



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**CARACTERIZACIÓN DE PROPÓLEO OBTENIDO DE LA  
REGIÓN DE CUAUHTÉMOC CHIHUAHUA.**

---

Por:

**Adrian Heiras Trevizo**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE FISIOLÓGÍA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA ZONA  
TEMPLADA

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Adrian Heiras Trevizo la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



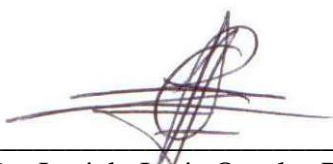
---

M.C. Alejandro Romo Chacón  
Director de Tesis



---

Dr. Carlos Horacio Acosta Muñiz  
Integrante del Comité de Tesis



---

Dr. José de Jesús Ornelas Paz  
Integrante del Comité de Tesis



---

M.C. F. Javier Molina Corral  
Integrante del Comité de Tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Caracterización de Propóleo Obtenido de la Región de Cuauhtémoc Chihuahua” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Adrian Heiras Trevizo, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**  
Coordinación de Programas Académicos



Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora General

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo económico durante los años de mi maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por darme las herramientas para la elaboración de este proyecto y la oportunidad de estudiar en esta institución.

A mi madre Olivia Trevizo Nevarez, a mi padre Alberto Heiras Torres y a mi hermano Alberto Heiras Trevizo por toda su ayuda y consejos para poder llegar a donde estoy hoy y concluir este posgrado con mucha satisfacción personal.

A toda mi familia y amigos por su apoyo incondicional, tanto fuera como dentro de la maestría, ayudándome a superar problemas y retos tanto profesionales como personales.

A todos los académicos y personal de CIAD unidad Cuauhtémoc por su calidez y enseñanzas al elaborar este proyecto, también por su sencillez y tener toda la actitud y disponibilidad de ayudarme con este proyecto, así también agradezco la paciencia y comprensión que tuvieron conmigo a la hora de enseñarme y realizar la etapa experimental.

A los apicultores Gerardo Pérez y Alejandro Romo así como a Apiessentials por proporcionar las colmenas para la recolección de propóleo en este estudio.

A Pedro González Pérez técnico del laboratorio de lácteos del CIAD unidad Cuauhtémoc por el apoyo brindado durante el proceso de experimentación.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi madre María Olivia Trevizo, padre Alberto Heiras Torres y mi hermano Alberto Heiras Trevizo, por su apoyo incondicional tanto dentro como fuera de este proyecto, ya que sin su ejemplo, enseñanzas, lecciones de vida y valiosos consejos yo no sería la persona que soy, y gracias a eso pude concluir este gran proyecto profesional y personal.

También quiero dedicar este proyecto a todos los profesionistas y amigos que estuvieron detrás de mi formación ya que sin sus enseñanzas y consejos este proyecto no hubiera sido posible, en especial a quien considero gran maestro y amigo al M.C. Alejandro Romo Chacón.

Dedico este proyecto a todos los apicultores especialmente a los de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, con la oportunidad que este estudio pueda de ser de provecho para mejorar la explotación apícola en la región y en el estado.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1. Propóleo.....	15
2.2. Historia del Propóleo.....	15
2.3. Uso de Propóleo en la Colonia de Abejas .....	16
2.4. Recolección de Propóleo.....	17
2.5. Tipos de Propóleos .....	17
2.6. Composición General del Propóleo.....	18
2.7. Compuestos Químicos del Propóleo.....	18
2.8. Color del Propóleo.....	19
2.9. Actividad Biológica de Propóleo.....	20
2.10. Estudios del Propóleo .....	23
2.11. Producción del Propóleo.....	25
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	27
4.1. Objetivo General.....	27
4.2. Objetivos Específicos.....	27
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	28
5.1. Recolección de Propóleo en Greña.....	28
5.2. Evaluación de Color .....	30
5.3. Análisis Proximal de Propóleo en Greña.....	31
5.3.1. Determinación de Porcentaje de Humedad.....	31
5.3.2. Determinación del Contenido de Lípidos.....	31
5.3.3. Determinación del Contenido de Proteínas.....	33
5.3.4. Determinación del Porcentaje de Ceniza.....	34
5.4. Preparación de Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP) .....	35
5.5. Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales en EEP .....	36

## CONTENIDO (continuación)

5.6. Cuantificación de Compuestos de Flavonoides Totales en EEP .....	37
5.7. Determinación de la Actividad Antioxidante <i>In vitro</i> (DPPH) en EEP .....	39
5.8. Determinación de la Actividad Antimicrobiana de EEP .....	40
<b>6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>42</b>
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>43</b>
7.1. Análisis de Colorimetría.....	44
7.2. Análisis Proximal de Propóleo en Greña.....	46
7.2.1. Contenido de Humedad Total.....	46
7.2.2. Contenido Total de Lípidos.....	47
7.3.3. Contenido Total de Proteína.....	48
7.3.4. Contenido Total de Ceniza.....	50
7.4. Compuestos Fenólicos Totales en los Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP).....	51
7.5. Compuestos Flavonoides Totales de los EEP.....	53
7.6. Determinación de la Capacidad Antioxidante <i>In vitro</i> (DPPH) de los EEP.....	55
7.8 Determinación de la Actividad Antimicrobiana de EEP.....	56
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>9. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Colmena de <i>Apis mellifera</i> , con la piquera propolisada para evitar corrientes de aire o entrada de roedores. Colmena ubicada en el campo 2B en Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua.....	17
2. <i>Apis Mellifera</i> sellando con propóleo orificios de la colmena.....	21
3. Colonia de abejas con trampa de propóleo tipo malla. Apiario EL Vergel, Cuauhtémoc, Chihuahua.....	30
4. Trampa de propóleo tipo malla, recolectada de los apiarios de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.....	31
5. Equipo de recolección de hexano y recuperador de lípidos.....	33
6. Unidad de digestión, aparato Kjeldahl utilizada para medir el contenido de proteínas presentes en los propóleos.....	35
7. Horno mufla (47900 Fumance) con la que se obtuvieron los valores de ceniza de los propóleos.....	36
8. Apiario EL Vergel, retiro de trampas de propóleo tipo malla.....	44
9. Muestras de Propóleos obtenidos de apiarios localizados en cuatro ubicaciones de la región de Cuauhtémoc. Chih., A= Cusihiuriachi; B= Campo 25; C= El Vergel; D= Campo 2B.....	46
10. Determinación del contenido total de humedad de propóleo recolectado en diferentes apiarios de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.....	48
11. Determinación del contenido total de lípidos en propóleo obtenido de las diferentes localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.....	49
12. Determinación del contenido total de proteína de los propóleos de las diferentes localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.....	50
13. Determinación del contenido total de ceniza de los propóleos de las diferentes localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.....	52
14. Determinación del contenido de compuestos fenólicos de los propóleos de las diferentes localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.....	53
15. Determinación del contenido de flavonoides de las diferentes localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua representado en estándar de Quercetina por gramo (mgEQ/g).....	55
16. Evaluación de la capacidad antioxidante de los diferentes propóleos de las localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, para una inhibición del 50% del DPPH (IC50).....	56



## LISTA DE FIGURAS (continuación)

17. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en agar soya tripticaseina, después de estar sometido 24h a diferentes concentraciones de EEP.....58
18. Determinación del halo de inhibición en *Staphylococcus aureus* con diferentes propóleos de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.....59
19. Determinación de la actividad antimicrobiana a *Staphylococcus aureus*, con diferentes concentraciones de propóleo de la localidad de Cuauhtémoc Chihuahua.....60
20. Determinación del halo de inhibición en *Melissococcus plutonius* con diferentes propóleos de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.....61
21. Determinación de la actividad antimicrobiana a *Melissococcus plutonius*, con diferentes concentraciones de propóleo de la localidad de Cuauhtémoc Chihuahua....61

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Comparación de Fenoles, Flavonoides y Actividad antioxidante <i>In vitro</i> por el método DPPH de extractos de propóleo en diferentes fuentes botánicas; A: Pópulos spp; B: <i>Quercus</i> spp; C: <i>Dalbergia ecastophyllum</i> ; D: <i>Baccharis dracunculifolia</i> ; G: <i>Eucalyptus globulus</i> L; H: <i>Ricinus communis</i> L.; I: <i>Callistemon citrinus</i> ; J: <i>Pinus teocote</i> Schltdl.....	25
2. Ubicación de apiarios y especies dominantes de flora presentes; A: <i>Pópulos</i> spp.; B: <i>Quercus</i> spp; C: <i>Bidens pilosa</i> ; D: <i>Bidens ferilifolia</i> ; E: <i>Verbascum thapsus</i> .....	29
3. Promedio de propóleo en greña obtenido de diferentes apiarios en Cuauhtémoc Chihuahua.....	45
4. Colorimetría de propóleos en greña obtenidos en apiarios de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.....	46
5. Determinación de la actividad antimicrobiana de EEP mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración mínima de Bactericida (CMB).....	58
6. Comparación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de propóleos de la región de Cuauhtémoc y otras regiones del mundo para el control de <i>Staphylococcus aureus</i> (Machado <i>et al.</i> , 2016; Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2020) .....	62

## RESUMEN

El propóleo está compuesto por una gran diversidad de sustancias químicas, las cuales, se caracterizan por tener interacción biológica con el humano al igual que tener actividades benéficas para su salud. Actualmente estudios en el propóleo se centran en la medición total de fenoles y flavonoides, así como su actividad antioxidante. La extracción de propóleo con solventes orgánicos es una herramienta usada para medir la cantidad y determinar las actividades que tienen los fenoles y flavonoides en el propóleo. En este estudio se caracterizaron extractos de propóleos provenientes de la región de Cuauhtémoc Chihuahua de acuerdo a su composición física y su composición de fenoles y flavonoides totales así como la determinación de su actividad antioxidante *In vitro* y su actividad antibacteriana. Se evaluaron los parámetros de color (Luminosidad, Rojo/Verde, Amarillo/Azul) en propóleos de los diferentes apiarios, registrando diferencias significativas entre ellos, presentando los propóleos de El Vergel un verde amarillo con valores de 54.85, 2.27. y 18.2 para L\*, a\* y b\* respectivamente. No encontrando diferencias significativas en la cantidad de fenoles entre los propóleos de los diferentes apiarios, con valores entre 193.12 y 214.13 mgEAG/g. De igual manera, no se encontraron diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) en los flavonoides, con valores entre 33.36 y 36.7 mgEQ/g. Los propóleos del Campo 2B mostraron la mayor actividad antioxidante con una concentración de 92.94  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para lograr la IC50. Ningún propóleo mostró actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, pero sí sobre *Staphylococcus aureus*, registrándose el menor crecimiento bacteriano en los propóleos del Campo 25 con 2.2 Log (UFC/mL), contra *Melissococcus plutonius*, todos los propóleos mostraron efecto bactericida con halos de inhibición por arriba de 16 mm a una concentración de 20 mg/mL. Este es el primer estudio de la calidad y caracterización de propóleos recolectados en diferentes apiarios de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, incluyendo su composición química, capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, Propóleo, Flavonoides, Capacidad antioxidante actividad antimicrobiana

## ABSTRACT

Propolis is composed of a great diversity of chemical substances, which are characterized by having biological interaction with humans and having beneficial activities for their health. Currently, propolis studies focus on measuring total phenols and flavonoids and their antioxidant activity. The extraction of propolis with organic solvents is a tool used to measure the quantity and determine the activities of phenols and flavonoids in propolis. In this study, propolis extracts from the Cuauhtémoc Chihuahua region were characterized according to their physical composition and composition of total phenols and flavonoids, as well as the determination of their *In vitro* antioxidant activity and antibacterial activity. The color parameters (Lightness, Red/Green, Yellow/Blue) were evaluated in propolis from the different apiaries, recording significant differences between them, with the propolis from El Vergel presenting a yellow-green with values of 54.85, 2.27, and 18.2 for L\*, a\*, and b\*, respectively. No significant differences were found in the number of phenols between propolis from different apiaries, with values between 193.12 and 214.13mgGAE/g. Similarly, no statistical differences were found ( $p=0.05$ ) in flavonoids, with values between 33.36 and 36.7 mgQE/g. The propolis from Field 2B showed the highest antioxidant activity with a 92.94 $\mu$ g/mL concentration to achieve the IC<sub>50</sub>. No propolis showed antimicrobial activity against *Escherichia coli*. However, against *Staphylococcus aureus*, with the lowest bacterial growth being recorded in the propolis of Field 25 with 2.2 Log (CFU/mL), against *Melissococcus plutonius*, all propolis showed bactericidal effect with inhibition halos by above 16 mm at a concentration of 20mg/mL. This is the first study of the quality and characterization of propolis collected in different apiaries in the Cuauhtémoc region, Chihuahua, including its chemical composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity.

**Keywords:** *Apis mellifera*, Propolis, Flavonoids, Antioxidant capacity, antimicrobial activity

## 1. INTRODUCCIÓN.

El propóleo es un material que elaboran las abejas a partir de la recoleta de resinas de plantas, junto con una adición de enzimas y glúcidos por parte del aparato bucal. Una vez dentro de la colonia es combinado con cera y polen, dando como producto final el propóleo. El propóleo es colocado en la mayoría de las estructuras de la colonia. Tiene como función la protección de la colonia de abejas contra microorganismos y contribuir como material de construcción como aislante térmico (Devequi-Nunes *et al.*, 2018).

El propóleo tiene varias funciones en la salud humana como actividad antibacteriana, actividad antiviral, actividad antioxidante, capacidad de inhibir la inflamación y provocar analgesia. El propóleo interviene directamente con procesos en el organismo estrechamente relacionado con enfermedades autoinmunes y enfermedades que provocan una mala señalización y proliferación celular (Pahlavani *et. al.*, 2019; Vargas-Sánchez *et al.*, 2014).

