM,Pinto da Luz CF. 2009. Palynological analysis of brazilian red propolis samples. Journal of Apicultural Research 48(3):181-188.

Basgedik B, Ugur A,Sarac N. 2015. Antimicrobial, antioxidant and antimutagenic properties of *Iris albicans*. Industrial Crops and Products 69:480-484.

Basnet P, Matsuno T,Neidlein R. 1997. Potent free radical scavenging activity of propol isolated from brazilian propolis. Zeitschrift für Naturforschung C 52(11-12):828-833.

Bayram NE, Karadayi M, Güllüce M, Bayram S, Sorkun K, Öz GC, Aydoğan MN, Koç TY, Alaylar B,Salih B. 2015. Genotoxic and antigenotoxic evaluation of propolis by using *in vitro* bacterial assay systems. Mellifera 15(1):29-36.

Benhanifia M, Mohamed WM, Bellik Y,Benbarek H. 2013. Antimicrobial and antioxidant activities of different propolis samples from north-western Algeria. International Journal of Food Science and Technology 48(12):2521-2527.

Bertrams J, Mueller MB, Kunz N, Kammerer DR,Stintzing FC. 2013. Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. Journal of Applied Botany and Food Quality 86:143-153.

Bogdanov S. 2015. Propolis: composition, health, medicine: a review. Bee Product Science [serie en línea].1-40. Disponible en http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf. abril de 2016.

Boisard S, Le Ray A-M, Gatto J, Aumond M-C, Blanchard P, Derbre S, Flurin C,Richomme P. 2014. Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a french poplar type propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62(6):1344-1351.

Bonvehí JS,Gutiérrez AL. 2011. Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque country (northeastern Spain). Journal of the American Oil Chemists' Society 88(9):1387-1395.

Brand-Williams W, Cuvelier M,Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 22:25-30.

Cabral IS, Oldoni TL, Prado A, Neves-Bezerra RM, de Alencar SM, Ikegaki M,Rosalen PL. 2009. Phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of brazilian red propolis. Quimica Nova 32(6):1523-1527.

Casanova G. 2009. Resultados y lecciones en desarrollo de productos a base de propóleos.

Castaldo S,Capasso F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia 73:S1-S6.

Castillo-García D,Woolrich-Zavaleta NL. 2009. Identificación química de compuestos fenólicos por cromatografía de HPLC con detector UV de extractos etanólicos de propóleos recolectados en la zona Córdoba-Orizaba. [Tesis de licenciatura]. Orizaba, Veracruz: Universidad Veracruzana.

Castro-Juárez CJ, Villa-Ruano N, Ramírez-García SA,Mosso-González C. 2014. Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. Revista Cubana de Plantas Medicinales 19(1):101-120.

Castro ML, Vilela WR, Zauli RC, Ikegaki M, Garcia Rehder VL, Foglio MA, de Alencar SM,Rosalen PL. 2009. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. BioMed Central Complementary and Alternative Medicine 9(25):1-6.

Chai TT, Khoo CS, Tee CS,Wong FC. 2016. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant potential of antidiabetic herb *Alternanthera sessilis*: Comparative analyses of leaf and callus solvent Fractions. Pharmacognosy Magazine 12(48):253-258.

Chaillou L, Herrera H,Maidana J. 2004. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas 24(1):011-015.

Chaillou LL,Nazareno MA. 2009. Chemical variability in propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to the arboreal environment as the sources of resins. Journal of the Science of Food and Agriculture 89(6):978-983.

Chen CN, Weng MS, Wu CL,Lin JK. 2004. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by taiwanese propolis from different sources. Evidenced-based Complementary and Alternative Medicine 1(2):175-185.

Christov R, Bankova V, Hegazi A, Abd El Hady F,Popov S. 1998. Chemical composition of egyptian propolis. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences 53(3-4):197-200.

da Silva Pinto M, Kwon Y, Apostolidis E, Lajolo FM, Genovese MI,Shetty K. 2008. Functionality of bioactive compounds in brazilian strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars: evaluation of hyperglycemia and hypertension potential using *in vitro* models. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56:4386-4392.

Daleprane JB,Abdalla DS. 2013. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

de Groot AC. 2013. Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. Dermatitis 24(6):263-282.

Delgadillo-Puga C, Cuchillo-Hilario M, Espinosa-Mendoza JG, Medina-Campos O, Molina-Jijón E, Díaz-Martínez M, Álvarez-Izazaga MA, Ledesma-Solano JÁ,Pedraza-Chaverri J. 2015. Antioxidant activity and protection against oxidative-induced damage of *Acacia shaffneri* and *Acacia farnesiana* pods extracts: *in vitro* and *in vivo* assays. BioMed Central Complementary and Alternative Medicine 15:435.

Delgado M, Andrade J,Ramírez C. 2015. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el bosque de la primavera Zapopan, Jalisco. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 6(28):78-87.

Diaz-Carballo D, Malak S, Bardenheuer W, Freistuehler M,Reusch HP. 2008. The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. Bioorganic & Medicinal Chemistry 16(22):9635-9643.

DOF. 2015. Programa Nacional de Normalización. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación. Disponible en www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5390097&fecha=24/04/2015. Consultado el 03 de marzo de 2016.

DOF. 2017. Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. Diario Oficial de la Federación. p. 1-7.

Elejalde-Guerra JI. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. Anales de Medicina Interna 18(6):326-335.

Espinosa J. 1980. Método para la evaluación de mutaciones génicas en *Salmonella* Typhimurium. Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México 1:31-47.

Farré R, Frasquet I,Sánchez A. 2004. El propólis y la salud. Ars Pharmaceutica 45(1):21-43.

Fernandes JR, Leomil L, Fernandes A,Sforcin JM. 2001. The antibacterial activity of propolis produced by *apis mellifera* L. and brazilian stingless bees. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases 7(2):173-182.

Figueroa-Benavides CP. 2012. Análisis de la calidad y actividad antiinflamatoria tópica *in vivo* de propóleos de la región metropolitana. [Tesis de licenciatura]. Santiago, Chile: Universidad de Chile.

Franco Olivares VH, Siqueiros Delgado ME,Hernández Ayala EG. 2012. Flora apícola del estado de Aguascalientes. 244 p.

Fu JY, Xia Y,Zheng YY. 2004. Antimutagenicity of propolis against some mutagens *in vivo* and *in vitro*. Biomedical and Environmental Sciences 17(4):469-475.

Gao L, inventor; Beijing Increase Pharm Technology Co Ltd, cesionario. 2009 10 de Junio de 2009. Pharmaceutical composition useful for decreasing blood sugar, comprises balsam pear, rhizoma anemarrhenae, dwarf lilyturf root, chromium picolinate and propolis. China patente CN101450174-A.

Garcia-Viguera C, Greenaway W,Whatley FR. 1992. Composition of propolis from 2 different spanish regions. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences 47(7-8):634-637.

Ghosal S, Biswas K,Chattopadhyay BK. 1978. Differences in the chemical constituents of *Mangifera indica*, infected with *Aspergillus niger* and *Fusarium moniliformae*. Phytochemistry 17(4):689-694.

Graikou K, Popova M, Gortzi O, Bankova V,Chinou I. 2016. Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? LWT - Food Science and Technology 65:261-267.

Gregoris E,Stevanato R. 2010. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. Food and Chemical Toxicology 48(1):76-82.

Gülcin I, Bursal E, Sehitoglu MH, Bilsel M,Goren AC. 2010. Polyphenols contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from. Food and Chemical Toxicology 48(8-9):2227-2238.

Guo X, Chen B, Luo L, Zhang X, Dai X,Gong S. 2011. Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of chinese propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(23):12610-12616.

Hernández-Zarate MS, Abraham-Juárez MR, Cerón-García A, Gutiérrez-Chávez AJ, Gutiérrez Arenas DA,Avila-Ramos F. 2017. Contenido de flavonoides, fenoles y actividad antioxidante de propóleos colectados en Guanajuato, México. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos 2:607-612.

Hernández MS, Lazo CS, Jound JM, Arancibia JM, Flores RS, Valencia EA,Valenzuela EV. 2005. Características organolépticas y físico-químicas de propóleos de la provincia de Ñuble, VIII región-Chile. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 55(4).

Hong Y, inventor; Hong Y, cesionario. 2015 25 de Marzo de 2015. Topical pharmaceutical composition used for treating chronic persistent inflammation of female genital cavity. China patente CN104435048-A.

Huang D, Boxin O,Prior R. 2005. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:1841-1856.

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA,L PR. 2002. High-Throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50:4437-4444.

Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ,Hu FL. 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. Molecules 19(12):19610-19632.

Hwang SH, Kang I-J,Lim SS. 2017. Antidiabetic effect of fresh nopal (*Opuntia ficus-indica*) in low-dose streptozotocin-induced diabetic rats fed a high-fat diet. Evidence -Based Complementary and Alternative Medicine 2017:4380721.

INEGI. 2014. Estadística: Banco de Información INEGI. Disponible en http://www.inegi.org.mx. Consultado el 18 de abril de 2016.

IRAM-INTA 15935-1 IAdN. 2008a. Parte 1: Propóleos en bruto. En: Normalización, IAd, editor. Subcomité de productos agroalimentarios del NOA.