Dichas actividades biológicas del propóleo, están relacionadas principalmente por la presencia de fenoles y flavonoides, estos son compuestos químicos que por su estructura química tienen interacción biológica en humanos. La cantidad de fenoles y flavonoides presentes en el propóleo depende del tipo de flora de donde provenga, la resina recolectada por las abejas y su ubicación geográfica, es decir que el contenido de fenoles y flavonoides dependerán de las resinas que se recolectaron de las plantas para la elaboración de este propóleo (Toreti *et al.*, 2013).

Actualmente no existe una clasificación general de propóleos, algunos autores los llaman por el color que estos llegan a tener o por su origen botánico, pero el factor que llega a determinar el tipo de propóleo es la cantidad y el tipo de fenoles y flavonoides presentes, así como su fuente botánica. Existen propóleos llamados propóleos verdes que son característicos por provenir de las resinas de la planta *Baccharis dracunculifolia*, nativa de Brasil teniendo una apariencia de color verde, otros son los propóleos llamados rojos que provienen de las resinas de la planta *Dalbergia ecastophyllum*, originario también de Brasil presentado un color rojizo, también existe un propóleo llamado chopo o álamo proveniente de resinas de árboles del género *Populus*, originario de climas templados principalmente en el hemisferio norte estos se caracterizan por un color entre café y verdoso (Bankova *et al.*, 2016)

Los fenoles y flavonoides se caracterizan por tener interacciones biológicas con moléculas de

organismos vivos. Así mismo los extractos etanólicos de propóleo han sido objeto de estudio, debido a que la concentración de fenoles y flavonoides que presentan es mayor a comparación de muestras de propóleo en greña, además de ser el etanol un excelente solvente para extraer los compuestos químicos de interés del propóleo (Šuran *et al.*, 2021).

En el estado de Chihuahua existen alrededor de 600 apicultores, los cuales cuentan con aproximadamente 47,904 colonias de abejas (INEGI 2022), de las cuales en la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, hay alrededor de 14,000 colmenas, las cuales se destinan principalmente a la producción de miel, núcleos de abejas y polinización del manzano, sin embargo, otro de los subproductos de las abejas que se pueden comercializar es el propóleo, el cual puede ejercer diversas actividades en el humano, incluyendo como sus actividades antibacterianas, antivirales y antioxidantes, además de que ayuda en el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes y enfermedades que provocan una mala señalización y proliferación celular. Algunas de estas actividades no han sido evaluadas en los propóleos de la región, por lo que este estudio tiene como objetivo caracterizar las propiedades físicas, químicas y antimicrobianas del propóleo de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, con la finalidad de darle un valor agregado.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 Propóleo.

El propóleo es una mezcla compleja resinosa natural producida por las abejas, que se obtiene por la recolección de resinas de plantas junto con una mezcla de cera, polen, aceites esenciales y glúcidos secretadas por las abejas. Esta sustancia es utilizada en la mayoría de las estructuras de la colonia, tiene como función defender de factores ambientales, además de higienizar y ser la principal protección contra microorganismos, también contribuye como material de construcción para sellar grietas y como aislante térmico (Devequi-Nunes *et al.*, 2018).

### 2.2. Historia del Propóleo.

El propóleo ha sido utilizado por el hombre para diversos fines. Se tiene registro de su uso desde 1700 a.C., siendo descrito como un bálsamo curativo nombrado “tzori”. De igual manera un papiro egipcio de 1550 a.C., se menciona esta palabra y se refiere a una “cera negra”, que los egipcios lo utilizaban para embalsamar cuerpos. En otras partes del mundo como en Roma o Grecia, se empleó para la preparación de ungüentos medicinales que se utilizaban para curar heridas en animales y humanos. En América, los Incas lo utilizaron para combatir los cuadros febriles producidos por infecciones, mientras que, en Europa, los franceses en los siglos XVIII y XIX lo usaron para el tratamiento de llagas, heridas infectadas y como sustancia cicatrizante. En la actualidad el propóleo se sigue utilizando en todo el mundo con el mismo propósito, principalmente en países asiáticos y es motivo de numerosos estudios debido a la actividad y los efectos benéficos que los propóleos tienen en los humanos. El propóleo también ha sido objeto de comercialización como ingrediente para la elaboración de productos que se utilizan principalmente en la medicina humana, medicina veterinaria y cosmetología (Kuropanticki *et al.*, 2013).

### 2.3. Uso de Propóleo en la Colonia de Abejas

El propóleo suele usarlo la abeja específicamente en la elaboración de alimento junto con una combinación de diferentes ingredientes de la colmena como polen, agua y miel. Este alimento se da como aporte proteico a los individuos adultos, ya que debido a su elaboración proporciona una adecuada defensa contra los microorganismos. Otra función del propóleo es para cubrir diferentes estructuras de la colmena, como celdas donde almacenan alimento o celdas donde se introduce y crece la cría, al igual que se cubre la entrada de la colonia, debido a las propiedades que el propóleo tiene, colocarlo de esta manera crea un ambiente séptico en la colonia de abejas, esto es esencial para el buen desarrollo de la cría y alimento (Bankova *et al.*, 2016). El propóleo es colocado en grietas o entradas a modo de no solo ofrecer protección contra microorganismos si no también ofrecer una barrera mecánica contra predadores o invasores a la colonia, así como también con el propósito de mantener la temperatura y humedad evitando corrientes de aire hacia dentro de la colmena, ya que mantener un nivel óptimo de humedad relativa (70 – 80 %) y una óptima temperatura (27-34°C), esencial para el desarrollo de la colonia (Popova *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Colmena de *Apis mellifera*, con la piquera propolisada para evitar corrientes de aire o entrada de roedores. Colmena ubicada en el campo 2B en Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua.



## 2.4. Recolección de Propóleo.

La recolección del propóleo está relacionada con las condiciones de la colonia, como son: condiciones internas de la población, estado de salud, cantidad de alimento recolectado, entradas de aire, pérdida de temperatura, condiciones externas como clima, cantidad y tipo de vegetación presente. Diversos estudios demostraron que las épocas de recolección de propóleo en el hemisferio norte se incrementan después de la entrada de grandes cantidades de néctar y polen, siendo estas por lo general entre los meses de abril-junio, después de la floración de primavera y a finales de verano o mediados de otoño cuando está a término o ya finalizó la floración (Pavlovic *et al.*, 2020). Otra condición que también influye en la recolección de propóleo son las bajas temperaturas, ya que se observó un incremento en la recolección de propóleo a inicios de diciembre justo antes de la entrada del invierno (Pavlovic *et al.*, 2020).

## 2.5. Tipos de Propóleos

Hay varios tipos de propóleo descritos en diferentes partes del mundo y sus características están determinadas por su ubicación geográfica, origen vegetal y especies de abejas (Popova *et al.*, 2017). Actualmente no existe una clasificación general de propóleos, algunos autores los llaman por el color que estos llegan a tener o por la planta de su mayor origen, pero el factor que llega a determinar el tipo y calidad de propóleo es la cantidad de fenoles y flavonoides presentes junto con su actividad antioxidante *In vitro* y su capacidad bactericida, así también como por la fuente botánica y origen geográfico, es importante aclarar que estos factores relacionados con la calidad del propóleo, no siempre están relacionados uno con el otro y es por eso que cada factor se debe de considerar como criterio independiente.

Diversos autores coinciden en que los propóleos llamados verdes son característicos por provenir en su mayoría de las resinas de la planta *Baccharis dracunculifolia*, nativa de Brasil, así como los propóleos llamados rojos de las resinas de la planta *Dalbergia ecastophyllum* originaria de Brasil, otro es el propóleo llamado chopo o álamo proveniente en su mayoría de resinas de árboles del

género *Populus* spp., originario de climas templados principalmente en el hemisferio norte (Bankova *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2016).

## 2.6. Composición General del Propóleo.

El propóleo de *Apis mellifera* recolectado en condiciones óptimas, contiene aproximadamente un 45 a 55 % de resinas y bálsamos, 8 a 55 % de ceras, 2 a 5 % de polen y de 2 a 5 % de compuestos orgánicos como ácidos grasos y minerales, siendo las resinas y bálsamos la parte más importante debido a la alta presencia de fenoles y flavonoides. Distintos estudios relacionan la presencia de estos compuestos (fenoles y flavonoides) también conocidos como polifenoles con las actividades biológicas del propóleo, las cuales son benéficas para la salud (Santos *et al.*, 2020).

## 2.7. Compuestos Químicos del Propóleo.

En la actualidad se han descrito más de 420 compuestos químicos de propóleo, siendo los de mayor importancia los fenoles y flavonoides, debido a sus diferentes actividades biológicas, como: capacidad antioxidante, capacidad bactericida, inmunomodulador, antiinflamatorio y por su capacidad regenerativa (Nader *et al.*, 2021).

Los fenoles y flavonoides son los responsables de la mayoría de las actividades biológicas que presenta el propóleo, esta fracción poli fenólica está presente en todos los alimentos y productos de origen vegetal, pero estos varían tanto cualitativamente como cuantitativamente, según el alimento o producto. Debido a que el propóleo es un producto que recolecta la abeja, este suele ser de varias fuentes botánicas, lo que hace que la variedad de fenoles y flavonoides sea mayor, así como también su cantidad, viéndose reflejado en sus actividades biológicas y el potencial de estas (Park *et al.*, 2002).

Los fenoles son una subclase de los alcoholes, y su estructura química básica consiste en un anillo aromático, como el benceno, con uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a él. La presencia del

grupo hidroxilo le confiere a los fenoles propiedades químicas y físicas únicas.

Los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varían considerablemente de acuerdo al compuesto químico que se trate, es por eso que la principal fuente de fenoles para el propóleo son las resinas secretadas por los diferentes árboles y plantas (Popova et al 2017).

Los fenoles más abundantes en el propóleo son: el ácido cafeico, ác. benzoico, ác. ferúlico, ác. cinámico, ác. p-cumárico, ác. gálico, éster fenetílico de ácido cafeico (CAPE) y artepillin C (Šuran et al., 2021).

Los flavonoides son otra clase de compuestos químicos presentes en el propóleo y pertenecen al grupo de los polifenoles, estos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Son conocidos por sus numerosas actividades biológicas y benéficas para la salud y su contribución a los colores y sabores de muchas frutas, verduras y plantas. Los flavonoides son responsables de los colores brillantes y variados de las flores, frutas y hojas, y tienen una amplia gama de funciones biológicas en las plantas, como capacidad antioxidante, mejora del sistema inmune, antiinflamatorio entre muchas otras propiedades terapéuticas (Huang *et al* 2014).

Mientras que los flavonoides más abundantes son: acacetina, apigenina, crisina, galafnina, kaempferol, naringenina, pinobanksina, pinocembrina y quercetina (Šuran *et al.*, 2021).

## 2.8. Color del Propóleo

Las antocianinas son responsables de una amplia gama de colores en varios alimentos vegetales, al igual que los flavonoides también se relacionan con la coloración, un ejemplo es como los colores amarillos o marfiles se relacionan con flavonoles, flavonas, chalconas, flavononas e isoflavononas. Algunos de estos compuestos carecen de color en su estado natural, pero pueden adquirir color bajo condiciones específicas durante la manipulación y el procesamiento de estos. Los flavonoles, como el kaempferol, la quercitina y la mirecitina, contribuyen al color del té verde, y la concentración de estos compuestos puede variar según la variedad del té y su procesamiento. Los polifenoles pueden formar quelatos con metales, lo que puede modificar la coloración natural de los alimentos. Por ejemplo, los quelatos de hierro pueden dar lugar a coloraciones azules a negras, mientras que los quelatos de aluminio pueden proporcionar coloraciones amarillas brillantes o

marrones (Bankova *et al.*, 2019).

Los flavonoides y otros polifenoles están relacionados con la determinación de los colores naturales de los alimentos, y su interacción con metales y otros factores puede influir en la apariencia visual de los alimentos procesados y preparados (Hernández Zarate *et al.*, 2018).



**Figura 2.** *Apis Mellifera* sellando con propóleo orificios de la colmena.

### 2.9. Actividad Biológica de Propóleo.

Las actividades biológicas del propóleo están relacionadas principalmente por la presencia de fenoles y flavonoides. La cantidad de fenoles y flavonoides presentes en el propóleo depende del tipo de resina recolectada por las abejas y su ubicación geográfica, es decir que el contenido de fenoles y flavonoides presentes dependerá de las plantas que se utilizaron para la elaboración de este propóleo (Popova *et al.*, 2007).

Los fenoles son esenciales para el desarrollo y reproducción de las plantas, así como también actúan como agentes protectores frente a la acción de patógenos, es por eso que lo observamos en secreciones como mecanismo de defensa (Hernandez Zarate *et al.*, 2018).

Los fenoles y flavonoides son conocidos por sus actividades antioxidantes, actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral, ya que tiene acción directa contra virus, bacterias y hongos, al igual que la inhibición de factores de virulencia, resistencia y multiplicación. También tienen efecto antiinflamatorio, regenerativo, inmunomodulador (Sulaeman *et al.*, 2019).

La actividad antioxidante y antimicrobiana del propóleo se atribuye principalmente a fenoles como: ácido benzoico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido p-cumarico, éster fenetílico de ácido cafeico y artepillin C y flavonoides como: acacetina, apigenina, arisina, galangina, kaempferol, naringenina, pinobanksina, pinocembrina y quercetina (Pobiega *et al.*, 2019).

Los diferentes compuestos encontrados en propóleos difieren en tipo de fenoles y flavonoides presentes, así como en concentración y por consecuencia en su actividad biológica, estas diferencias están relacionadas con el origen botánico de los propóleos (Chen *et al.*, 2019).

La actividad antioxidante del propóleo ha motivado diversas investigaciones en los últimos años, ya que los propóleos han destacado como un antioxidante de origen natural, para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades de origen oxidativo (Bankova *et al.*, 2005).

Un estudio realizado en ratones cardiopatas por estrés oxidativo, en donde se comparó el efecto protector del propóleo evaluando la sinergia de los diferentes flavonoides presentes en el propóleo, contra el efecto individual de flavonoides obtenidos de mieles mono florales de girasol, se demostrando un mayor efecto en ratones tratados con los flavonoides extraídos del propóleo, demostrando no solo la cantidad de flavonoides presentes es importante para su funcionamiento biológico, sino también la diversidad de flavonoides, ya que al tener mayor diversidad de flavonoides mayor será la sinergia entre estos mismos consiguiendo así un mayor efecto biológico (Chopra *et al.*, 1995).

De igual manera se observó el efecto del CAPE y del  $\alpha$ -tocoferol, en ratas con lesiones cerebrales (isquemia cerebral), generadas por la liberación de radicales libres. Los resultados mostraron que la administración aguda de CAPE y  $\alpha$ -tocoferol suprimen la isquemia inducida por la peroxidación lipídica y el daño cerebral, encontrándose que el CAPE ofrece una mayor ventaja terapéutica que el  $\alpha$ -tocoferol (Irmak *et al.*, 2003).

Por otra parte, se evaluaron muestras de propóleos brasileños para conocer el efecto antiproliferativo de tumores malignos primarios (RC-58T/h/SA#4), derivados de células de cáncer prostático humano, los cuales mostraron capacidad anti proliferativa *In vitro* de estas células. (Machado *et al.*, 2016).

El método DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) es una técnica utilizada para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos químicos, extractos de plantas o alimentos. El DPPH, que es un radical libre orgánico con un color púrpura oscuro. Cuando un antioxidante reacciona con el radical DPPH, este último se reduce, cambiando su color de púrpura a amarillo pálido. La medida del cambio de color este refleja la capacidad antioxidante de una muestra.

Un estudio con extractos etanólicos de propóleos (EEP) recolectados en las regiones de Mingchian, Fangliao y Taipie (Taiwán). (100µg/mL) mostró valores superiores a 80% de actividad antiradical, demostrando que los extractos de propóleo evaluados presentan fuerte inhibición alta actividad antioxidante (Li-Chang *et al.*,2003).

También, un estudio demostró la actividad antimicrobiana de muestras de propóleos recolectadas en diferentes áreas del desierto de Sonora (Noroeste de México). Los microorganismos utilizados para este estudio fueron bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* y *L. monocytogenes*) y Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*), utilizando extractos etanólicos de propóleo (400, 200, 100 y 50 µg mL<sup>-1</sup>). En todas las concentraciones de propóleos evaluadas, no se presentó efecto alguno sobre bacterias Gram negativas. Mientras que en las bacterias Gram positivas, *S. aureus*, fue el microorganismo sobre el que se encontró la más alta efectividad. La actividad antimicrobiana de los propóleos está relacionada con la presencia de algunos compuestos fenólicos como la acetina, CAPE, crisina, galangina, pinocembrina, pinobanksina y naringenina (Velázquez *et al.*, 2007).

Una práctica importante en la actualidad es el uso como coadyuvante en el tratamiento de infecciones de origen bacteriano ya que el propóleo tiene sinergia con antibióticos. Propóleos evaluados mostraron un mayor efecto bactericida utilizándolos en conjuntos con antibióticos que de forma individual. Se mostró la capacidad de inhibir *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, además de que mostró una gran sinergia con antibióticos β-lactámicos como ampicilina y oxacilina. (Wang *et al.*, 2022)

Se ha observado en diferentes estudios la actividad *In vitro* anti proliferativa contra línea de células de cáncer humano como en cepas B16F10 (Melanoma) y contra líneas de células de cáncer canino OSCA-8 (Osteosarcoma) (Machado *et al.*,. 2016; Mora *et al.*, 2019).

Estudios señalan que el éster fenético del ácido cafeico, interviene en la proteína quinasa a través de la modificación del pak1 involucrada en vías de señalización intracelular, adhesión celular, migración, proliferación, apoptosis, mitosis, también describe que el ácido cafeico inhibe factores pro inflamatorios como el factor de transcripción nuclear kappa (NF-κB), y la ciclooxigenasa-2

(COX-2), otros estudios describen que la quercetina tiene las capacidades de modificar la membrana bacteriana y disminuir la motilidad (menor virulencia), también se describe que diferentes flavonoides tanto individualmente como en conjunto actúan en la inhibición de la síntesis de ADN y ARN, tener la capacidad de afectar, pero en menor grado a la síntesis de proteínas y lípidos (Maruta *et al.*, 2020).

## 2.10. Estudios del Propóleo

Con el desarrollo de técnicas de separación y purificación se han identificado compuestos en el propóleo incluyendo flavonoides, terpenos, fenoles y sus ésteres, azúcares, hidrocarburos y elementos minerales. El propóleo natural no puede utilizarse como materia prima y debe ser purificado por extracción para eliminar el material inerte al igual que concentrar y conservar la fracción polifenólica, en la cual se encuentra los fenoles y flavonoides. A esta fracción se le atribuyen más efectos biológicos que a los demás componentes del propóleo. Es por eso que el análisis de estos compuestos ha recibido más atención (Bankova *et al.*, 2016).

Existen diferentes métodos de extracción de propóleo, el más utilizado y recomendado es el mencionado en la Norma oficial Mexicana Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento NOM-003-SAG/GAN-2017.

Estudios del propóleo realizan análisis intentado determinar principalmente los compuestos fenólicos y flavonoides totales, mediante la absorbancia por espectrofotometría, así como compuestos específicos por medio de técnicas cromatográficas como la líquida o de gases. Otros estudios del propóleo se centran también en determinar su actividad antioxidante *In vitro* mediante los métodos DPPH y ABTS, así como su actividad bactericida mediante difusión de disco o difusión de agar contra *E. coli* y *S. aureus*, ya que estos microorganismos son los principales causantes de malestares en la salud pública (Manchado *et al.*, 2016).

Cuantificar compuestos como fenoles y flavonoides totales, así como específicos, al igual que ciertas actividades biológicas como actividad antioxidante *In vitro* (Cuadro 1) y actividad bactericida, ayuda a caracterizar de forma general el propóleo estudiado.

**Cuadro 1.** Comparación de Fenoles, Flavonoides y Actividad antioxidante *In vitro* por el método DPPH de extractos de propóleo en diferentes fuentes botánicas; A: Pópulos spp; B: Quercus spp; C: Dalbergia ecastophyllum; D: *Baccharis dracunculifolia*; G: *Eucalyptus globulus* L; H: *Ricinus communis* L.; I: *Callistemon citrinus*; J: *Pinus teocote* Schltdl.

Región/Autor	Características de extracto	Fenoles mgEAG/g	Flavonoides mgEQ/g	DPPH Mg/mL	Fuente botánica
Cuautitlán Izcalli, Estado de México Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2020	Tiempo-7 d EtOH-80% Propóleo-30%	290	40	86.6	G, H, I
El oro y villa del carbón, Estado de México Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2020	Tiempo-7 d EtOH-80% Propóleo-20%	69	7	53	B, J
Mesa san Agustín, Guanajuato, México Hernández <i>et al.</i> , 2016	Tiempo-10 d EtOH-80% Propóleo-20%	31	49	--	--
El terrero, Guanajuato, México Hernández <i>et al.</i> , 2016	Tiempo-10 d EtOH-70% Propóleo-30%	131	152	--	--
Sergipe, Brasil, Machado <i>et al.</i> , 2016	Tiempo 48 h EtOH-70% Propóleo-30%	300	58	89	C
Minas Gerais, Brasil Machado <i>et al.</i> , 2016	Tiempo 48 h EtOH-70% Propóleo-30%	181.71	46	95	D
Rio Grande do Soul, Brasil Machado <i>et al.</i> , 2016	Tiempo-48 h EtOH-70% Propóleo-30%	111	27.72	163	--
Francia. Gardana <i>et al.</i> , 2007	Tiempo-7 d EtOH-80% Propóleo-30%	270	106	--	--
Francia. Gardana <i>et al.</i> , 2007	Tiempo-7 d EtOH-80% Propóleo-30%	250	124	--	--
Polonia. Socha <i>et al.</i> , 2014	Tiempo-7 d EtOH-70% Propóleo-30%	197.14	62.04	--	A
Polonia. Socha <i>et al.</i> , 2014	Tiempo-7 d EtOH-70% Propóleo-30%	153.04	35.64	--	A
Taiwán. Chen <i>et al.</i> ,	Tiempo-7 d	220	15	90	D



2018	EtOH-96% Propóleo-10%				
Taiwán. Chen <i>et al.</i> , 2018	Tiempo-2 d EtOH-70% Propóleo-10%	190	14	92	D

### 2.11. Producción del Propóleo

En la industria alimentaria y farmacéutica los productos de abejas más utilizados incluyen miel, propóleo, jalea real, polen de abeja, cera de abeja y veneno de abeja. Sin embargo, el propóleo, aún cuando se ha utilizado por mucho tiempo es en el año 2010, cuando se incrementó su uso, principalmente en países como China, Japón, Rusia Dinamarca, Francia, Alemania, y Estados Unidos de América. Actualmente los países más productores son China, Japón, Rusia, Brasil, Argentina, Cuba, Chile, Uruguay y Canadá. Siendo los países con más patentes sobre el propóleo: China, Japón y en tercer lugar Rusia, la mayoría de estas para el uso de la higiene y salud bucal. La limitada producción de propóleo en México se debe al tipo de apicultura practicada en nuestro país, la cual se enfoca principalmente a la extracción de miel; paralelamente, Ignorancia sobre el valor farmacéutico, las técnicas para su obtención y la falta de empresas que demanden su compra, contribuyen al lento desarrollo de su producción y uso.

En México el dato más actual que tiene es en el 2017 en donde se registró una producción de 8,156kg de propóleo en todo el país, siendo los principales productores el estado de Michoacán con 2000 kg, seguido de Oaxaca y Morelos con 900 kg de ambas entidades federativas y en tercer lugar quedo Guerrero con una producción de 820 kg, datos del Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON, 2017).

### **3. HIPÓTESIS.**

El propóleo de la región de Cuauhtémoc, contienen fenoles, flavonoides, y una actividad antioxidante y antimicrobiana similar a los propóleos verde y rojo de Brasil, así como a los propóleos de álamo de zonas templadas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General.

Determinar cuantitativa y cualitativamente los compuestos químicos del propóleo obtenido de *Apis mellifera* en la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, evaluar su actividad antimicrobiana en bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como determinar su actividad antioxidante *In vitro*.

### 4.2. Objetivos Específicos.

Determinar la concentración de fenoles y flavonoides totales de propóleos cosechados en la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.

Evaluar la capacidad antioxidante de propóleos obtenidos en la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.

Evaluar la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de propóleos cosechados en la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, en cultivos de *Melissococcus plutonius*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en cuatro apiarios, localizados en la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, (Cuadro 2). De cada apiario se seleccionaron tres colonias de abejas (unidad experimental), con la finalidad de colocar trampas de propóleo tipo malla (Figura 3).

**Cuadro 2.** Ubicación de apiarios y especies dominantes de flora presentes; A: *Pópulos* spp.; B: *Quercus* spp; C: *Bidens pilosa*; D: *Bidens ferilifolia*; E: *Verbascum thapsus*

Ubicación	Vegetación presente
Apiario 1 (Cusihuiachi.Chi.,28.450159, -106.840560)	B,D
Apiario 2 (Campo 25, Cuauhtémoc, Chi.,28.451017, -106.845562)	A,C,D
Apiario 3 (EL Vergel, Cuauhtémoc, Chi.,28.433323, -106.857596)	A,C,D
Apiario 4 (Campo 2B, Cuauhtémoc, Chi.,28.255099, -106.857211)	C,D,E

### 5.1. Recolección de Propóleo en Greña

Los apiarios evaluados fueron facilitados por apicultores de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, se verificó que las colonias de abejas seleccionadas (tres) contaran con 10 bastidores, con buenas reservas de miel, polen y una población de condiciones óptimas para la producción.

En cada una de ellas se colocaron trampas de propóleo tipo malla por un período de 3 meses, (Agosto-Noviembre del 2022).



**Figura 3.** Colonia de abejas con trampa de propóleo tipo malla. Apiario EL Vergel, Cuauhtémoc, Chihuahua.

Una vez transcurrido ese tiempo, se retiraron las trampas de las colonias y se almacenaron en refrigeradores a 0°C, hasta su procesamiento (Figura 4), esto con la finalidad de facilitar el retiro del propóleo de las trampas, ya que al ser una sustancia resinosa a temperatura ambiente suelen ser difíciles de manejar y a temperaturas bajas es quebradizo. Una vez cosechado el propóleo de la trampa (Propóleo en greña) se retiraron impurezas visibles. Posteriormente se molió con un Nutribullet para finalmente pasarlo por un tamiz analítico con un equivalente métrico de 250 mm.



**Figura 4.** Trampa de propóleo tipo malla, recolectada de los apiarios de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.

## 5.2. Evaluación de Color

Para evaluar el color del propóleo se utilizó un colorímetro Minolta CR-300 (Minolta, Osaka, Japón), calibrado con un mosaico de calibración de transmitancia cero CM-A100. Para lo cual las lecturas se realizaron por triplicado en recipientes redondos con un diámetro de 2.8 cm por 1.2 cm., de alto. Se utilizó la escala CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) de acuerdo con la metodología reportada por Abedinia y colaboradores (2018).

La escala CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) es un modelo de color tridimensional utilizado para describir de manera perceptual los colores. En este modelo:  $L^*$  Representa la luminosidad o valor de luminosidad, donde  $L^* = 0$  es negro y  $L^* = 100$  es blanco,  $a^*$  Representa la posición del color en el eje rojo-verde. Valores positivos de  $a^*$  indican tonalidades de rojo, mientras que valores negativos indican tonalidades de verde,  $b^*$  Representa la posición del color en el eje amarillo-azul. Valores positivos de  $b^*$  indican tonalidades de amarillo, mientras que valores negativos indican tonalidades de azul.

### 5.3. Análisis Proximal de Propóleo en Greña

Se realizó un análisis proximal al propóleo en greña para determinar el porcentaje de humedad, lípidos, proteínas y cenizas como se describe a continuación.