IRAM-INTA 15935-1 IAN. 2008b. Parte 1: Propóleos en bruto. En: Normalización, IAd, editor. Subcomité de productos agroalimentarios del NOA.

Isla MI, Zampini IC, Ordóñez RM, Cuello S, Carrasco B, Sayago JE, Nieva MI, Alberto MR, Vera NR, Bedascarrasbure E, Alvarez A, Cioccini F,Maldonado LM. 2009. Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. Journal of Medicinal Food 12(6):1334-1342.

Jagan MRP,Chinthalapally VR. 2012. Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects. Current Pharmaceutical Biotechnology 13(1):147-155.

Jagua-Gualdrón A. 2012. Cáncer y terapéutica con productos de la colmena. Revisión sistemática de los estudios experimentales. Revista de la Facultad de Medicina 60(2):79-94.

Jeng SN, Shih MK, Kao CM, Liu TZ,Chen SC. 2000. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. Food and Chemical Toxicology 38(10):893-897.

Julkunen-Tiitto. 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows methods for the analysis of certain phenolics. Agricultural and Food Chemistry 33(2):213-217.

Kado NY, Langley D,Eisenstadt E. 1983. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. Mutation Research Letters 121:25-32.

Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinos I,Karathanos VT. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. Food Chemistry 116(2):452-461.

Kasote D, Ahmad A, Chen W, Combrinck S,Viljoen A. 2015. HPTLC-MS as an efficient hyphenated technique for the rapid identification of antimicrobial compounds from propolis. Phytochemistry Letters 11:326-331.

Kasote D, Suleman T, Chen W, Sandasi M, Viljoen A,van Vuuren S. 2014. Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis. Biochemical Systematics and Ecology 55:156-163.

Kim EM, Jung HR,Min TJ. 2001. Purification, structure determination and biological activities of 20(29)-lupen-3-one from *Dedaleopsis tricolor* (Bull. ex Fr.) Bond. et Sing. Bulletin of the Korean Chemical Society 22(1):59-62.

Kim J-S, Kwon Y-S, Chun W-J, Kim T-Y, Sun J, Yu C-Y,Kim M-J. 2010. *Rhus verniciflua* Stokes flavonoid extracts have anti-oxidant, anti-microbial and α-glucosidase inhibitory effect. Food Chemistry 120(2):539-543.

Kitamura H, Naoe Y, Kimura S, Miyamoto T, Okamoto S, Toda C, Shimamoto Y, Iwanaga T,Miyoshi I. 2013. Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in *ob/ob* mice: Possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue. Adipocyte 2(4):227-236.

Krell. 1996. Value-added products from beekeeping. FAO: Agriculture and Consumer Protection.

Kumazawa S, Serra Bonvehi J, Torres C, Mok-Ryeon A,Orantes Bermejo FJ. 2013. Chemical and Functional Characterisation of Propolis Collected from East Andalusia (Southern Spain). Phytochemical Analysis 24(6):608-615.

Kuropatnicki AK, Szliszka E,Krol W. 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013:11.

Lahouel M, Boutabet K, Kebsa W,Alyane M. 2010. Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 4(10):712-720.

Londono A, Ávila JG, Canales MM, Hernández CT, Serrano PR, García CG,Cruz TA. 2010. Antibacterial comparative study between extracts of Mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. Journal of Animal and Veterinary Advances 9(8):1250-1254.

Lopez P, Espinosa M, Piechowska M,Shugar D. 1980. Influence of bacteriophage PBS1 and phi W-14 deoxyribonucleic acids on homologous deoxyribonucleic acid uptake and transformation in competent Bacillus subtilis. Journal of Bacteriolology 143(1):50-58.

Lotti C, Campo-Fernandez M, Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Marquez-Hernandez I,Rastrelli L. 2010. Chemical constituents of red mexican propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58:2209-2213.

Luna-Limaico CG. 2011. Estudio de dos promotores inmunológicos de origen natural (propóleo, polen) y su incidencia en la producción de pollos de engorde, en el sector el Tejar, provincia de Imbabura. [Tesis de licenciatura]. Ibarra, Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra.

Maldonado L. 2000. Perfil de los propóleos argentinos. Actas del Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires. Argentina. p. 11-12.

Maron DM,Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects 113:173-215.

Marquez-Hernandez I, Cuesta-Rubio O, Campo-Fernandez M, Rosado-Perez A, Montes de Oca Porto R, Piccinelli AL,Rastrelli L. 2010. Studies on the constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of

triterpenoids and flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(8):4725-4730.

Martínez de Leo ME, Palacio-Fernández JM, Salmerón-Jiménez AB, Ochoa-Bautista R, Ortega-Rivas C, Rodríguez-Cruz F, Velázquez-Luján JL,Álvarez-Hernández A. 2010. Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. Claridades Agropecuarias. p. 3-34.

Martínez J, Garcia C, Durango D,Gil J. 2012. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recoleccion. MZV Córdova 17(1):2861-2869.

Matsui T, Ebuchi S, Fujise T, Abesundara KJM, Doi S, Yamada H,Matsumoto K. 2004. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-Tri-*O*-caffeoylquinic acid. Biological and Pharmacautical Bulletin 27(11):1797-1803.

Mercado Libre. 2018. Extracto de propóleo puro 25 mL. mercadolibre.com: Melizmiel. Disponible en https://articulo.mercadolibre.com.mx/MLM-610691939-2-goteros-extracto-de-propoleo-puro-sin-alcohol-25ml-_JM. 19/02/2018.

Montero M. 1996. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Anales de la Facultad de Medicina 57(4):278-281.

Moreno-Nieva MI, Zampini IC, Ordonez RM, Vattuone MA,Isla MI. 2005. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. Journal of Agricultural of Food Chemistry 53:8957-8962.

Nagai T, Inoue R, Hinoue H,Suzuki N. 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. Food Chemistry 80:29-33.

Nobukawa T, Kadota S,Matsushige K, inventores; Kotosugi Kk, cesionario. 2003 10 de Septiembre de 2003. Pharmaceutical composition for use as health food for treating and preventing cancer, comprises propolis blended with Chinese yew. China patente JP2003252773-A.

Okoye NN, Ajaghaku DL, Okeke HN, Ilodigwe EE, Nworu CS,Okoye FBC. 2014. beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of Alstonia boonei display profound anti-inflammatory activity. Pharmaceutical Biology 52(11):1478-1486.

Olivas-Quintero S. 2015. Actividades biológicas de las plantas endémicas de Sinaloa *Helicteres vegae* y *Heliopsis sinaloensis* y su asociación con el contenido de fenólicos. [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Sinaloa. 120 p.

Ozkirim A, Celemli OG, Schiesser A, Charistos L,Hatjina F. 2014. A comparison of the activities of Greek and Turkish propolis against Paenibacillus larvae. Journal of Apicultural Research 53(5):528-536.

Palomino-García LR, García-Pajón CM, Gil-González JH, Rojano BA,Durango-Restrepo D. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Vitae-Revista De La Facultad De Quimica Farmaceutica 16(3):388-395.

Palomino-García LR, Martínez-Galán JP, García-Pajón CM, Gil-González JH,Durango-Restrepo DL. 2010. Caracterización fisicoquímica y actividad

antimicrobiana del propóleos en el municipio de la unión (Antioquia, Colombia). Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín 63(1):5373-5383.

Papotti G, Bertelli D, Bortolotti L,Plessi M. 2012. Chemical and Functional Characterization of Italian Propolis Obtained by Different Harvesting Methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(11):2852-2862.

Paulino N, Dantas AP, Bankova V, Longhi DT, Scremin A, de Castro SL,Calixto JB. 2003. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits *in vitro* contraction of airway smooth muscle. Journal of Pharmacological Sciences 93(3):307-313.

Paviani LC, Fiorito G, Sacoda P,Cabral FA. 2015. Different solvents for extraction of brazilian green propolis-composition and extraction yield of phenolic compounds. Cartagena de Indias, Colombia.

Pereira AS, Norsell M, Cardoso SM,Aquino FR. 2000. Rapid screening of polar compounds in brazilian propolis by high-temperature high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48:5226-5230.

Pham-Huy LA, He H,Pham-Huy C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. Journal of Biomedical Science 4(2):89-96.

Piccinelli AL, Lotti C, Campone L, Cuesta-Rubio O, Fernandez MC,Rastrelli L. 2011. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(12):6484-6491.

Popova M, Dimitrova R, Al-Lawati HT, Tsvetkova I, Najdenski H,Bankova V. 2013. Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. Chemistry Central Journal 7(1):158.

Popova MP, Graikou K, Chinou I,Bankova VS. 2010. GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(5):3167-3176.

Quintero-Mora ML, Londono-Orozco A, Hernandez-Hernandez F, Manzano-Gayosso P, Lopez-Martinez R, Ignacio Soto-Zarate C, Carrillo-Miranda L, Penieres-Carrillo G, Gerardo Garcia-Tovar C,Cruz-Sanchez TA. 2008. Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth. Revista Iberoamericana de Micologia 25(1):22-26.

Quiroz Carranza JA,Magaña Alejandro MA. 2015. Resinas naturales de especies vegetales mexicanas: usos actuales y potenciales. Madera y bosques 21(3):1-20.