#### 5.3.1. Determinación de Porcentaje de Humedad.

La técnica utilizada para medir porcentaje de humedad fue el de la norma oficial mexicana NOM-116-SSA1-1994. Se pesó 1g de propóleo de cada muestra en charolas secas a peso constante. Posteriormente, la charola con la muestra se calentó en una estufa Shel Lab modelo 1370GM-2 (Sheblon Manufacturing, Inc., Oregón, EE. UU.) a una temperatura de 105°C por un lapso de 24 h. Posteriormente esta se dejó enfriar en un desecador y se pesó. El contenido de humedad en la muestra se calculó con la ecuación:

$$\% = \frac{(P - P1)}{P2} \times 100 \quad (1)$$

P = Peso del recipiente con la muestra húmeda (g).

P1 = Peso del recipiente con la muestra seca (g).

P2 = Peso de la muestra (g)

#### 5.3.2. Determinación del Contenido de Lípidos.

Se utilizó el método para determinar la grasa cruda de AOAC (Official Method 954.18).

Se colocó 1 g de propóleo en vasos papel filtro, se envolvió con cuidado para que no perdiera

muestra, posteriormente se colocó dentro de un cartucho de extracción con aro y se colocó en un vaso para determinación de grasa a un peso contante previamente pesado sin nada de muestra. A este vaso se le coloco 60 mL de hexano y se colocó al equipo extractor (Figura 5), para iniciar con el calentamiento del hexano y así poder recupera los lípidos de los propóleos en los vasos de inmersión, se esperó aproximadamente 40 min hasta que ya no se observó nada de hexano en los vasos, se tomaron de la extracción y se pasaron a la estufa a 105°C por 2 h para posteriormente pesarlos y calcular su porcentaje de lípidos.

$$\% = \frac{(P1-P)}{P2} \times 100 \quad (2)$$

P = Peso del recipiente (g).

P1 = Peso del recipiente con grasa recuperada (g).

P2 = Peso de la muestra (g)



**Figura 5.** Equipo de recolección de hexano y recuperador de lípidos.



### 5.3.3. Determinación del Contenido de Proteínas.

Se utilizó el método Kjeldahl para la determinación del contenido de proteína de los propóleos (Figura 6), descrito por la AOAC (Official Method 991.22). A un tubo Kjeldahl con la muestra (0.2g de propóleo), se añadieron 0.6 g de selenio (catalizador). Se introdujo la muestra en tubos de digestión y se le agregaron 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. El tubo se fijó en la unidad de digestión, aparato Kjeldahl a 450°C durante 1 h. Luego de dejarse enfriar, se adicionaron 15 mL de agua destilada y se pasó al destilador. Se destiló por 5 min donde se adicionó NaOH (50%) hasta que dejó de reaccionar. Un tubo Falcón con 10 mL de ácido bórico (4%) y una gota de rojo de metilo se situó en la salida de vapores del destilador. Se pasó la solución a un matraz Erlenmeyer y se tituló con HCl (0.1 N). El contenido de proteína se calculó a partir de la siguiente relación:

$$\% = \frac{(\text{Titulado} \times \text{Normalidad de ácido} \times 1.4007)}{\text{Peso de la muestra}} \times 6.25 \quad (3)$$

Normalidad del ácido (HCl) = 0.1N

Peso de la muestra = 1mL

Factor de conversión de proteína general = 6.25



**Figura 6.** Unidad de digestión, aparato Kjeldahl utilizada para medir el contenido de proteínas presentes en los propóleos.

#### **5.3.4. Determinación del Porcentaje de Ceniza.**

Se determinó el contenido de ceniza por la metodología descrita por AOAC (Official Method 945.46). Se pesó 1 g de propóleo de cada muestra en crisoles de porcelana secos a peso constante. El material fue calentado en la vitrina de gases para carbonizar la materia orgánica. Posteriormente se colocó el crisol con la muestra a un horno a 550°C durante 3 h (Figura 7). Se enfrió en un desecador y se pesó inmediatamente. El contenido de cenizas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% = \frac{(P-P1)}{(P2-P3)} \times 100 \quad (4)$$

P = Peso del crisol con la muestra calcinada (g).

P1 = Peso del crisol (g).

P2 = Peso del crisol con la muestra (g).

P3 = Peso del crisol con muestra final (g)



**Figura 7.** Horno mufla (47900 Fumance) utilizado para obtención de los valores de ceniza de los propóleos.

#### 5.4. Preparación de Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP)

Se procedió a elaborar los extractos etanólicos de propóleo, mediante el método descrito por Machado *et al.*, (2016), utilizando como solvente alcohol de caña al 70%, el cual se elaboró a partir de alcohol de caña al 96%. Se tomaron 2 g de propóleo en greña, previamente molido y tamizado (libre de materia extraña) y se colocó en un tubo de 50 mL para posteriormente aforarlo a 20 mL con alcohol de caña al 70%. La mezcla de propóleo y alcohol fue sometida a agitación constante durante 48 h a una temperatura de 25°C a 160 RPM (incubadora con agitación Thermo Scientific). Una vez transcurrido las 48 h, se filtró por gravedad 3 veces, utilizando papel Whatman No 4. Los extractos se obtuvieron con una concentración de 100 mg/mL y estos fueron conservados a una temperatura de 4°C para su posterior análisis.

## 5.5. Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales en EEP

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo mediante la metodología utilizado por Rodríguez-Pérez y colaboradores (2020), utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Esta es una técnica química que permite cuantificar la cantidad de compuestos fenólicos presentes en una muestra. Implica la preparación de la muestra, la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu, la medición de la absorbancia a una longitud de onda de  $x$  nm y el cálculo de la concentración utilizando una curva de calibración usando ácido gálico (AG) como estándar en el rango de concentración de 0.00125mg/mL hasta 0.08mg/mL. Estas soluciones se obtuvieron diluyendo una solución madre de EAG a 0.160mg/mL.

Las diferentes concentraciones de AG se obtuvieron de la siguiente manera; Se pesó 1.6 mg de ácido gálico que posteriormente se aforo a un volumen de 10mL con metanol, obteniendo una concentración de 0.160 mg/mL, partiendo de una concentración para realizar las siguientes diluciones:

Concentración 7 = 1 mL de AG (0.160mg/mL) + 1 mL de H<sub>2</sub>O = 0.08 mg/mL

Concentración 6 = 1 mL de “Concentración 7” + 1 mL de H<sub>2</sub>O = 0.04 mg/mL

Concentración 5 = 1 mL de “C6” + 1 mL de H<sub>2</sub>O = 0.02 mg/mL

Concentración 4 = 1 mL de “C5” + 1 mL de H<sub>2</sub>O = 0.01 mg/mL

Concentración 3 = 1 mL de “C4” + 1 mL de H<sub>2</sub>O = 0.005 mg/mL

Concentración 2 = 1 mL de “C3” + 1 mL de H<sub>2</sub>O = 0.0025 mg/mL

Concentración 1 = 1 mL de “C2” + 1 mL de H<sub>2</sub>O = 0.00125 mg/mL

Posteriormente se preparó carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 20%. Se pesaron 4 g de carbonato de sodio y disolvió en 20 mL de H<sub>2</sub>O a una temperatura de 50°C.

Una vez preparadas las diferentes soluciones. Las 7 concentraciones de EAG fueron procesadas determinado la absorbancia en un espectrofotómetro EVOLUTION 201 UV-Visible de la marca Thermo SCIENTIFIC a una longitud de onda de 750 nm.

El proceso de las 7 concentraciones fue de la siguiente manera:

Se colocaron 500  $\mu$ L de cada una de las diferentes concentraciones en un tubo de 5 mL, luego se les añadió 3 mL de H<sub>2</sub>O y 250  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu, se dejaron reaccionar por 5 min para luego añadirles 750  $\mu$ L de carbonato de sodio al 20% y aforarlas a 5 mL. Se dejaron reaccionar

por 60 min, después se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. Siendo estos datos los referentes para obtener nuestra curva de calibración, siendo las diferentes concentraciones lo que representa los valores del eje de las abscisas y siendo la absorbancia lo que represente a los valores del eje de las ordenadas.

Una vez obtenida la curva ( $r^2 \geq 0.98$ ) se procedió a evaluar las muestras de propóleo de manera similar.

Diluyendo el propóleo 1:1000, tomando 10  $\mu\text{L}$  de EEP para aforarlo a 10 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  quedando con una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

La curva de calibración fue comprobada al medir EAG a una concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$ , el cual se procesó y midió igual que las muestras, coincidiendo los valores de absorbancia, con los de la curva de calibración.

#### 5.6. Cuantificación de Compuestos de Flavonoides Totales en EEP

Los análisis para determinar la cantidad de flavonoides totales en los extractos de propóleos se realizaron según el método espectrofotométrico descrito por Rodríguez y colaboradores (2020).

La cuantificación de flavonoides totales en los EEP se llevó mediante una técnica de colorimetría, por el método de tricloruro de aluminio ( $\text{ALCL}_3$ ). Este método se basa en la coloración que se forma entre los flavonoides y el cloruro de aluminio en presencia ácido fuerte como el ácido clorhídrico, estas reacciones tienen una absorbancia máxima a una longitud de onda específica, la cual se utiliza para cuantificar cantidad de flavonoides presentes los extractos etanólicos de propóleos.

Para la medición primero se preparó un estándar con quercetina (EQ) para hacer la curva de calibración. El estándar se preparó pesando 10.6 mg de quercetina ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ ) y aforándolo a 10 mL de metanol puro, obteniendo una concentración de 1.06 mg/mL. La quercetina a esta concentración la llamamos solución madre (SM), partiendo de esta concentración de EQ, se realizó la solución stock (SS), la cual se obtuvo tomando 1 mL de SM y se aforo a 10 mL con metanol, obtenido una concentración de 106  $\mu\text{g/mL}$  de EQ. Una vez obtenida nuestra solución stock se realizaron las diferentes concentraciones de la siguiente manera:

Concentración 1 = 10  $\mu\text{L}$  “SS” + 990  $\mu\text{L}$  de metanol al 50% = 1.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Concentración 2 = 30  $\mu\text{L}$  “SS” + 970  $\mu\text{L}$  de metanol al 50% = 3.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Concentración 3 = 50  $\mu\text{L}$  “SS” + 950  $\mu\text{L}$  de metanol al 50% = 5.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Concentración 4 = 70  $\mu\text{L}$  “SS” + 930  $\mu\text{L}$  de metanol al 50% = 7.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Concentración 5 = 90  $\mu\text{L}$  “SS” + 910  $\mu\text{L}$  de metanol al 50% = 9.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Concentración 6 = 110  $\mu\text{L}$  “SS” + 890  $\mu\text{L}$  de metanol al 50% = 11.66  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Una vez preparadas estas concentraciones se preparó el tricloruro de aluminio al 2% pesando 500 mg de tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), el cual se aforó a 25 mL con agua destilada. Luego las concentraciones fueron procesadas, para posteriormente determinar la absorbancia con un espectrofotómetro EVOLUTION 201 UV-Visible de la marca Thermo SCIENTIFIC a una longitud de onda de 430 nm.

Las 6 concentraciones fueron procesadas de la siguiente manera:

Se colocó 1 mL de cada concentración en tubos de 5 mL, se les agregó 1 mL de metanol al 50%, después se agregó 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  dejando reposar durante 30 min, en la oscuridad, después se midió la absorbancia en una longitud de onda de 430 nm, con estos datos se elaboró la curva de calibración, siendo las concentraciones lo que represente los valores del eje de las abscisas y absorbancia el eje de las ordenadas.

Una vez obtenida la curva ( $r^2 \geq 0.98$ ) se procedió a evaluar las muestras de manera similar.

Las muestras de propóleo se diluyeron 1:1000, tomando 10  $\mu\text{L}$  de EEP para aforarlo a 10 mL con metanol al 50% quedando a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , después se tomó 1 mL de esta concentración (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se le añadió 1 mL de metanol al 50% obteniendo una dilución final de 1:2000 a una concentración 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las muestras recibieron el mismo proceso que se utilizó para cuantificar las diferentes concentraciones del estándar para la curva de calibración.

Los EEP se procesaron de la siguiente manera:

Se colocó 1 mL de cada una de las muestras de EEP (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en tubos de 5 mL, luego se colocó 1 mL de metanol al 50% junto con 1 mL de tricloruro de aluminio al 2%, y se dejaron reposar durante 30 min sin contacto con la luz, después se midió su absorbancia a una onda de 430 nm.

La curva de calibración fue comprobada al medir EQ a una concentración de 7.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , el cual se procesó y midió igual que las muestras, coincidiendo los valores de absorbancia, con los de la curva de calibración.

### 5.7. Determinación de la Actividad Antioxidante *In vitro* (DPPH) en EEP

Se adaptó el método de DPPH propuesto por Martinsen y colaboradores (2019) midiendo el efecto sobre los radicales libres 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, calculando a través de una fórmula de regresión lineal  $y = \alpha + \beta \times x$ , al igual que los reactivos y el orden en que se utilizaron fue basados en la técnica utilizada por Machado *et al.*, (2016).

Este método se realizó tomando las mediciones de absorbancias a una onda de 540 nm, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro EVOLUTION 201 UV-Visible de la marca Thermo SCIENTIFIC. Se preparó el reactivo DPPH pesando 2 mg, los cuales fueron aforados en 50 mL de metanol, se midió su absorbancia a una onda de 540 nm ajustándolo a una absorbancia de 0.7 nm.