Ramli S, Harada K-i,Ruangrungsi N. 2011. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Leaves ethanolic extract. Pharmacognosy Journal 3(23):50-58.

Ramnath S, Venkataramegowda S,Singh C. 2015. Chemical composition of bee propolis collected from different regions in India by GCMS analysis. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 30(1):1319-1328.

Rao C, Desai D, Kaul B, Amin S,Reddy B. 1992. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. Chemico-Biological Interactions 84:277-290.

Rasouli H, Hosseini-Ghazvini SM, Adibi H,Khodarahmi R. 2017. Differential alpha-amylase/alpha-glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. Food & Function 8(5):1942-1954.

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 & Medicine 26(9/10):1231-1237.

Ribeiro IS, Cadorin TL, Alencar SM, Rosalen PL,Ikegaki M. 2012. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). Brazilian Journal of Pharmacautical Sciences 48(3):557-564.

Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H,Salatino A. 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. Journal of Agricultural and Food Chemestry 91(13):2363-2370.

Rios N, Yanez C, Rojas L, Mora F, Usubillaga A,Vit P. 2014. Chemical composition of essential oil of *Apis mellifera* propolis from Falcon State, Venezuela. Emirates Journal of Food and Agriculture 26(7):639-642.

Rodríguez Y, Sánchez-Catalán F, Rojano B, Durango D, Gil J,Marín-Loaiza J. 2012. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 15(2):303-311.

SAGARPA. 2010. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. GANADERÍA: Publicaciones, Notiabeja. Disponible en www.sagarpa.gob.mx. Consultado el 18 de abril de 2016.

Salamanca G, Correa IL,Principal J. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. Zootecnia Tropical 25(2):95-102.

Salatino A, Teixeira EW, Negri G,Message D. 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2(1):33-38.

Salomao K, Pereira PRS, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC,de Castro SL. 2008. Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 5(3):317-324.

Sawicka D, Car H, Borawska MH,Nikliński J. 2012. The anticancer activity of propolis. Folia Histochemica et Cytobiologica 50(1):25-37.

Sforcin JM. 2007. Propolis and the immune system: a review. Journal of Ethnopharmacology 113(1):1-14.

Sharma K,Zafar R. 2015. Occurrence of taraxerol and taraxasterol in medicinal plants. Pharmacognosy Reviews 9(17):19-23.

SIAP. 2004. Resumen estatal pecuario. México D.F.: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-estatal-pecuario/. Consultado el 12 de marzo de 2016.

SIAP. 2016. Avance mesnsual de la producción pecuaria - Sinaloa. http://infosiap.siap.gob.mx/: Servicio de Información Agroalimentaria y

Pesquera (SIAP). Disponible en http://infosiap.siap.gob.mx/. Consultado el 13 de febrero de 2018.

Silici S,Kutluca S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. J Ethnopharmacol 99(1):69-73.

Silva V, Genta G, Möller MN, Masner M, Thomson L, Romero N, Radi R, Fernandes DC, Laurindo FRM, Heinzen H, Fierro W,Denicola A. 2011. Antioxidant activity of uruguayan propolis. *In vitro* and cellular assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59:6430-6437.

Singleton VL,Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16:144-158.

Skaba D, Morawiec T, Tanasiewicz M, Mertas A, Bobela E, Szliszka E, Skucha-Nowak M, Dawiec M, Yamamoto R, Ishiai S, Makita Y, Redzynia M, Janoszka B, Niedzielska I,Krol W. 2013. Influence of the toothpaste with brazilian ethanol extract propolis on the oral cavity health. Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine 2013:215391.

Soltani EK, Cerezuela R, Charef N, Mezaache-Aichour S, Esteban MA,Zerroug MM. 2017. Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and *in vitro* effects on gilthead seabream innate immune responses. Fish and Shellfish Immunology 62:57-67.

Szliszka E, Zydowicz G, Janoszka B, Dobosz C, Kowalczyk-Ziomek G,Krol W. 2011. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate

cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. International Journal of Oncology 38(4):941-953.

Tavares DC, Mazzaron Barcelos GR, Silva LF, Chacon Tonin CC,Bastos JK. 2006. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. Toxicology in Vitro 20(7):1154-1158.

Toche N. 2015. México podría convertirse en un país exportador de propóleo. El Economista: El Economista. Disponible en http://eleconomista.com.mx/entretenimiento/2015/10/27/mexico-podria-convertirse-pais-exportador-propoleo. Consultado el 05 de marzo de 2016.

Tolosa L,Cañizares E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extracto de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica 43(1-2):37-55.

Tosi EA, Ciappini MC, Cazzolli AF,Tapiz LM. 2006. Physicochemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentine). Apiacta 41:110-120.

Tran VH, Duke RK, Abu-Mellal A,Duke CC. 2012. Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from Acacia paradoxa. Phytochemistry 81:126-132.

Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FD,Tsvetkova I. 2006. Bioactive constituents of brazilian red propolis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 3(2):249-254.

Trusheva B, Popova M, Koendhori EB, Tsvetkova I, Naydenski C,Bankova V. 2011. Indonesian propolis: chemical composition, biological activity and botanical origin. Natural Product Research 25(6):606-613.

Turan I, Demir S, Misir S, Kilinc K, Mentese A, Aliyazicioglu Y,Deger O. 2015. Cytotoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 14(5):777-782.

Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, Garibay-Escobar A, Galvez-Ruiz JC, Salas-Reyes M, Jimenez-Estrada M, Valdez-Contreras,Hernandez J. 2012. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. Food Chemistry 131:645-651.

Valles-Peticholi D. 2015. Valida científicamente propiedades de productos apícolas. México, D.F. Disponible en http://conacytprensa.mx/index.php/ciencia/salud/3646-validan-cientificamente-propiedades-de-productos-apicolas-reportaje. Consultado el 20 de febrero de 2016.

Vargas-Sánchez RD, Peñalba-Garmendia MC, Sánchez-Escalante JJ, Torrescano-Urrutia GR,Sánchez-Escalante A. 2016. Perfil de polen del propóleos producidos en el borde oriental del Desierto de Sonora. Acta Botánica Mexicana 114:69-85.

Vargas-Sánchez RD, Torrescano-Urrutia GR,Sánchez-Escalante A. 2013. El propóleos: Conservador potencial para la industria alimentaria. Interciencia 38(10):707-711.

Vega-Aviña R. 2000. Catálogo y base de datos preliminar de la flora de Sinaloa. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L057**. México, D.F.

Vit P. 2004. Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel 35(2):32-39.

Vongsak B, Kongkiatpaiboon S, Jaisamut S, Machana S,Pattarapanich C. 2015. *In vitro* alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. Revista Brasileira de Farmacognosia 25:445-450.

Wang Y, inventor; Wang Y, cesionario. 2008 24 de Diciembre de 2008. Chinese traditional herbal composition for treating psoriasis, mainly contains cedar resin oil, cypress crystal, shrubalthea bark, propolis, pine kernel oil, Angelica dahurica, and nutgall. CN101327231-A; CN101327231-B.

Watanabe M, Sofuni T,Nohmi T. 1993. Comparison of the sensitivity of *Salmonella* typhimurium strains YG1024 and YG1012 for detecting the mutagenicity of aromatic amines and nitroarenes. Mutation Research 301:7-12.

Woisky GR,Salatino A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apicultural Research 37(2):99-105.

Wu XY, Li F, Zhao T, Mao GH, Li J, Qu HY, Ren YN,Yang LQ. 2012. Enhanced anti-diabetic activity of a combination of chromium(III) malate complex and propolis and its acute oral toxicity evaluation. Biological Trace Element Research 148(1):91-101.

Yang H, Dong Y, Du H, Peng Y,Li X. 2011. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. Molecules 16:3444-3455.

Yoong AM. 2004. Caracterización-fisicoquimica del propóleo de la Escuela Agricola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya. [Licenciatura]. Zamorano, Honduras: Escuela Agricola Panamericana. 62 p.

Zhang H, Wang G, Beta T,Dong J. 2015a. Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase. Evidence -Based Complementary and Alternative Medicine:1-7.

Zhang J, Cao X, Ping S, Wang K, Shi J, Zhang C, Zheng H,Hu F. 2015b. Comparisons of ethanol extracts of Chinese propolis (Poplar Type) and poplar gums based on the antioxidant activities and molecular mechanism. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

Zhu W, Chen M, Shou Q, Li Y,Hu F. 2011. Biological activities of chinese propolis and Brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine:1-8.

## ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| % | Porciento |
| °C | Grados Celsius |
| µL | Microlitros |
| µmol | Micromol |
| 1-NP | 1-nitropireno |
| AAPH | 2,2’-azobisamidinopropano |
| ABTS | 2,2’-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfóxido) |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| CG-EM | Cromatografía de gases espectrometría de masas |
| CoA | Coenzima A |
| col | Colaboradores |
| DOF | Diario Oficial de la Federación |
| DPPH | 2,2.difenil-1-picrilhidrazilo |
| e.g. | Por ejemplo |
| EAG | Equivalentes de ácido gálico |
| EE.UU. | Estados Unidos de América |

| | |
|---|---|
| EEP | Extracto etanólico de propóleo |
| EEP-C | Extracto etanólico de propóleo centro |
| EEP-N | Extracto etanólico de propóleo norte |
| EEP-S | Extracto etanólico de propóleo sur |
| ET | Equivalentes de Trolox |
| FT | Fenólicos totales |
| FvT | Flavonoides totales |
| $IC_{50}$ | Concentración necesaria para inhibir el 50% |
| mg | Miligramos |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |
| ng | Nanogramos |
| nm | Nanómetro |
| No | Número |
| ORAC | Capacidad de absorción de radicales oxígeno |
| p/v | Peso/volumen |

| | |
|---|---|
| PBS | Amortiguador de sodio y fosfato |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundo |
| TEAC | Capacidad antioxidante equivalente de trolox |
| UV-Vis | Ultravioleta visible |

## ANEXOS

**Anexo 1.** Composición química de extractos etanólicos de propóleos sin derivatizar del norte (EEP-N) de Sinaloa determinada por CG-EM[1].

| EEP | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Compuesto químico | | | | % relativo de área | | | | | | | | | |
| No. | Nombre | TR (min) | MM | N1 | N2 | N3 | N4 | N5 | N6 | N7 | N8 | N9 | N10 |
| 1 | Ácido n-hexadecanóico | 22.40 | 256 | - | - | - | - | - | - | **0.58** | - | - | - |
| 2 | Ácido-2- [2- (2,3-dimetoxifenil) etenil] benzoico | 40.71 | 284 | - | - | - | - | - | - | **2.45** | - | - | - |
| 3 | Vitamina E | 46.08 | 430 | **4.11** | - | - | - | - | - | - | - | 1.04 | - |
| 4 | (3*R*)-trans-[3,4-*bis*(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)]dihidro-2(3H)-furanona | 46.28 | 354 | **5.68** | **5.76** | **4.75** | 3.21 | **4.54** | - | **4.94** | **4.45** | **5.05** | **7.73** |
| 5 | Ácido bifenil-4,4'-*bis*-(4-pentil-fenil éster) dicarboxílico | 46.81 | 534 | - | - | - | - | - | **4.09** | - | - | - | - |
| 6 | 3-(1-etoxi-17b-hidroxiandrosta-1,5-die-17a-il) propiónico g-lactona | 46.82 | 370 | - | - | **4.19** | **4.17** | - | - | **4.64** | - | 3.98 | **7.53** |
| 7 | 3,4-Dimetoxi-dl-fenilalanina | 46.82 | 225 | - | **5.04** | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | 3-(1-etoxi-17b-hidroxiandrosta-1,5-die-17a-il) propiónico g-lactona | 46.83 | 370 | **4.46** | - | - | - | - | - | - | **4.44** | - | - |
| 9 | 3,4,5-trimetoxi-bencenoetanamina | 48.00 | 211 | - | - | - | 1.70 | - | - | **4.52** | - | - | - |
| 10 | Albaspidina | 48.00 | 460 | - | - | - | - | - | **4.52** | - | **4.35** | - | - |
| 11 | 4-[1-[4-(acetiloxi)-3,5-dimetoxifenil]etoxi]-3-metoxi benzaldehido | 48.01 | 374 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **5.27** |

**Anexo 1**. Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 | 5-(2,2-dimetiletil)-1,3-benzodioxol | 48.75 | 178 | **25.06** | **22.19** | **-** | **23.40** | **-** | **-** | **21.97** | **17.05** | **22.75** | **-** |
| 13 | 4-[(4'-amino-2,2',3,3'5,5',6,6'-octametil[1,1'-bifenil]-4-il)imino]-2,3,5,6-tetrametil-2,5-ciclohexadien-1-ona | 48.75 | 442 | **-** | **-** | **21.60** | **-** | **-** | **19.72** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 14 | 3,5-dimetilanisol | 48.76 | 136 | **-** | **-** | **-** | **-** | **21.80** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 15 | (25R)-5à-furost-20(22)-en-26-ol | 48.95 | 400 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **16.35** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 16 | Ácido-3,8-dihidroxibiciclo [3.3.1] nona-1(8),3-diene-2,4,6,9-tetracarboxílico tetrametil éster | 48.95 | 384 | **-** | **15.63** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 17 | 8-Cianometil-2-metoxi-7-metoxicarbonil-1,1,7-trimetil-2,4a-oximetano-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a,9-dodecahidrofenantren-9-ona | 48.96 | 401 | **-** | **-** | **-** | **10.32** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **21.72** |
| 18 | Ácido-15-Oxapentaciclo [12.6.0.0 (1,6) .0 (2,18) .0 (8,13)] icosa-8 (13) 9,12-dimetil -17-metil-9,11-trien-5-carboxílico metil éster | 48.96 | 400 | **-** | **-** | **16.05** | **-** | **-** | **-** | 0.01 | **16.04** | **11.53** | **-** |
| 19 | 4,4'-(1,2-etenediil) *bis*piridina | 48.98 | 182 | **-** | **-** | **-** | **-** | **11.72** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 20 | 3,15,16,21,22,28-hexol,(3à,15à,16à,21à,22à)-olean-12-eno | 48.98 | 506 | **10.16** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 21 | 3-Acetoxi-20-hidroximetil-4,4,1-trimetil-8-regne | 49.26 | 416 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **13.27** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 22 | Alcohol-3,4-dimetoxifenetilo | 49.27 | 182 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **22.21** |
| 23 | Ç-Tocoferol | 49.28 | 416 | **-** | **17.65** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 24 | Acetato de 6-(3,4-dihidro-3,5,8-trimetil-3-(4,8,12-trimetiltridecacil))-(2*H*)1-benzopirano | 49.28 | 458 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **14.36** | **14.92** | **-** |
| 25 | 3-Acetoxi-24-fenil-25-nor-9,19-ciclolanostan-24-ona | 49.28 | 518 | **-** | **-** | **17.01** | **20.92** | **-** | **-** | **17.19** | **-** | **-** | **-** |
| 26 | Triacetato de 14á-pregn-5-ene- | 49.30 | 508 | **-** | **-** | **-** | **-** | **16.26** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |

**Anexo 1**. Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3á,8,11à,12à,14,20-hexol | | | | | | | | | | | | |
| 27 | Pentafenilpiridina | 49.31 | 459 | **17.79** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 28 | (5à)-Oxima-(1'*H*)-colest-2-eno[3,2-b]indol-ona | 51.70 | 488 | - | **23.47** | - | - | - | - | **22.31** | - | **23.62** | **29.34** |
| 29 | 17-(acetiloxi)-6-metil-6-[(TMS)oxi]-3,-*O*-metiloxima-pregn-4-en-3,20-diona | 51.73 | 503 | - | - | **26.60** | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 | 3,4,5-Trimetoxi-*N*-metil-bencenoetanamina | 51.74 | 269 | - | - | - | - | **22.72** | **24.34** | - | - | - | - |
| 31 | Quinina | 51.74 | 324 | **22.07** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32 | 15-(1-oxooctadecil)-7,15-diazadispiro[5.1.5.3]hexadecano | 51.74 | 488 | - | - | - | **25.84** | - | - | - | - | - | - |
| 33 | 17-(1,5-dimetilhexil)-10,13-dimetil-3-stirilhexadecahidro ciclopenta[a]fenantrene-2-ona | 51.75 | 488 | - | - | - | - | - | - | - | **22.79** | - | - |
| 34 | *bis*[difenil]-1,3-fenilen-fosfina | 51.90 | 446 | - | - | - | - | - | **7.62** | - | - | - | - |
| 35 | (1S)-(1à,3aà,4à,6aà)]-tetrahidro-1,4-*bis*(3,4,5-trimetoxifenil)-1*H*,3*H*-furo [3,4-c]furano | 51.91 | 446 | **5.11** | - | **5.89** | **5.83** | - | - | **6.64** | **7.65** | **9.73** | - |
| 36 | Ácido-(4a,5-dihidro-4a-metoxi-6-metil-5-oxo)- 6*H*-piridazino[1,6-a]quinoxaline-2,3,4-tricarboxílico trimetil éster | 51.95 | 417 | - | - | - | - | **7.93** | - | - | - | - | - |
| 37 | 2-Metil-3,4,5,6-tetrafenilpiridina | 53.43 | 397 | 0.83 | 3.14 | 3.90 | 2.79 | - | - | - | **5.29** | 3.96 | **6.19** |
| 38 | Ácido-(2à,3á,5à,6á)-1-acetil-6-(acetiloxi)-aspidofractine-3-carboxilico metil éster | 53.46 | 438 | - | - | - | - | - | **6.26** | - | - | - | - |

[1]Negritas indican compuestos con mayor área (>4%).

**Anexo 2.** Composición química de extractos etanólicos de propóleos derivatizados del norte (EEP-ND) de Sinaloa determinada por CG-EM[1].

| EEP | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Compuesto químico | | | | % relativo de área | | | | | | | | | |
| **No.** | **Nombre** | **TR (min)** | **MM** | **ND1** | **ND2** | **ND3** | **ND4** | **ND5** | **ND6** | **ND7** | **ND8** | **ND9** | **ND10** |
| 1 | D-1,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) fructosa | 20.62 | 540 | | | | 3.78 | **7.45** | | | | | 2.78 |
| 2 | L-1,2,3,4,5-pentakis-*O*-(TMS) sorbopiranosa | 20.62 | 540 | | | | | | | | | 2.48 | |
| 3 | D-1,3,4,5,6-pentakis-*O*- (TMS) fructosa | 20.85 | 540 | | | 2.33 | **5.41** | 0.49 | | | | | 3.18 |
| 4 | D-2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) glucosa | 22.31 | 540 | **9.63** | | 2.03 | **7.33** | | | | | 1.91 | |
| 5 | L-6-desoxi-2,3,4,5-tetrakis-*O*-(TMS) manosa | 22.31 | 452 | | | | | | | | **5.21** | | |
| 6 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) glucopiranosa | 22.66 | 540 | | | **4.91** | | | | | | | |
| 7 | D-2,3,4,5-tetrakis-*O*-(TMS) ribosa | 25.04 | 438 | | | | | | **4.71** | | | | |
| 8 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) talosa | 25.05 | 540 | **11.06** | | | | 1.10 | | | | | |
| 9 | D-2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) glucosa | 25.05 | 540 | | | | **10.61** | | | | **6.25** | | |
| 10 | 2-(tetrahidro-2-furanil)-1*H*-indol | 45.16 | 187 | | | | | | **9.12** | | | | |
| 11 | Di(pentametilfenil)cetona | 45.16 | 322 | | | | | | | | **8.63** | | |
| 12 | 2- [4-metil-6- (2,6,6-trimetilciclohex-1-enil) hexa-1,3,5-trienil] ciclohex-1-en-1-carboxaldehído | 45.17 | 324 | | | | 1.77 | **5.97** | | | | | **5.88** |
| 13 | 6,16-Dimetil-(16à)-pregna-1,4,6-trien-3,20-diona | 45.61 | 338 | 1.59 | | | | 2.93 | **4.22** | | | **5.23** | 2.94 |

**Anexo 2**. Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14 | D-à-Tocoferol | 46.07 | 430 | | | | | | | 1.53 | | | |
| 15 | 3,4-*bis*(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)dihidro-,(3*R*-trans)- 2(3*H*)-furanona | 46.28 | 354 | 2.75 | **6.69** | **4.48** | 1.76 | 2.81 | 1.86 | **5.80** | | 3.01 | 3.39 |
| 16 | 3-(1-etoxi-17b-hidroxiandrosta-1,5-dien-17a-il) propiónico g-lactona | 46.81 | 370 | | | | | | | **5.45** | | | |
| 17 | 1,2-Dimetoxi-4-[[(4-metilfenil)sulfonil]metil] benceno | 46.81 | 306 | | **4.33** | | | | | | | | |
| 18 | Acetato de metilprednisolona | 46.84 | 416 | | | **9.05** | | | | | | | |
| 19 | 2-Biciclo[2.2.1]hept-2-il-4,6-dimetil-fenol | 46.85 | 400 | | | | | | **9.12** | | | | |
| 20 | Colesta-3,5-dien-7-ona | 46.86 | 382 | | | | | | | | **10.12** | | |
| 21 | Acetato de metilprednisolona | 46.87 | 416 | | | | | | | | | | **8.80** |
| 22 | 2,4-Diamin-1,3,5-triazina-fenilo | 46.87 | 187 | **10.28** | | | | | | | | | |
| 23 | 2- [4-metil-6- (2,6,6-trimetilciclohex-1-enil) hexa-1,3,5-trienil] ciclohex-1-en-1-carboxaldehído | 46.89 | 324 | | | | **7.91** | **10.46** | | | | | |
| 24 | 1H-2,8a-Metanociclopenta[a]ciclopropa[e] ciclodecen-11-ona, 1a,2,5,5a,6,9,10a-octahidro-5,5a,6-trihidroxy-1,4-bis(hidroximetil)-1,7,9-trimetil | 47.33 | 364 | | | | **4.25** | | | | | | |
| 25 | Ácido-2,5,58a-Tetrametil-3-oxo-3,4,4a5,6,7,8,8a-octahidronaftaleno-1-carboxílico,2-(TMS)-etil éster | 47.34 | 350 | **6.58** | | | | | | | | | |
| 26 | *N*-acetil-2-[-3-[3,4,5-trimetoxifenil]propionil] fenilpropilamina | 47.34 | 459 | | | | | | **15.60** | | | | |
| 27 | 11,21-*bis*[(TMS)oxi]-,*bis*(*O*-metiloxime)-(11á)-pregna-4-ene- | 47.34 | 548 | | | | | | | | **20.80** | | |

**Anexo 2.** Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3,20-diona | | | | | | | | | | | | |
| 28 | Acetato de 17-hidroxi-6à,I6à-dimetil-pregna-1,4-dien-3,20-diona | 47.36 | 398 | | | 3.35 | | **11.33** | | | | **17.03** | **9.83** |
| 29 | 4-[(4'-amino-2,2',3,3',5,5',6,6'-octametil[1,1'-bifenil]-4-il)imino]-2,3,5,6-tetrametil)-2,5-ciclohexadien-1-ona | 48.71 | 442 | **10.16** | | **15.31** | | | | **6.85** | | | |
| 30 | 2,3,10,17,18, 22-hexahidro-2,2,7,8,12,13,15,17,17-nona metil-21*H*,23*H*-porpina | 48.73 | 442 | | | | | | **25.78** | | | | |
| 31 | 5-(2,2-dimetiletil)-1,3-benzodioxol | 48.73 | 178 | | **24.78** | | **9.93** | **8.68** | | | | **11.53** | |
| 32 | Metilprednisolona | 48.73 | 374 | | | | | | | | | | **8.38** |
| 33 | Ácido-9,12-dimetil-17-metil-15-oxapentaciclo[12.6.0.0(1,6).0(2,18).0(8,13)]icosa-8(13),9,11-trien-5-carboxílico-metil éster | 48.90 | 400 | | **16.34** | **10.02** | 3.82 | **5.15** | | **5.39** | | | **6.52** |
| 34 | 2-Metilen-5,5,8a-trimetil-1-[2,5-di(metoximetoxi)benzil]-trans-decalina | 48.92 | 402 | | | | | | | | | **7.62** | |
| 35 | Ácido-17-(1,5-dimetilhexil)-10,13-dimetil-6-oxo-2,3,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16, 17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[a]fenantren acético | 48.92 | 442 | | | | | | **15.55** | | | | |
| 36 | p-Sexifenil | 49.23 | 458 | | | | | 3.89 | | | | | |
| 37 | 3,4-Dimetoxi-dl-fenilalanina | 49.25 | 225 | | | **10.74** | | **6.24** | | | | | |
| 38 | 1,2-Dimetoxi-4-[[(4-metilfenil)sulfonil]metil] benceno | 49.25 | 306 | | | | | | | **4.50** | | | |
| 39 | 4-Butil-1,2-dimetoxi benceno | 49.25 | 194 | | **18.31** | | | | | | | | |
| 40 | 3,4-Dimetoxi-dl-fenilalanina | 49.26 | 225 | | | | | | | | | **7.28** | |
| 41 | Pentafenilpiridina | 49.27 | 459 | | | | **7.94** | | | | | | |
| 42 | Triacetato de 14á-Pregna-5-ene-3á,8,11à,12á,14,20-hexol | 49.27 | 508 | | | | | | | | | | **5.19** |

**Anexo 2.** Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 43 | 3-(1-metil-1-feniletil) tiofeno | 49.27 | 202 | **6.89** | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 44 | 3,4,5-Trimetoxi-*N*-metil-bencenoetanamina | 49.37 | 225 | | | | | **7.42** | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | Espiro[biciclo[3.3.0]oct-6-ene-3-ciclopropan], 6-(1-TMS(oxi)ciclopropil | 49.38 | 262 | | | | | | | **5.78** | | | | | | | | | | | |
| 46 | (3á,20á)-Olean-12-ene-3,28,29-triol | 49.40 | 458 | | | | | | | | | | | **12.51** | | | | | | | |
| 47 | *N*-(3-piridinil metilen) enzenamina | 49.41 | 182 | **8.81** | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 48 | Ácido-[3aS(3aà,6á,6aà,9aá,9bà)] decahidro-6a-hidroxi-9a-metil-3-metilen-2,9-dioxoazulen(4,5-b]furan-6-il) -2-metil-propanoico, metil éster | 49.43 | 350 | | | | | | | | | | | | | | | **11.38** | | **17.18** | |
| 49 | 3,3',4,4'-tetradehidro-1-1', 2, 2'-tetradehidro-1,1'-dimetoxi-2,2'-dioxo-caroteno | 49.45 | 624 | | | | | | | | | **12.40** | | | | | | | | | **11.09** |
| 50 | Ácido-2-yodo-5-metil-4-oxaciclo[4.2.1.03,7]nona-en-6-carboxílico | 51.65 | 308 | | | **26.53** | | | | | | | | | | | | | | | |
| 51 | 17-(1,5-dimetilhexil)-10,13-dimetil-3-stirilhexadecahidro ciclopenta[a]fenantren-2-ona | 51.66 | 488 | | | | | **21.34** | | **12.09** | | | | **10.86** | | | | **10.83** | | | **11.18** |
| 52 | 2,6-Dimetil,4-(metilamino) piridina | 51.68 | 182 | **11.16** | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 53 | 4,4 '-(1,2-etenodiil) *bis*piridina | 51.68 | 182 | | | | | | | | | **11.94** | | | | | | | | **16.13** | |
| 54 | Ácido *bis*-(2-bifenil-4-il-2-oxoetil éster)-2-metilensuccinico | 51.68 | 518 | | | | | | | | | | | | | **26.18** | | | | | |
| 55 | [1*S*-(1à,3aà,4à,6aà)]-tetrahidro-1,4-*bis*(3,4,5-trimetoxifenil)-1*H*,3*H*-furo[3,4-c] furano | 51.85 | 446 | | | | | | | | | | | | | **7.79** | | | | | |
| 56 | Oxoberberina | 53.40 | 351 | | | | | | | | | | | | | 2.85 | | | | | |
| 57 | Ácido-(14á,20á)-8-Norus-9(11)-en-12-one-28-oic-3-acetoxi, metil éster | 65.21 | 512 | | | | | | | | | | | **6.61** | | | | | | | |

**Anexo 2.** Continuación…

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 58 | Ácido-17-(2-iodo-1-metiletil)-4,4,10,13,14-pentametil-2,3,4,5,6,7,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecanohidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren acético | 65.27 | 526 | **5.18** | **4.66** |

[1]Negritas indican compuestos con mayor área (>4%).