Se midieron 3 diferentes concentraciones de cada EEP, los cuales se obtuvieron de la siguiente manera:

Se diluyeron los EEP (100 mg/mL) en una relación 1:100 colocando 10  $\mu$ L de EEP + 990  $\mu$ L de metanol al 50%, obteniendo así nuestros extractos etanólicos de propóleo diluidos (EEPd) a una concentración 1 mg/mL, después de cada EEPd se obtuvieron tres concentraciones de la siguiente manera:

Concentración 1= 100  $\mu$ L de “EEPd” + 900  $\mu$ L de metanol al 50% = 100  $\mu$ g/mL

Concentración 2= 200  $\mu$ L de “EEPd” + 800  $\mu$ L de metanol al 50% = 200  $\mu$ g/mL

Concentración 3= 300  $\mu$ L de “EEPd” + 700  $\mu$ L de metanol al 50% = 300  $\mu$ g/mL

Obteniendo un valor máximo de 300  $\mu$ g/mL, intermedio de 200  $\mu$ g/mL y mínimo de 100  $\mu$ g/mL, a excepción de una muestra que se utilizó el doble de cada concentración (200,400 y 600  $\mu$ g/mL). Se colocaron 250  $\mu$ L de las diferentes concentraciones de cada EEP en tubos de 3 mL, después se les agregó 750  $\mu$ L del reactivo DPPH, se dejó reaccionar por 30 min para luego medir su absorbancia a una onda de 540 nm.

Como control negativo se utilizó metanol al 50%. Añadiendo a un tubo de ensayo 250  $\mu$ L de metanol al 50% y 750  $\mu$ L de reactivo DPPH para medir su absorbancia a una onda de 540 nm. Se observó que el metanol al 50% no tuvo efecto contra el radical DPPH, el cual refleja la nula inhibición del metanol en contra del DPPH. Para medir su inhibición, se utilizó la siguiente fórmula

$$\% \text{ de reduccion} = 100 - \left( \frac{\text{Absorbancia de control negativo}}{\text{Absorbancia de la muestra}} \right) \quad (5)$$

Obteniendo los datos necesarios para nuestra gráfica. Las concentraciones dan los valores del eje de las abscisas y el porcentaje de reducción nos da los valores del eje de las ordenadas. Al aplicar la fórmula de regresión lineal ( $y = \alpha + \beta \times x$ ) obtendremos la concentración necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH, así determinando la capacidad antioxidante *In vitro* (IC50).

### 5.8. Determinación de la Actividad Antimicrobiana de EEP.

Los análisis para determinar la actividad antimicrobiana en los extractos de propóleos, se realizaron utilizando el método presentado por Rodríguez-Pérez *et al.*, (2020)

La micro dilución en caldo se realizó para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), y la concentración mínima bactericida (CMB), utilizando la técnica de micro dilución en caldo, y la técnica de sembrado por extensión.

La suspensión de los microorganismos en los diferentes caldos de cultivos se realizó de la siguiente manera:

Para el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se utilizó caldo de soya con tripticaseina (30 g/mL).

Se transfirieron 10  $\mu$ l de caldo inoculado con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en 990  $\mu$ L de caldo soya tripticaseina, siendo sometidas a diferentes concentraciones de EEP entre 0.1 mg/mL y 2.4 mg/mL incubando a una temperatura de 37°C por un tiempo de 24h para, las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Debido a la reacción de los flavonoides con el agua estos hacen que un medio acuso se tiña blanco haciendo imposible medir su absorbancia, es por esta razón que se evaluaron mediante la técnica de sembrado por extensión, utilizando agares de soya tripticaseina a una concentración de 30 g/L, agar bacteriológico 7.5 g/L para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, Utilizando una cantidad de 100  $\mu$ l de las diferentes concentraciones de EEP ya inoculadas y extendiéndolas con una esparcidor de células en cajas Petri, dejándolas incubando a una temperatura de 37°C por 24 h.



Para el crecimiento de *Melissococcus plutonius* se utilizó caldo infusión cerebro corazón (BHI); (37 g/L), fosfato de potasio (20.41 g/L), dextrosa (10 g/L) a un pH de 6.4.

Para determinar el efecto antimicrobiano de los EEP, se inocularon por la técnica de extensión 100 µl de caldo con *Melissococcus plutonius* en cajas petrí conteniendo medio BHI, posteriormente se colocaron 5 µL de cada concentración de los EEP (20,30 y 40 mg/mL), los cuales se incubaron en anaerobiosis a una temperatura de 37°C por 5 d, transcurrido ese tiempo se midieron los halos de inhibición con un vernier digital (TRUPER) reportando las medidas en mm.

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de análisis de varianza (Anova), utilizando una prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$  para las comparaciones de medias. Utilizando el software SAS (Statistical Analysis System). Versión 9.0.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Las trampas fueron colocadas entre el 29 de agosto y el 4 de septiembre del 2022, y se retiraron entre el 1 y el 16 de noviembre del mismo año (Figura 8). Al evaluar el promedio de propóleo por apiario la mayor cantidad se obtuvo en las colmenas ubicadas en el apiario del campo 2B con 70.2 g/trampa, mientras que el menor valor se registró en el apiario localizado en Cusihuiachi con un promedio de 27.30 g/trampa, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estos, debido a la variabilidad en la recolección del propóleo en las colmenas dentro de cada apiario (Cuadro 3).



**Figura 8.** Apiario EL Vergel, retiro de trampas de propóleo tipo malla.

**Cuadro 3.** Promedio de propóleo en greña obtenido de diferentes apiarios en Cuauhtémoc Chihuahua. Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

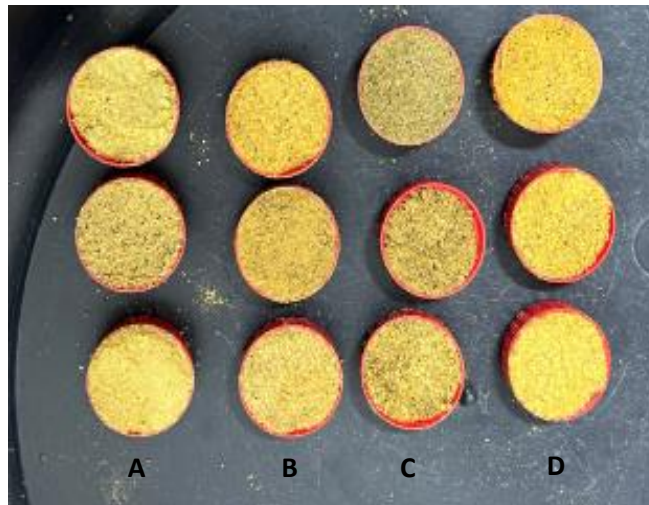
Apiario	Propóleo recuperado (g)	D.S.
Cusihuiachi	27.30 <sup>a</sup>	5.89
Campo 25	48.6 <sup>a</sup>	33.8
El Vergel	40.3 <sup>a</sup>	28.3
Campo 2B	70.2 <sup>a</sup>	44.7

### 7.1. Análisis de Colorimetría.

Al evaluar la Luminosidad ( $L^*$ ) en propóleos obtenidos en los diferentes apiarios, se encontraron diferencias significativas únicamente en las localidades de Cusihuiachi y El Vergel, mostrando un color más claro los propóleos recolectados en Cusihuiachi con un valor promedio de  $L^*=69.98$ , siendo más oscuros los recolectados en El Vergel con  $L^*=54.85$  (Cuadro 4). De igual manera al evaluar el valor de  $a^*$  (Rojo/Verde), los únicos propóleos que mostraron diferencias significativas en este parámetro corresponden a Cusihuiachi y a los propóleos recolectados en el Campo 25, presentando las muestras recolectadas de Cusihuiachi un color verde amarillento ( $a^*=-1.09$ ), que las del Campo 25 teniendo una tonalidad verde ligeramente, pero menos amarillenta ( $a^*=-3.68$ ). Mientras que al analizar  $b^*$  (amarillo/azul), únicamente los propóleos de la región de Cusihuiachi y El Campo 2B, fueron estadísticamente diferentes a los propóleos de El Vergel, el cual registró el menor valor con  $b^*=18.20$ , (Cuadro 4). Al determinar el color del propóleo de forma general en los cuatro regiones, se observó que los propóleos tienen tonalidades de color amarillas y verdes y que no hay diferencias significativas entre las regiones de Cusihuiachi y el Campo 2B, sin embargo, en la región de Cusihuiachi al tener diferentes valores  $L^*=68.98^a$ ,  $a^*=-1.09^a$  y  $b^*=27.49^a$ , su color es ligeramente más amarillo que los demás (Figura 10). De igual manera el propóleo con un color verde menos amarillo se detectó en los propóleos de los apiarios ubicados en la región El Vergel  $L^*=54.85^b$ ,  $a^*=-2.27^{ab}$  y  $b^*=18.20^b$  (Figura 10).

**Cuadro 4.** Colorimetría de propóleos en greña obtenidos en apiarios de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

Apiario	L*	a*	b*
<b>Cusihuiachi</b>	68.98 <sup>a</sup>	-1.09 <sup>a</sup>	27.49 <sup>a</sup>
<b>Campo 25</b>	61.95 <sup>ab</sup>	-3.68 <sup>b</sup>	25.15 <sup>ab</sup>
<b>EL Vergel</b>	54.85 <sup>b</sup>	-2.27 <sup>ab</sup>	18.20 <sup>b</sup>
<b>Campo 2B</b>	61.93 <sup>ab</sup>	-3.25 <sup>ab</sup>	28.77 <sup>a</sup>



**Figura 9.** Muestras de Propóleos obtenidos de apiarios localizados en cuatro ubicaciones de la región de Cuauhtémoc. Chih., A= Cusihuiachi; B= Campo 25; C= El Vergel; D= Campo 2B

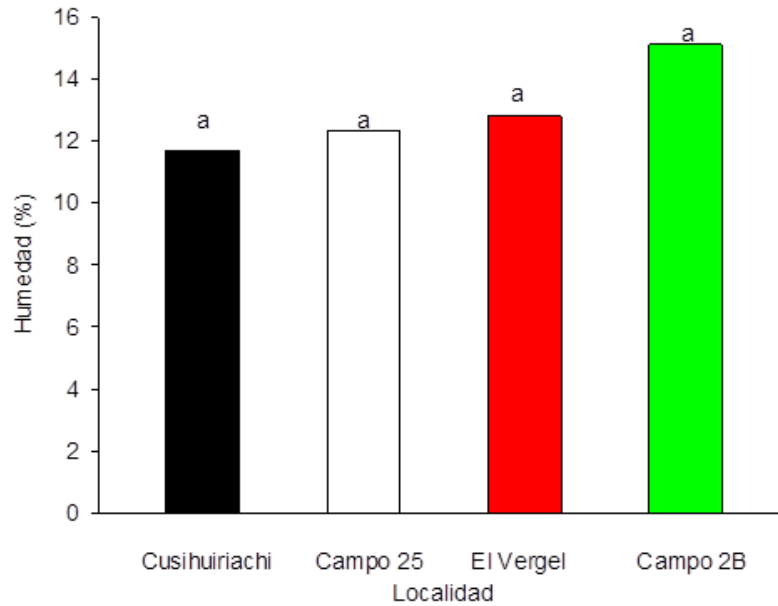
El color en los propóleos está relacionado a la cantidad y tipos de resinas que éstos contienen, en el caso de la región de Cuauhtémoc al ser un clima templado semi húmedo se obtuvieron propóleos de color verdoso amarillento, similar a los mencionados por Bankova y colaboradores (2019) quienes señalan que debido a las principales fuentes botánicas en estos climas, como son plantas leñosas (árboles y arbustos), como los de la región, los propóleos obtenidos son verde amarillentos. Estas fuentes, como las plantas leñosas pueden proporcionar resinas a la colmena, aun cuando no sea temporada de floración, caso contrario con las plantas silvestres de temporada que solo están disponibles por períodos cortos, siempre y cuando las condiciones climatológicas sean las óptimas para su desarrollo. De igual manera Rodríguez-Peres y colaboradores (2020), reportaron mediante pruebas subjetivas (Observación), que los colores de propóleos recolectados de orígenes botánicos de *Eucalyptus globulus*, *Ricinus communis* y *Callistemon citrinus* (Curtis), en Cuautitlán Izacalli

del Estado de México presentaron un color marrón verdoso, con tinte amarillo, al igual que los propóleos originarios de lapujahua-Senguio, Michoacán, de fuente botánica *Pinus pseudostrabus* Lindl, los cuales fueron descritos como marrones verdosos con tintes amarillos, estos colores también se observaron en propóleos de plantas con cuerpos leñosos (árboles y arbustos) y silvestres en la región de Tlacotalpan, Veracruz.

## 7.2. Análisis Proximal de Propóleo en Greña

### 7.2.1. Contenido de Humedad Total.

Al determinar el contenido de humedad en los diferentes propóleos de la región de Cuauhtémoc, Chih., no presentaron diferencias significativas entre ellos, con valores entre 11.7 y 15.06 % (Figura 11). Siendo el propóleo con mayor contenido de humedad, el correspondiente al apiario ubicado en el Campo 2B, con un 15.06 %, mientras que el propóleo con menor contenido de humedad correspondió al ubicado en Cusihuiachi con 11.7 % (Figura 11).