**Anexo 3.** Composición química de extractos etanólicos de propóleos sin derivatizar del centro (EEP-C) de Sinaloa determinada por CG-EM[1].

| EEP | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Compuesto químico | | | | % relativo de área | | | | | | | | | |
| No. | Nombre | TR (min) | MM | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 |
| 1 | (*Z*)-7,7-diciano-1-(1-ciclopenten-3-ona-1-il)- biciclo[4.1.0]heptano | 23.59 | 226 | - | - | - | - | - | **6.27** | - | - | - | - |
| 2 | (3*R*-trans)-3,4-*bis*(1,3-benzodioxol-5-il-metil)dihidro-2(3*H*)-furanona | 46.27 | 354 | **4.96** | **4.02** | **4.35** | **4.2** | - | 2.39 | 2.23 | 3.14 | 3.25 | 3.47 |
| 3 | 2,3-Dihidro-7-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-5-metoxi-8-(3-metil-2-butenil)- 4*H*-1-benzopiran-4-ona | 46.85 | 354 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **7.19** |
| 4 | 5-(2,2-dimetiletil)-1,3-benzodioxol | 48.72 | 178 | - | - | **18.65** | **22.05** | **15.16** | **10.27** | **9.68** | **15.98** | - | **12.4** |
| 5 | 4-[(4'-amino-2,2',3,3',5,5',6,6'-octametil[1,1'-bifenil]-4-il)imino]-2,3,5,6-tetrametil-2,5-ciclohexadien-1-ona | 48.74 | 442 | - | **19.67** | - | - | - | - | - | - | **13.66** | - |
| 6 | 1-[(5à,25*R*)-espirostan-20-il]-etanona | 48.74 | 442 | **23.43** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | (25*R*)-5à-furost-20(22)-en-26-ol | 48.88 | 400 | - | - | - | - | - | - | - | **5.35** | - | - |
| 8 | Ácido-3,5-dihidroxi-3-metil-benzhidrilpentanóico | 48.87 | 313 | - | - | - | - | **6.42** | - | - | - | - | - |
| 9 | 2[[4-(1,1-dimetiletil)-2,6-dinitrofenil]amino]-1-butanol | 48.89 | 311 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **7.41** |
| 10 | Ácido-2,2-*bis*(pentametilfenil)-acético | 48.92 | 352 | - | - | **12.69** | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | Triflupromazina | 48.92 | 352 | **10.32** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

**Anexo 3.** Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 | Ácido-15-oxapentaciclo[12.6.0.0(1,6).0(2,18).0(8,13)]icosa-8(13),9,11-trieno-5-carboxílico, 9,12-dimetoxi-17-metil-metil éster | 48.89 | 400 | - | **9.93** | - | - | - | **6.51** | **6.86** | - | **8.65** | - |
| 13 | 3,4-Dimetoxi-bencenoacetamida | 49.23 | 195 | - | - | - | - | **11.49** | - | - | - | - | - |
| 14 | 3,4-Dimetoxi-dl-fenilalanina | 49.24 | 225 | - | - | - | - | - | - | **8.14** | - | - | - |
| 15 | Ácido-8-(2,5-dimetoxifenil)-6-metil-2-(4-metilpent-3-enil)octa-2,6-dienóico etil éster | 49.24 | 400 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **10.5** |
| 16 | ç-Tocoferol | 49.24 | 416 | - | - | - | **16.03** | - | **7.22** | - | - | - | - |
| 17 | á-Tocoferol | 49.24 | 416 | **15.09** | **14.27** | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 | 3-Acetoxi-24-fenil-25-Nor-9,19-cyclolanostan-24-ona | 49.24 | 518 | - | - | - | - | - | - | - | - | **11.88** | - |
| 19 | à-(3,4-Dimetoxifenil)tetrahidro-3-hidroxi-4-veratril-3-furanometanol | 49.24 | 404 | - | - | - | - | - | - | - | **13.84** | - | - |
| 20 | 3,4-Dihidro-3,5,8-trimetil-3-(4,8,12-trimetiltridecil)-(2*H*)1-benzopiran-6-acetato | 49.25 | 458 | - | - | **10.86** | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 | 1-Amino-2-(4-fluorobenzoil)-5-metil-6,7,8,9-tetrahidrotieno[2,3-c]isoquinolina | 49.68 | 340 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **10.99** |
| 22 | Espiro decahidro [2*H*-ciclopenta[a]pentalen-2,2'-[1,3]ditiolan]-7-ol | 51.66 | 354 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **15.63** |
| 23 | 4,4'-(1,2-etenediil)*bis*-piridina | 51.72 | 182 | **26.66** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24 | 17-(acetiloxi)-6-metil-6-[(TMS) oxi]-3-(*O*-metiloxima)-(6á)-pregn-4-en-3,20-diona | 51.72 | 503 | - | **24.56** | - | - | **17.53** | - | - | - | - | - |
| 25 | (5à) -Oxima -1'*H*-colest-2-eno[3,2-b]indol-6-ona | 51.64 | 488 | - | - | - | **21.84** | - | **13.6** | **12.28** | **15.81** | **21.19** | - |
| 26 | 17-(1,5-dimetilhexil)-10,13-dimetil-3-stirilhexadecahidro | 51.69 | 488 | - | - | **21.93** | - | - | - | - | - | - | - |

**Anexo 3.** Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ciclopenta[a]fenantren-2-ona | | | | | | | | | | | | |
| 27 | [1S(1à,3aà,4à,6aà)tetrahidro-1,4-*bis*(3,4,5-trimetoxifenil)-1*H*,3*H*-furo[3,4-c]furano | 51.89 | 446 | **7.29** | **5.92** | **6.34** | **5.8** | **4.66** | **4.3** | **-** | **-** | **6.63** | **-** |
| 28 | [(6a,7,8,10a-tetrahidro-6,6,9-trimetil-3-pentil-6*H*-dibenzo[b,d]piran-1,8-diil)*bis*(oxi)]*bis*[dimetilfenilsilano | 51.83 | 598 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **4.79** |
| 29 | Lupeol | 55.70 | 426 | **4.65** | **5.81** | **5.78** | **9.96** | **9.08** | **11.08** | **11.83** | **10.74** | **-** | **-** |
| 30 | Perhidro-1,2,4a,6b,9,9,12a-heptametil-10-hidroxi-6a,14a-metanopiceno | 55.72 | 426 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **7.29** | **-** |
| 31 | (3á)-9,19-ciclolanost-24-en-3-ol | 55.74 | 426 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **10.26** |
| 32 | A'-Neogammacer-22(29)-en-3-ona | 63.88 | 424 | **-** | **-** | **-** | **-** | **6.12** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 33 | 13,27-Cicloursano | 63.92 | 424 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **5.74** | **-** | **-** | **-** |
| 34 | Perhidro-1,2,4a,6b,9,9,12a-heptametil-10-hidroxi-6a,14a-metanopiceno | 65.24 | 426 | **-** | **-** | **-** | **-** | **15.39** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 35 | D-Friedoolean-7-ol-acetato | 65.27 | 470 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **18** | **-** |
| 36 | 14-Norursano-3,12-diol | 65.27 | 430 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **19.59** | **-** | **-** |
| 37 | 9,19-Ciclolanostano-3,7-diol | 65.29 | 444 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **21.25** | **-** | **-** | **-** |
| 38 | 4-Amino-2-ciclopentil-5,6-trimetilenpirimidina | 65.31 | 203 | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **16.25** | **-** | **-** | **-** | **-** |

[1]Negritas indican compuestos con mayor área (>4%).