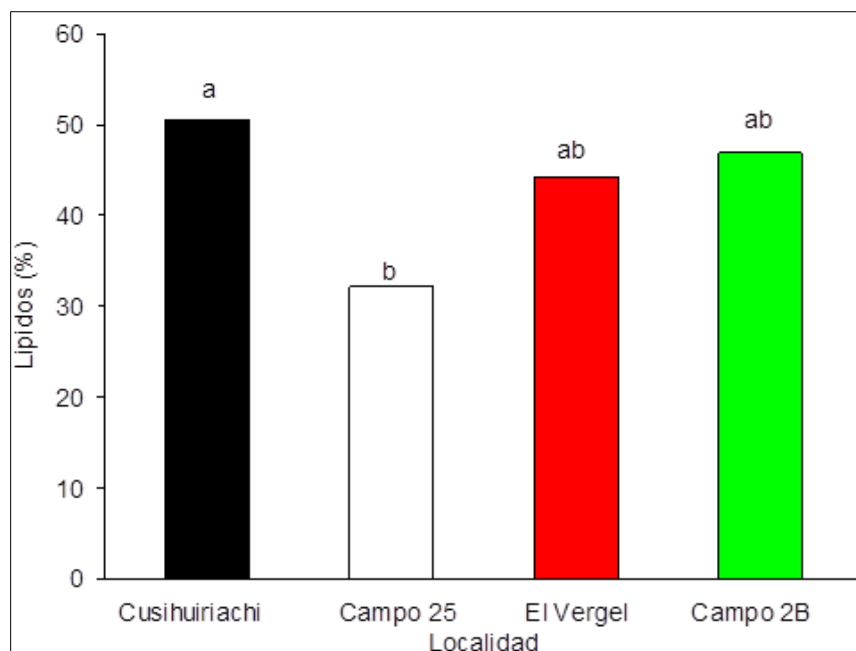
**Figura 10.** Determinación del contenido total de humedad de propóleo recolectado en diferentes apiarios de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua. Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

En la región encontramos propóleos con un porcentaje de humedad entre 11.71 y 15.06 %, esta variación en los porcentajes de humedad de los propóleos no es estadísticamente significativa. Esto quiere decir que los propóleos en la región de Cuauhtémoc tienen niveles de humedad similares y que no hay diferencia observada significativa desde el punto de vista estadístico.

### 7.2.2. Contenido Total de Lípidos.

Los propóleos evaluados de la región de Cuauhtémoc, Chih., se encontraron conformados con una cantidad de lípidos entre 32.23 y 50.50 % de su composición total.

Presentando diferencias estadísticas entre los propóleos obtenidos de los diferentes apiarios, registrándose una mayor cantidad de lípidos en los propóleos recolectados en Cusihuirachi con 50.5 %, mientras el menor valor de lípidos, se registró en los propóleos del apiario de la localidad del Campo 25 con un 32.23 %, no presentando diferencias con los propóleos de las localidades de El Vergel y del Campo 2B con valores de 44.26 y 46.87 % respectivamente (Figura 12).



**Figura 11.** Determinación del contenido total de lípidos en propóleo obtenido de las diferentes localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua. Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

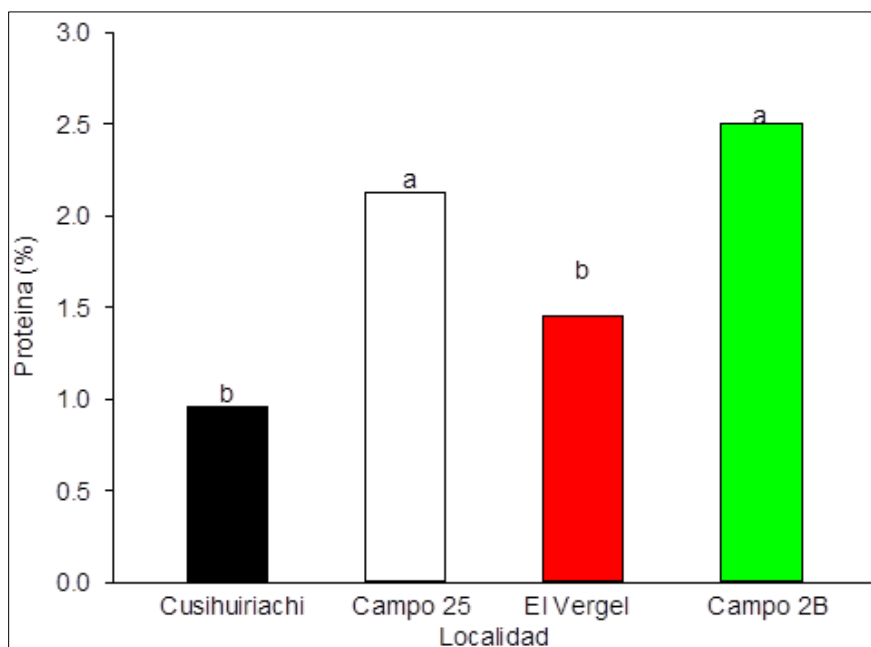
La cantidad de lípidos en los propóleos de las localidades Campo 25 (32.23%) y Cusihuirachi (50.5%) fueron estadísticamente diferentes, esto puede estar relacionado con la cantidad y tipo de flora, como se observa en el cuadro 2 hay diferente variedad de flora. La cantidad de lípidos presentes en el propóleo está relacionada con la presencia de ácidos grasos y en su mayoría por la cantidad de cera utilizada para su elaboración, esto provoca que la composición del propóleo varíe según la cantidad de resina disponible, cantidad de néctar disponible, necesidades de la colmena y tipo de recolección. Las colmenas aun con número de población similar, pueden llegar a tener una variabilidad en la recolección de propóleo, ya que su población puede ser similar, pero el número de abejas destinadas a la recolección puede ser menor lo que influye directamente en la composición de los insumos de la colmena (Pavlovic *et al.*, 2020).

### 7.3.3. Contenido Total de Proteína.

Al determinar el contenido total de proteína, de igual manera se encontraron diferencias



significativas entre los propóleos en los diferentes apiarios, siendo este mayor en los apiarios ubicados en El Campo 25 y en el Campo 2B con valores de 2.12 y 2.49 % respectivamente. Mientras el menor contenido de proteína se registró en los propóleos de Cusihuiachi con 0.95 % y del Vergel, el cual presentó 1.44 % del contenido total de proteína (Figura 13).



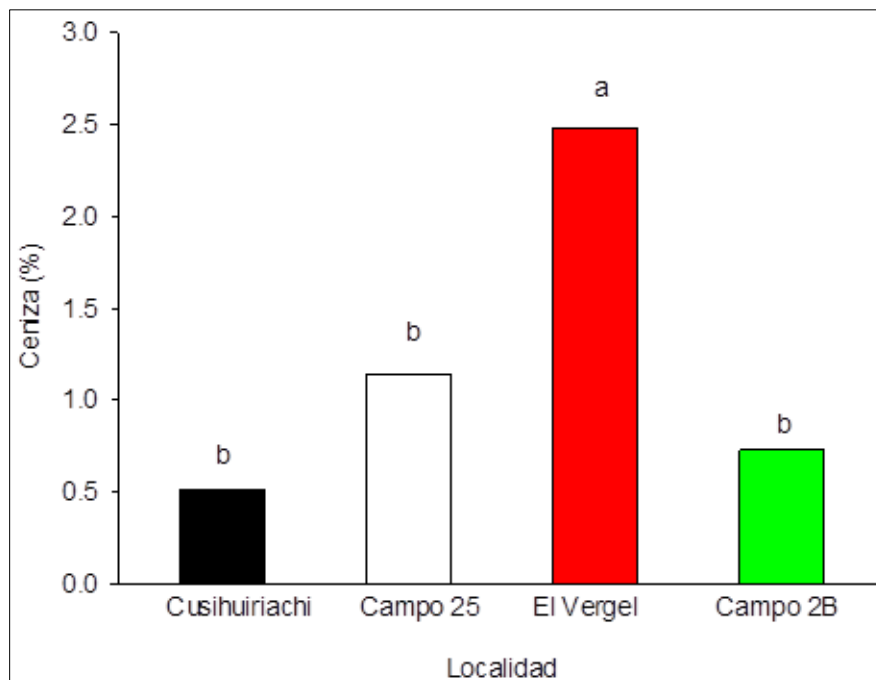
**Figura 12.** Determinación del contenido total de proteína de los propóleos de las diferentes localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua. Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

En el contenido total de proteína de los propóleos encontramos entre 0.95 y 2.49 %. Siendo los del apiario del campo 2B con un 2.49 % y del campo 25 con un 2.12 % los que obtuvieron mayor cantidad de proteína, por otra parte los de menor cantidad de proteínas fueron los de Cusihuiachi con un 0.95% y del El Vergel con un 1.44 %. Estudios realizados por Devequi-Nunes y colaboradores (2018), reportaron valores semejantes a los reportados en este estudio con cantidades de proteína entre 2.1 y 2.5 %. Mientras que los propóleos analizados por Machado y colaboradores (2016), presentaron un menor contenido de proteína con valores entre 0.8 y 6 %. Estas variaciones en el contenido de proteínas en el propóleo se deben a la ubicación geográfica, flora presente, factores ambientales y apícolas. La ubicación geográfica influye en la flora circundante y las condiciones climáticas. La disponibilidad y tipo de polen, resinas y plantas, así como las prácticas

de manejo de las colmenas y condiciones ambientales, también contribuyen a las diferencias en el contenido de proteínas. Además, la variabilidad en las fuentes de resinas y polen recolectadas por las abejas, explica las variaciones observadas en el propóleo de las distintas ubicaciones, en el caso de los apiarios del Campo 25 y del Campo 2B fueron donde se obtuvieron mayores cosechas de miel ese año (Datos no mostrados), esto indica mayor presencia de flores y posiblemente mayor presencia de polen, la cual repercute en el contenido de proteína.

#### 7.3.4. Contenido Total de Ceniza.

Al analizar el contenido de cenizas, el mayor porcentaje con diferencias significativas se registró en los apiarios ubicados en El vergel con 2.47, no presentando diferencias en los propóleos de los demás apiarios, los cuales presentaron valores de cenizas entre 0.50 y 1.13 (Figura 14).

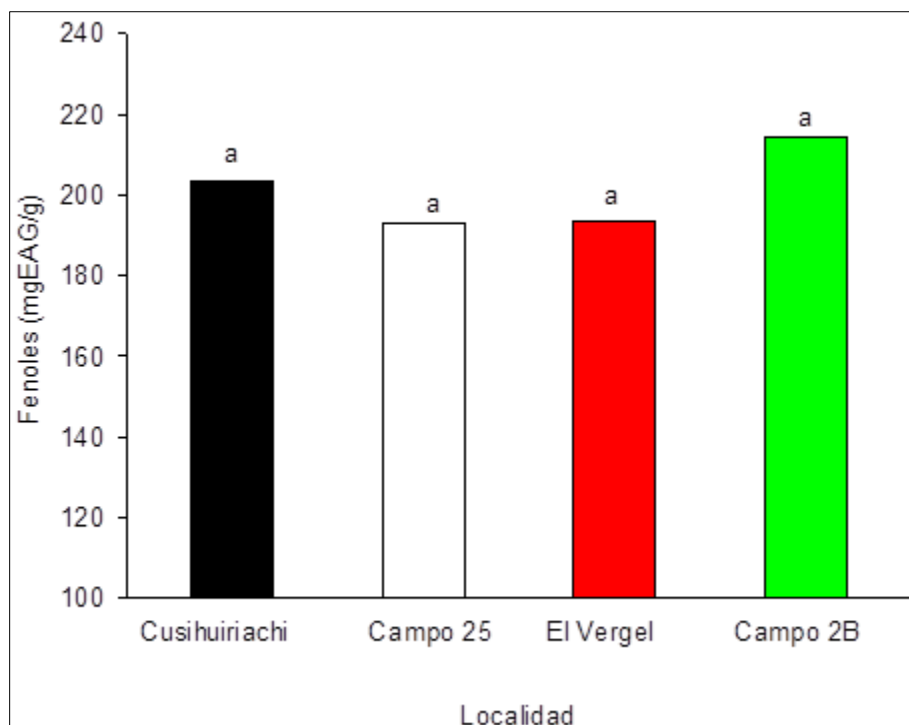


**Figura 13.** Determinación del contenido total de ceniza de los propóleos de las diferentes localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua. Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

Al determinar el contenido total de cenizas encontramos una variación con valores entre 0.51 a 2.47 % en donde los propóleos obtenidos de la ubicación de El Vergel fueron los que registraron un mayor contenido total de cenizas con 2.47 % no presentándose diferencias significativas entre los propóleos de las demás localidades (Figura 7). Estos datos concuerdan con Machado y colaboradores (2016), quienes reportaron cantidades de cenizas entre 0.9 y 2.4 % al analizar 8 muestras de propóleo. De igual manera, al analizar 3 muestras de propóleo Devequi-Nunes *et al.*, (2018), reportaron valores entre 1.2 y 1.4 % de cenizas totales. La determinación del contenido total de cenizas en propóleo es crucial, ya que esta medición ofrece información valiosa sobre la pureza y calidad del producto. La ceniza puede expresarse en los residuos inorgánicos que permanecen después de someter la muestra a combustión. Esto quiere decir que un exceso de impurezas se puede ver reflejado en la cantidad de cenizas totales encontradas en los análisis proximales de los propóleos en greña, en México la NOM-003-SAG/GAN-2017 no describe ni un parámetro sobre la cantidad de cenizas permitidas en los propóleos, pero la Brazil. Ministry of Health. National Health Surveillance Agency (ANVISA). (2001). Normative Instruction n° 3 solo permite un máximo de 5 % de contenido de ceniza total.

#### 7.4. Compuestos Fenólicos Totales en los Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP).

Las cantidades de compuestos fenólicos cuantificados en los propóleos de las distintas localidades de la región de Cuauhtémoc, Chih., tuvieron valores entre 193.12 y 214.13 mgEAG/g, siendo estadísticamente iguales (Figura 15). Encontrando la mayor la cantidad de fenoles en el campo 2B con 214.13 mgEAG/g, seguido por los propóleos de Cusihuiachi con 203.47 mgEAG/g, mientras que los valores obtenidos en El Vergel y el Campo 25 con 193.68 y 193.12 mgEAG/g respectivamente (Figura 15).