**Anexo 4.** Composición química de extractos etanólicos de propóleos derivatizados del centro (EEP-CD) de Sinaloa determinada por CG-EM[1].

| EEP | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Compuesto químico | | | | % relativo de área | | | | | | | | | |
| **No.** | **Nombre** | **TR (min)** | **MM** | **CD 1** | **CD 2** | **CD 3** | **CD 4** | **CD 5** | **CD 6** | **CD 7** | **CD 8** | **CD 9** | **CD 10** |
| 1 | TMS éter de glicerol | 10.82 | 308 | - | 1.01 | 1.05 | 1.56 | 1.62 | 3.03 | 4.13 | 1.27 | 3.78 | **10.28** |
| 2 | 1,2,3,4-tetrakis[(TMS)oxi] butano | 15.33 | 410 | 2.09 | - | **4.16** | **4.39** | - | **5.72** | **9.38** | **5.23** | **12.98** | **19.46** |
| 3 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) glucosa | 20.48 | 540 | - | - | - | - | - | - | **5.47** | - | - | - |
| 4 | D-2,3,4,5,6-pentakis -*O*-(TMS) glucosa | 20.49 | 540 | - | - | - | - | - | - | - | - | **5.14** | - |
| 5 | L-6-deoxi-2,3,4,5-tetrakis-*O*-(TMS) manosa | 20.49 | 452 | - | - | - | - | **7.24** | - | - | - | - | **5.74** |
| 6 | D-2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) manosa | 20.50 | 540 | - | - | - | **4.49** | - | - | - | 2.75 | - | - |
| 7 | D-1,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) fructosa | 20.62 | 540 | 3.70 | **6.31** | **5.69** | - | - | **4.31** | - | **6.60** | - | - |
| 8 | 5-(4-amiloxifenil)-2-(4-butoxi-2-hidroxifenil)pirimidina | 20.63 | 406 | - | - | - | **10.90** | - | - | - | - | - | - |
| 9 | Yoduro de 2-metil-1-fenil-isoquinolinium | 20.63 | 347 | - | - | - | - | - | - | - | - | **10.76** | - |
| 10 | D-1,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) fructosa | 20.85 | 540 | **6.70** | **9.33** | **11.10** | - | **11.35** | **6.58** | - | **10.38** | - | - |
| 11 | 1,2,3,4,6-pentakis-*O*-(TMS) galactopiranosa | 22.31 | 540 | **4.49** | **9.22** | **7.57** | **14.94** | **9.31** | **5.37** | **16.32** | **7.55** | **14.19** | - |
| 12 | Ácido-á-d-metil-2,3,5-*tris*-*O*-(TMS)- galactofuranosidurónico metil éster | 23.10 | 438 | - | - | 0.86 | 2.40 | 2.14 | - | **5.66** | 3.36 | - | - |
| 13 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) | 23.36 | 540 | - | 2.01 | 1.65 | 3.38 | 3.77 | 3.15 | - | 2.42 | **4.51** | - |

**Anexo 4.** Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | gulosa | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) talosa | 25.05 | 540 | **5.78** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) talosa | 25.05 | 540 | - | - | - | **20.91** | - | **6.65** | - | **10.86** | **19.32** | - |
| 16 | D-2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) glucosa | 25.05 | 540 | - | **12.75** | **9.11** | - | **12.84** | - | - | - | - | - |
| 17 | Acetato de N-acetil-tetridine | 25.05 | 436 | - | - | - | - | - | - | **23.59** | - | - | - |
| 18 | 1,2,3,4,5,6-hexakis-*O*-(TMS) Myo-inositol | 25.63 | 612 | - | - | - | - | - | - | **7.24** | - | - | 2.47 |
| 19 | TMS glicerol éter | 45.16 | 308 | **5.02** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | 2-[4-metil-6-(2,6,6-trimetilciclohex-1-enil)hexa-1,3,5-trienil]ciclohex-1-en-1-carboxaldehído | 46.85 | 324 | 1.02 | **5.97** | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 | 11,21-*bis*[(TMS)oxi]-*bis*(*O*-metiloxima)-(11á)- pregn-4-en-3,20-diona | 47.33 | 548 | 0.77 | - | - | - | - | **4.06** | - | - | - | - |
| 22 | Ácido-*bis*(TMS)-ë-9-tetrahidrocannabinol | 47.33 | 502 | - | **4.48** | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | 5-(2,2-dimetiletil)-1,3-benzodioxol | 48.70 | 178 | - | **6.98** | 1.28 | 2.95 | - | 2.79 | - | **4.28** | - | - |
| 24 | 4-[(4'-amino-2,2',3,3',5,5',6,6'-octametil[1,1'-bifenil]-4-il)imino]-2,3,5,6-tetrametil-2,5-ciclohexadien-1-ona | 48.70 | 442 | 1.39 | - | **4.48** | - | **4.05** | - | - | - | - | - |
| 25 | 9,12-Dimetoxi-17-metil-15-oxapentaciclo[12.6.0.0(1,6).0(2,18).0(8,13)]icosa-8(13),9,11-trieno-5-carboxílico, metil éster | 48.97 | 400 | **4.85** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 26 | Pentafenilpiridina | 49.25 | 459 | - | **4.24** | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 27 | 3,4-Dimetoxifenilacetona | 49.31 | 194 | **7.04** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 28 | 2,3,4-*tris*[(TMS)oxi]-1,3,5(10)-trien-17-ona | 49.37 | 518 | - | - | **4.68** | - | - | - | - | - | - | - |

**Anexo 4.** Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 29 | 1,3,5-tritert-butil-3-(3,5-ditert-butil-4-hidroxibenzil)- 4-noraren-2-ona | 49.41 | 494 | - | **7.05** | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 | 2,3,4-*tris*[(TMS)oxi]-1,3,5(10)-trien-17-ona | 49.45 | 518 | **12.10** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 31 | 17-(1,5-dimetilhexil)-10,13-dimetil-3-estirilhexadecahidro ciclopenta[a] fenantren-2-ona | 51.63 | 488 | - | **10.53** | **7.05** | **4.49** | - | - | - | **5.37** | - | - |
| 32 | (5à)-Oxima-1'*H*-Cholest-2-eno[3,2-b]indol-6-ona | 51.65 | 488 | - | - | - | - | **6.56** | - | - | - | - | - |
| 33 | 2,4-Fenil -4*H*-1,3-benzodioxina | 51.66 | 288 | - | - | - | - | - | **4.21** | - | - | - | - |
| 34 | 17-(1,5-dimetilhexil)-10,13-dimetil-3-estirilhexadecahidro ciclopenta[a]fenantren-2-ona | 51.77 | 488 | **1.70** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 35 | Lup-20(29)-en-3-ol, acetato, (3á) | 57.33 | 468 | 3.22 | - | 2.85 | - | **4.55** | **5.28** | - | **4.19** | - | - |
| 36 | Ácido-17-(2-yodo-1-metiletil)-4,4,10,13,14-pentametil-2,3,4,5,6,7,10,11,12,13,14,15 , 16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-acético | 65.33 | 526 | **6.69** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 37 | α-Amirina TMS éter | 69.09 | 498 | - | **4.93** | - | **4.11** | - | **4.28** | - | **8.17** | - | - |
| 38 | Germanicol | 69.16 | 426 | - | - | - | - | - | **5.95** | - | - | - | - |

[1]Negritas indican compuestos con mayor área (>4%).

**Anexo 5.** Composición química de extractos etanólicos de propóleos sin derivatizar del sur (EEP-S) de Sinaloa determinada por CG-EM[1].

| EEP | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Compuesto químico | | | | % relativa de área | | | | | | | | | |
| No. | Nombre | TR (min) | MM | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
| 1 | 1-Cloro-1-fenilpiridin-3-ol | 21.2 | 207 | **13.59** | - | - | - | - | **13.59** | - | - | - | - |
| 2 | 2-Hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenediona | 23.37 | 242 | **8.02** | **5.32** | - | 3.40 | 2.52 | **8.02** | **5.32** | - | 3.40 | 2.52 |
| 3 | Ácido-5,8,11,14-eicosatetrainóico | 23.58 | 296 | - | - | **7.15** | - | - | - | - | **7.15** | - | - |
| 4 | *N*-formil-2,4-diol-6-ona-morfina | 23.58 | 301 | - | **31.72** | - | - | - | - | **31.72** | - | - | - |
| 5 | 2,3,4,4a-tetrahidro-1à,4aá-dimetil-9(1*H*)-fenantreno | 23.6 | 226 | **52.22** | - | - | - | - | **52.22** | - | - | - | - |
| 6 | (4b*S*-trans)-4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahidro-4b,8,8-trimetil-3-fenantrenol | 23.6 | 244 | - | - | - | **15.70** | - | - | - | - | **15.70** | - |
| 7 | Fenil-1-mirtenona | 23.61 | 226 | - | - | - | - | **13.72** | - | - | - | - | **13.72** |
| 8 | 2-Cloro-3-[2-isopentenil]-1,4-2*H*-naftaleno-1,4-diona | 25.14 | 260 | **10.12** | - | - | - | - | **10.12** | - | - | - | - |
| 9 | 3-Pentadecilfenol | 44.85 | 304 | - | **4.51** | **4.56** | 3.31 | **5.61** | - | **4.51** | **4.56** | 3.31 | **5.61** |
| 10 | 5-Heptilresorcinol | 45.6 | 208 | **4.49** | - | - | 1.48 | - | **4.49** | - | - | 1.48 | - |
| 11 | 5-Pentadecil-1,3-bencenodiol | 46.05 | 320 | - | - | 3.60 | - | **4.32** | - | - | 3.60 | - | **4.32** |
| 12 | 4-[(4'-amino-2,2',3,3',5,5',6,6'-octametil[1,1'-bifenil]-4-il)imino]-2,3,5,6-tetrametil-2,5-ciclohexadien-1-ona | 48.66 | 442 | **5.10** | - | - | - | - | **5.10** | - | - | - | - |
| 13 | 4,4,6a,8a,11,11,14b-Octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahidro-2*H*-picen-3-ona | 53.6 | 424 | - | **8.35** | 2.39 | **4.71** | 2.18 | - | **8.35** | 2.39 | **4.71** | 2.18 |
| 14 | α-Amirina | 54.4 | 426 | - | **8.15** | **4.37** | **4.10** | **6.07** | - | **8.15** | **4.37** | **4.10** | **6.07** |

**Anexo 5.** Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 15 | Lup-20(29)-en-3-ona | 54.88 | 424 | - | **26.71** | **8.74** | **15.39** | **5.75** | - | **26.71** | **8.74** | **15.39** | **5.75** |
| 16 | 13,27-Cicloursano | 55.22 | 424 | - | **4.10** | - | 2.42 | - | - | **4.10** | - | 2.42 | - |
| 17 | Lupeol | 55.73 | 426 | - | - | **29.91** | - | - | - | - | **29.91** | - | - |
| 18 | α-Amirina | 58.17 | 426 | - | - | - | **4.90** | - | - | - | - | **4.90** | - |
| 19 | Lup-20(29)-en-3-ona | 63.86 | 424 | - | - | **8.62** | - | **4.50** | - | - | **8.62** | - | **4.50** |
| 20 | 13,27-Cicloursano | 63.89 | 424 | - | - | - | **19.62** | - | - | - | - | **19.62** | - |
| 21 | Lupeol | 65.19 | 426 | - | - | **15.46** | - | - | - | - | **15.46** | - | - |
| 22 | Taraxasterol | 65.21 | 426 | - | - | - | **18.75** | - | - | - | - | **18.85** | - |

[1]Negritas indican compuestos con mayor área (>4%).

**Anexo 6.** Composición química de extractos etanólicos de propóleos derivatizados del sur (EEP-SD) de Sinaloa determinada por CG-EM[1].

| EEP | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Compuesto químico | | | | % relativo de área | | | | | | | | | |
| **No.** | **Nombre** | **TR (min)** | **MM** | **SD 1** | **SD 2** | **SD 3** | **SD 4** | **SD 5** | **SD 6** | **SD 7** | **SD 8** | **SD 9** | **SD 10** |
| 1 | Éter de TMS glicerol | 10.82 | 308 | 1.01 | 1.05 | 1.56 | 1.62 | 3.01 | **4.13** | 1.27 | 3.78 | **10.28** | - |
| 2 | 1,2,3,4-tetrakis[(TMS)oxi]-butano | 15.33 | 410 | - | **4.16** | **4.39** | - | **5.69** | **9.38** | **5.23** | **12.98** | **19.46** | - |
| 3 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) glucosa | 20.48 | 540 | - | - | - | - | - | **5.47** | - | - | - | - |
| 4 | L-6-deoxi-2,3,4,5-tetrakis-*O*-(TMS) manosa | 20.49 | 452 | - | - | - | **7.24** | - | - | - | - | **5.74** | - |
| 5 | D-2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) glucosa | 20.49 | 540 | - | - | - | - | - | - | - | **5.14** | - | - |
| 6 | D-2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) manosa | 20.50 | 540 | - | - | **4.49** | - | - | - | 2.75 | - | - | - |
| 7 | D-1,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) fructosa | 20.62 | 540 | **6.31** | **5.69** | - | - | **4.29** | - | **6.60** | - | - | - |
| 8 | Yoduro de 2-metil-1-fenil-isoquinolinium | 20.63 | 347 | - | - | - | - | - | - | - | **10.76** | - | - |
| 9 | 5-(4-amiloxifenil)-2-(4-butoxi-2-hidroxifenil)pirimidina | 20.63 | 406 | - | - | **10.90** | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | D-1,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) fructosa | 20.85 | 540 | **9.33** | **11.10** | - | **11.35** | **6.55** | - | **10.38** | - | - | - |
| 11 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) gulose | 21.85 | 540 | - | - | - | - | - | - | - | - | **4.84** | - |
| 12 | á-d-1,2,3,4,6-pentakis-*O*-(TMS) galactopiranosa | 22.31 | 540 | **9.22** | **7.57** | **14.94** | **9.31** | **5.34** | **16.32** | **7.55** | **14.19** | - | - |
| 13 | Ácido á-d-metil-2,3,5-*tris*-*O*- | 23.09 | 438 | - | 0.86 | 2.40 | 2.14 | - | **5.66** | 3.36 | - | - | - |

**Anexo 6.** Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (TMS) galactofuranosidurónico, metil éster | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) gulosa | 23.35 | 540 | 2.01 | 1.65 | 3.38 | 3.77 | 3.13 | - | 2.42 | **4.51** | - | - |
| 15 | 2,3,4,4a-tetrahidro-1à,4aá-dimetil-9(1*H*)-fenantrona | 23.60 | 226 | | | | | | | | | | **12.12** |
| 16 | D-2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) glucosa | 25.04 | 540 | **12.75** | **9.11** | - | **12.84** | - | - | - | - | - | - |
| 17 | Acetato de *N*-acetil-quebracidina | 25.05 | 436 | - | - | - | - | - | **23.59** | - | - | - | - |
| 18 | 2,3,4,5,6-pentakis-*O*-(TMS) talosa | 25.07 | 540 | - | - | **20.91** | - | **6.61** | - | **10.86** | **19.32** | - | - |
| 19 | 1,2,3,4,5,6-hexakis-*O*-(TMS) Myo-inositol | 25.63 | 612 | - | - | - | - | - | **7.24** | - | - | 2.47 | - |
| 20 | Colesta-3,5-dien-7-ona | 46.84 | 382 | - | - | - | - | - | - | - | - | **5.01** | - |
| 21 | 2-[4-metil-6-(2,6,6-trimetilciclohex-1-enil)hexa-1,3,5-trienil]ciclohex-1-en-1-carboxaldehido | 46.85 | 324 | **5.97** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22 | Ácido-*bis*-(TMS)-ë-9-tetrahidrocannabinol | 47.33 | 502 | **4.48** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | 11,21-*bis*[(TMS)oxi]-, *bis*(O-metiloxima), (11á)- pregn-4-eno-3,20-diona | 47.33 | 548 | - | - | - | - | **4.04** | - | - | - | - | - |
| 24 | 5-(2,2-dimetiletil)-1,3-benzodioxol | 48.70 | 178 | **6.98** | 1.28 | 2.95 | - | 2.78 | - | **4.28** | - | - | - |
| 25 | 4-[(4'-amino-2,2',3,3',5,5',6,6'-octametil[1,1'-bifenil]-4-il)imino]-2,3,5,6-tetrametil-2,5-ciclohexadien-1-ona | 48.70 | 442 | - | **4.48** | - | **4.05** | - | - | - | - | - | - |
| 26 | 3-Acetoxi-7,3-epoxilanostan-11-ol | 48.71 | 502 | - | - | - | - | - | - | - | - | **27.52** | - |
| 27 | Pentafenil piridina | 49.25 | 459 | **4.24** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

**Anexo 6.** Continuación…

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 28 | 2,3,4-*tris*[(TMS)oxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona | 49.37 | 518 | - | **4.68** | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 29 | 1,3,5-tri-tert-butil-3-(3,5-di-tert-butil-4-hidroxibenzil)-4-norcaren-2-ona | 49.41 | 494 | **7.05** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 | 17-(1,5-dimetilhexil)-10,13-dimetil-3-estirilhexadecahidrociclopenta[a]fenantren-2-ona | 51.61 | 488 | **10.53** | **7.05** | **4.49** | - | - | - | **5.37** | - | - | - |
| 31 | (5à)-Oxima-1'*H*-colest-2-eno[3,2-b]indol-6-ona | 51.65 | 488 | - | - | - | **6.56** | - | - | - | - | - | - |
| 32 | 2,4-fenil-4*H*-1,3-benzodioxina | 51.66 | 288 | - | - | - | - | **4.19** | - | - | - | - | - |
| 33 | Lup-20(29)-en-3-ona | 54.91 | 424 | | | | 1.08 | 1.20 | | | | | **14.12** |
| 34 | Lupeol | 55.75 | 426 | | | | | | | | | | **25.07** |
| 35 | Acetato de (3á)-lup-20(29)-en-3-ol | 57.31 | 468 | 3.44 | 2.85 | - | **4.55** | **5.26** | - | **4.19** | - | - | - |
| 36 | Lup-20(29)-en-3-ona | 63.93 | 424 | | | | | | | | | | **12.97** |
| 37 | Lupeol | 65.25 | 426 | | | | | | | | | | **17.13** |
| 38 | α-Amirina TMS éter | 67.60 | 498 | - | - | - | - | **4.26** | - | - | - | - | - |
| 39 | α-Amirina TMS éter | 69.09 | 498 | **4.93** | - | **4.11** | - | - | - | **8.17** | - | - | - |
| 40 | Germanicol | 69.16 | 426 | - | - | - | - | **5.92** | - | - | - | - | - |

[1]Negritas indican compuestos con mayor área (>4%).