**Figura 14.** Determinación del contenido de compuestos fenólicos de los propóleos de las diferentes localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua. Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

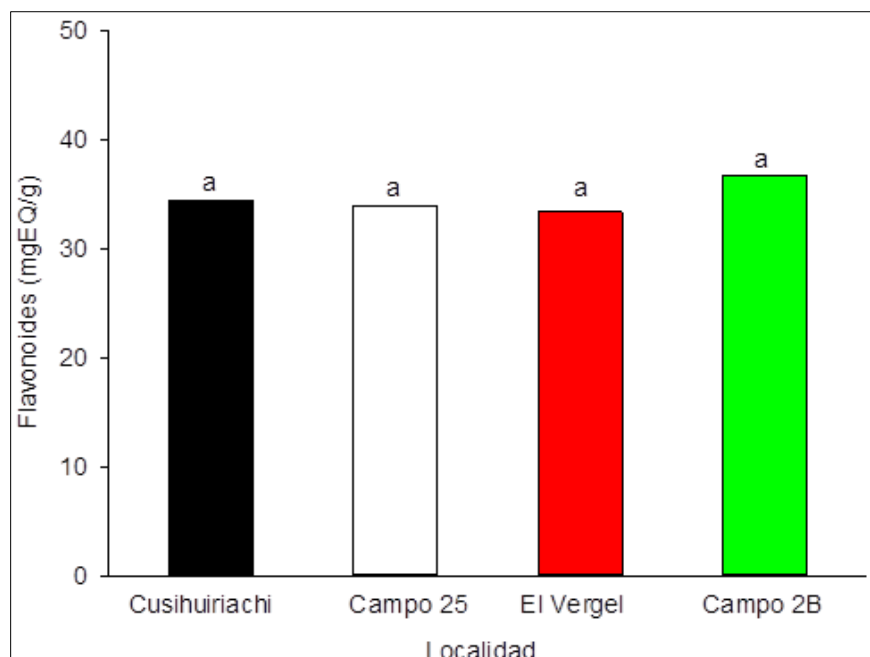
La cantidad de fenoles detectados mostró un rango de 193.12 mgEAG/g a 214.13 mgEAG/g no teniendo diferencias significativas entre los propóleos evaluados. Con esto observamos que las de resinas de las diferentes ubicaciones de la región pueden proporcionar propóleos con cantidades altas en contenido de fenoles.

En la mayoría de las investigaciones con EEP, se ha detectado más de 170 mgEAG/g de fenoles. Gardana y colaboradores (2007) caracterizaron por calidades los propóleos de acuerdo al contenido de fenoles totales. Propóleos con cantidades de fenoles entre 110 mgEAG/g a 140 mgEAG/g se consideran de calidad aceptable, propóleos con cantidades entre 140 mgEAG/g y 170 mgEAG/g son considerados de una calidad buena y propóleos con cantidades mayores a 170 mgEAG/g son considerados como calidad alta. Por lo que de acuerdo a estos autores, los propóleos estudiado pueden considerarse son de alta calidad. Además que la NOM-003-SAG/GAN-2017 indica que todo propóleo debe cumplir con al menos el 5 % de fenoles en su composición total siendo una cantidad equivalente a 50 mgEAG/g, obteniendo propóleos en la región de Cuauhtémoc hasta 4 veces más el valor mínimo permitido por la NOM-003-SAG/GAN-2017 Machado y colaboradores

(2016), quienes reportaron cantidades de fenoles entre 110 y 198.77 mgEAG/g en propóleos en zonas tropicales provenientes de flora *Dalbergia ecastophyllum* y *Baccharis dracunculifolia*. Propóleos de zonas templadas originarios de flora *Populus* spp., fueron estudiados por Socha y colaboradores (2015) quienes reportaron un contenido de fenoles entre 150 y 190 mgEAG/g. Sin embargo, en propóleos del Centro de México (Estado de México, Michoacán y Veracruz) estudios realizados por Rodríguez-Peréz y colaboradores (2020), al analizar 8 propóleos, reportaron cantidades de fenoles entre 12 y 191 mgEAG/mL, lo que nos indica la gran variabilidad que estos pueden tener ya que la cantidad de fenoles presentes en el propóleo está directamente relacionada con la ubicación geográfica y el origen botánico de las resinas recolectadas. De aquí la importancia de obtener propóleos de alta calidad, debido a que los fenoles tienen una interacción biológica con organismos vivos, teniendo actividades benéficas como actividad antibacteriana, actividad antiviral, actividad antioxidante, capacidad de inhibir la inflamación y provocar analgesia. Pahlavani y colaboradores (2019), menciona también que el propóleo interviene directamente con procesos en el organismo estrechamente relacionado con enfermedades que provocan una mala señalización y proliferación celular, es por esto que es de suma importancia encontrar propóleos con cantidades superiores a los 170 mgEAG/g, como los detectados en esta región.

#### 7.5. Compuestos Flavonoides Totales de los EEP.

Al determinar la cantidad de flavonoides de los diferentes propóleos de la región, se obtuvieron valores entre 33.36 y 36.7 mgEQ/g, no registrándose diferencias significativas entre ellos. Siendo el apiario del Campo 2B el que obtuvo mayor cantidad de flavonoides con 36.7 mgEQ/g, mientras que en Cusihiuriachi fueron de 34.46 mgEQ/g y finalizando con los propóleos del Campo 25 y El Vergel con 33.9 y 33.46 mgEQ/g respectivamente (Figura 16).

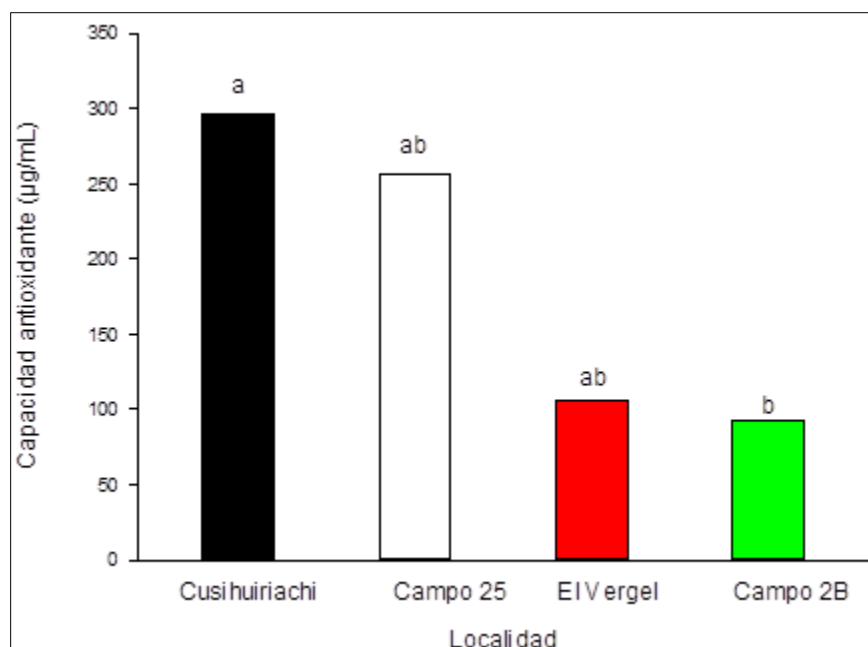


**Figura 15.** Determinación del contenido de flavonoides de las diferentes localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua representado en estándar de Quercetina por gramo (mgEQ/g). Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

La cantidad de flavonoides registradas en los propóleos de las diferentes localidades, estuvieron entre 33.36 y 36.70 mgEQ/g (3.3 y 3.7 %), no presentándose diferencias significativas entre los propóleos evaluados. Estos valores sobrepasan las cantidades mínimas requeridas establecidas por la NOM-003-SAG/GAN-2017, la cual solicita, un mínimo de 0.5 % equivalente a 5 mgEQ/g. Estudios realizados por Machado y colaboradores (2016), con propóleos de zonas tropicales reportaron cantidades de flavonoides entre 24.4 y 58.2.6 mgEQ/g, mientras que en propóleos provenientes de climas templados como Polonia, el contenido de flavonoides fue entre 35 y 62 mgEQ/g (Socha *et al.*, 2015). Por otra parte estudios realizados por Hernández-Zarate y colaboradores (2018), en la región de Guanajuato, México, reportaron cantidades de flavonoides entre 13 y 246 mgEQ/mL. De acuerdo a los resultados obtenidos y a la cantidad de flavonoides detectados en este estudio, con valores por debajo de los 36.70 mgEQ/g, su interacción biológica o sus actividades benéficas como actividad antibacteriana, actividad antiviral, actividad antioxidante, se podrían ver disminuidas (Gardana *et al.*, 2007).

### 7.6. Determinación de la Capacidad Antioxidante *In vitro* (DPPH) de los EEP.

El mayor potencial antioxidante se registró en los propóleos del Campo 2B requiriendo una concentración de 92.94  $\mu\text{g/mL}$  para lograr la IC50, siendo estadísticamente diferentes los propóleos obtenidos de Cusihiuriachi, los cuales mostraron el menor potencial antioxidante requiriendo de una concentración de 296  $\mu\text{g/mL}$ . De igual manera no se registraron diferencias entre la IC50 de las demás localidades (Figura 17).



**Figura 16.** Evaluación de la capacidad antioxidante de los diferentes propóleos de las localidades de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, para una inhibición del 50 % del DPPH (IC50). Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

En los EEP evaluados encontramos diferencias significativas en la concentración necesaria para IC50, con valores entre 92.97 y 296.93  $\mu\text{g/mL}$ , siendo los propóleos del apiario del Campo 2B, los que registraron un mayor efecto antioxidante con 92.97  $\mu\text{g/mL}$ . La actividad antioxidante *In vitro* de los EEP varían de acuerdo a la cantidad total de fenoles y flavonoides, sin embargo el tipo de estos, también está estrechamente relacionado con la actividad antioxidante, como los resultados obtenidos en propóleos del estado de México, los cuales presentaron una buena capacidad

antioxidante de IC50 de 48  $\mu\text{g/mL}$ , aun cuando sus valores de fenoles y flavonoides presentaron una baja concentración con 64 mgEA/g, y 19 mgEQ/g respectivamente (Rodríguez-Pérez y colaboradores (2020)). Por otra parte Devequi-Nunes y colaboradores (2018), utilizaron concentraciones de 133.25  $\mu\text{g/mL}$  para lograr una IC50, en propóleos tipo verde, mientras que en los propóleos tipo marrón requirieron una concentración de 159.54  $\mu\text{g/mL}$ . Las variaciones en la actividad antioxidante de igual manera se pueden obtener en las sinergias que estos mismos puedan presentar, observando en ocasiones grandes variaciones en su actividad antioxidante, así como en los propóleos estudiados por Rodríguez-Pérez y colaboradores (2020) quienes obtuvieron concentraciones entre 26 y 950.4  $\mu\text{g/mL}$  para una IC50.

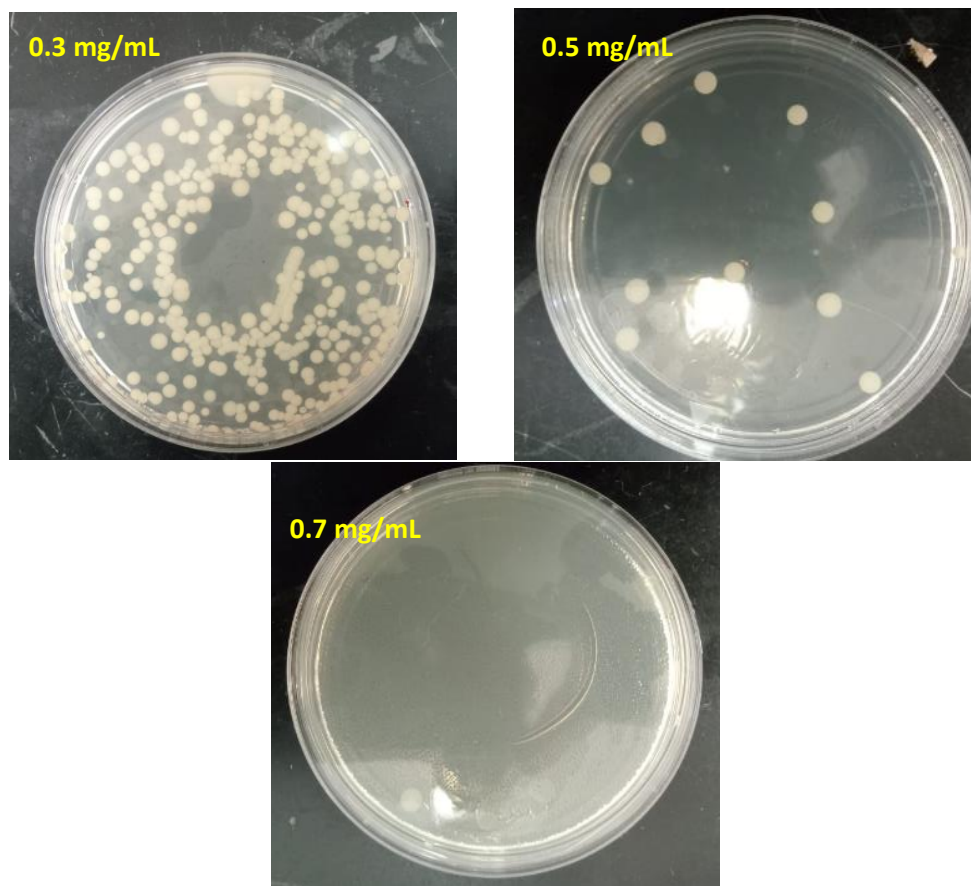
Pahlavani y colaboradores (2020), mencionan que los principales compuestos antioxidantes del propóleo están en sus compuestos fenólicos, entre ellos la artepilina y los ésteres como es el caso del propóleo tipo verde originario de la planta *Baccharis dracunculifolia*. Por otra parte Gardana y colaboradores (2007), mencionan que los propóleos provenientes de *Populus* spp., contienen éster fenético de ácido cafeico que es de los componentes con mayor actividad antioxidantes en estos propóleos.

La actividad antioxidante, es una función deseada en los suplementos alimenticios, ya que la presencia de radicales libres en el organismo afecta la función celular. Šuran y colaboradores (2021), mencionan que la oxidación y reducción de radicales libres actúan directa o indirectamente en el organismo causando problemas con el funcionamiento del organismo viéndose afectado varios procesos y factores relacionados con la proliferación celular, inducción de detención del ciclo celular y la apoptosis, así como la intervención de la señalización celular.

#### 7.8 Determinación de la Actividad Antimicrobiana de EEP.

Se logró determinar que los propóleos de la región de Cuauhtémoc mostraron efecto bactericida sobre bacterias Gram positivas específicamente contra *Staphylococcus aureus* (Figuras 18 y 19) y *Melissococcus plutonius*. Por otra parte, estos propóleos no presentaron efecto bactericida en bacterias Gram negativas contra *Escherichia coli*. En el cuadro 5 se muestran las concentraciones de los diferentes propóleos que fueron utilizados para obtener un efecto antimicrobiano frente a los diferentes microorganismos, mostrando que estos no tienen efecto contra *Escherichia coli*.





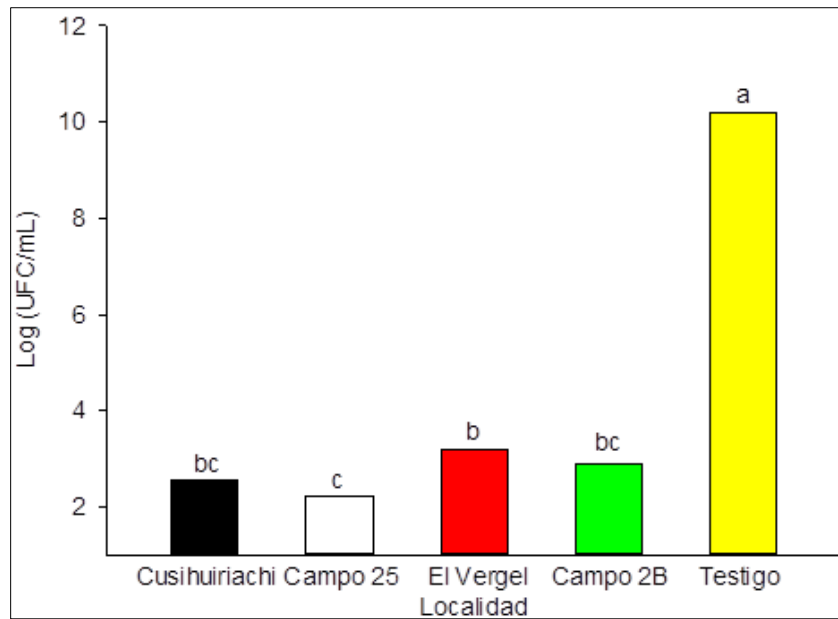
**Figura 17.** Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en agar soya tripticaseina, después de estar sometido 24 h a diferentes concentraciones de EEP.

**Cuadro 5.** Determinación de la actividad antimicrobiana de EEP mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración mínima de Bactericida (CMB).

Localidad	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli.</i>		<i>Melissococcus plutonius</i>	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
Cusihuirachi	0.3	0.7	--	--	--	20
Campo 25	0.3	0.7	--	--	--	20
El Vergel	0.3	0.7	--	--	--	20
Campo 2B	0.3	0.7	--	--	--	20

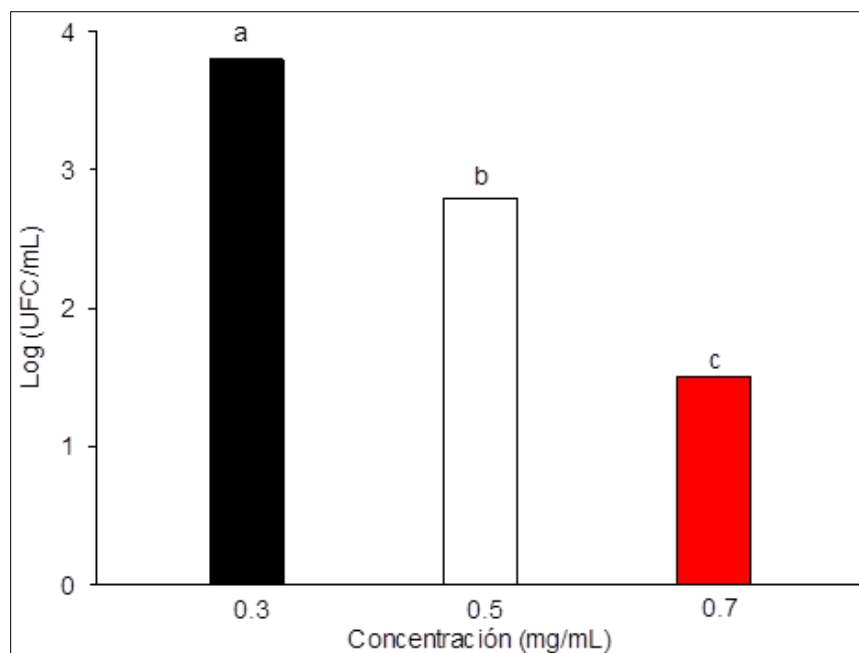
Al determinar la actividad antimicrobiana *In vitro* de los propóleos contra *Staphylococcus aureus* el menor crecimiento de colonias se contabilizó en los tratamientos donde se aplicaron los propóleos del Campo 25 con 2.2 log (UFC/mL), no presentando diferencias significativas con los

resultados obtenidos con los propóleos de Cusihuirachi con 2.5565 log (UFC/mL) y del Campo 2B con 2.9449 log (UFC/mL). Las únicas diferencias significativas entre los propóleos analizados se obtuvieron con el propóleo del Campo 25 y El Vergel. (Figura 19).



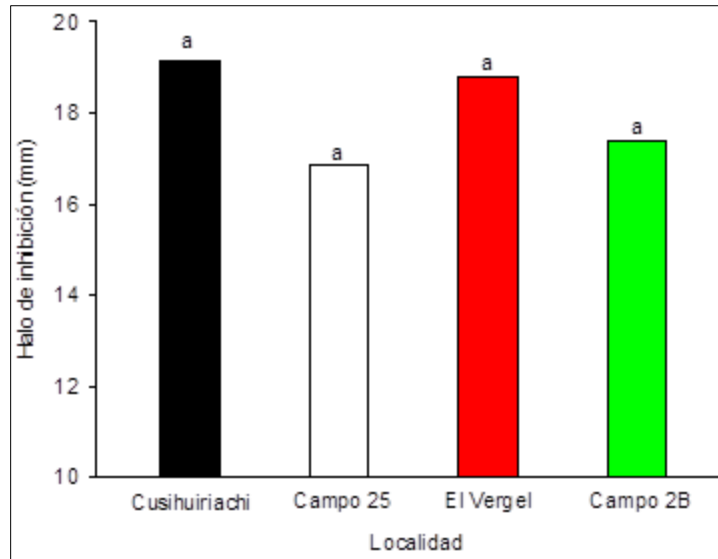
**Figura 18.** Determinación del halo de inhibición en *Staphylococcus aureus* con diferentes propóleos de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua. Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

Al determinar la concentración de los propóleos que presentaron un mayor efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus*, podemos ver una tendencia, siendo menor el número de bacterias a una mayor concentración, siendo la concentración de propóleo de 0.7 mg/mL, en donde se registró el menor número de bacterias (Figura 20).

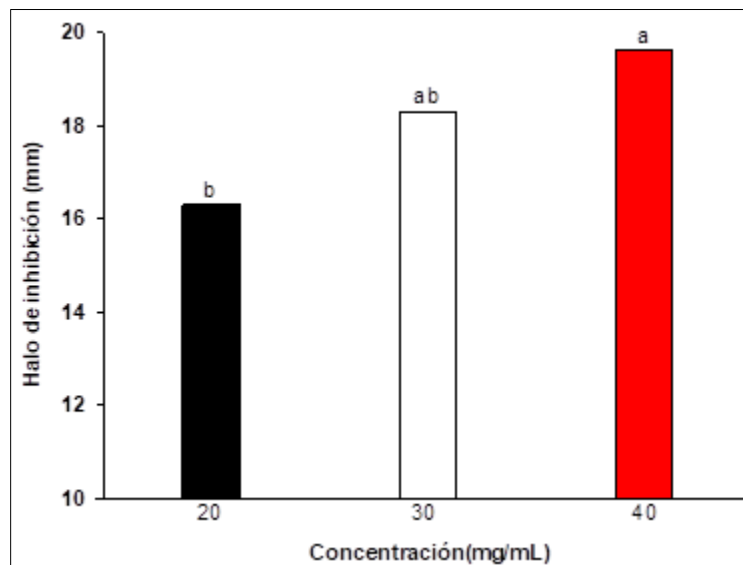


**Figura 19.** Determinación de la actividad antimicrobiana a *Staphylococcus aureus*, con diferentes concentraciones de propóleo de la localidad de Cuauhtémoc Chihuahua. Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

Al evaluar el efecto antimicrobiano de los propóleos obtenidos de los apiarios en las diferentes localidades de Cuauhtémoc Chihuahua, para el control de *Melissococcus plutonius*, no se presentaron diferencias significativas entre ellos, sin embargo los valores obtenidos en los halos de inhibición fueron entre 16.8 y 19.1 mm (Figura 21). Dichos resultados son prometedores, para el control de esta enfermedad en campo. De igual manera al evaluar las concentraciones de 20, 30 y 40 mg/mL, aun cuando la concentración más baja presentó el menor halo de inhibición con 16.3 mm, esta podría utilizarse en campo y ver su efectividad en el control de *Melissococcus plutonius*. Aun cuando las concentraciones de 30 y 40 mg/mL fueron en donde se obtuvieron mayores halos de inhibición con 18.3 y 19.6 mm respectivamente (Figura 22).



**Figura 20.** Determinación del halo de inhibición en *Melissococcus plutonius* con diferentes propóleos de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 21.** Determinación de la actividad antimicrobiana a *Melissococcus plutonius*, con diferentes concentraciones de propóleo de la localidad de Cuauhtémoc Chihuahua Las medias indexadas con una letra diferente indica diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

Todos Los EEP de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, mostraron tener efecto antibacteriano, determinando una concentración mínima inhibitoria (CMI) y una concentración mínima bactericida (CMB) de 0.3 y 0.7 mg/mL respectivamente en el control de *Staphylococcus aureus*,

mientras que para *M. plutonius* la CMB fue de 20 mg/mL. No detectándose efecto contra *Escherichia coli*, aun a concentraciones de 100 mg/mL, lo que nos indica un mayor efecto en bacterias Gram positivo que en Gram negativas. Al evaluar el efecto bactericida de los diferentes EEP, si se observaron diferencias significativa frente a *Staphylococcus aureus*, siendo los propóleos del Campo 25 con la mejor actividad antimicrobiana reportando un crecimiento de 2.22 log(UFC/mL) y siendo los propóleos de El vergel los que obtuvieron menor efecto antimicrobiano con 3.19 log(UFC/mL), La variabilidad en la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, indica que los propóleos pueden tener diferente calidad o tipos de fenoles y flavonoides con menor actividad antimicrobiana. Estos hallazgos pueden tener implicaciones en la aplicación potencial de propóleos para combatir infecciones bacterianas, especialmente aquellas causadas por bacterias Gram positivas.

En el cuadro 6., se muestra la actividad antimicrobiana de propóleos originarios de diferentes regiones del mundo frente *Staphylococcus aureus*. Se observó que propóleos de la región de Cuauhtémoc cuentan con actividad antimicrobiana similar o mejor a otras partes del mundo, como la región de Brasil, la cual su propóleo mostró una CMB de 0.8 mg/mL o los evaluados en el centro de México los cuales requirieron una CMB de 30 mg/mL.

**Cuadro 6.** Comparación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de propóleos de la región de Cuauhtémoc y otras regiones del mundo para el control de *Staphylococcus aureus* (Machado *et al.*, 2016; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2020)

Región (Fuente botánica)	Actividad antimicrobiana ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
Cusihuriachi, Chihuahua, México. ( <i>Quercus spp</i> y <i>Bidens ferilifolia</i> )	0.3	0.7
Campo 25, Cuauhtémoc, Chihuahua, México. ( <i>Populos spp</i> , <i>Bidens pilosa</i> y <i>Bidens ferilifolia</i> )	0.3	0.7
El Vergel, Cuauhtémoc, Chihuahua, México. ( <i>Populos spp</i> , <i>Bidens pilosa</i> <i>Bidens ferilifolia</i> )	0.3	0.7
Campo 2B, Cuauhtémoc, Chihuahua, México. ( <i>Bidens pilosa</i> , <i>Bidens ferilifolia</i> y <i>Verbascum thapsus</i> )	0.3	0.7
Brasil ( <i>Baccharis latifolia</i> )	0.2	0.8
Brasil ( <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> )	0.05	0.8-0.4
México ( <i>Quercus spp.</i> y <i>Pinus spp.</i> )	0.46	0.93
México ( <i>Quercus spp.</i> <i>Citrus sinensis</i> y <i>Citrus limon</i> )	15	30

De igual manera al evaluar la capacidad bactericida contra *Melissococcus plutonius*. Los propóleos de las diferentes localidades no mostraron diferencias significativas entre ellos, registrándose halos de inhibición mayores a 16mm a una concentración de 20 mg/mL. Estudios realizados por Murray y colaboradores (2023), reportaron extractos de propóleo en colmenas ubicadas en Ohio.EUA, con un efecto antimicrobiano de 1.14 mg/mL contra *Melissococcus plutonius*, efecto similar al encontrado por el antibiótico

Respecto al efecto bactericida contra *Escherichia coli*., los propóleos de la región de Cuauhtémoc no presentaron propiedades antimicrobianas a concentraciones altas 100 mg/mL. De igual manera Velázquez y colaboradores (2007), mencionan que los propóleos de sonora tampoco presentaron efecto contra *Escherichia coli*, De igual manera Murray y colaboradores (2023) reportaron que propóleos de Ohio., presentaron un menor o nulo efecto contra bacterias Gram negativas. La ausencia del efecto antibacteriano de los propóleos de la región contra *Escherichia coli* está relacionada posiblemente con en el tipo y cantidad de flavonoides, observando que en los propóleos de la región se reportaron cantidades de flavonoides menores a 34 mgEQ/mL, además las bacterias Gram negativas, suelen ser más resientes a los efectos bactericidas del propóleo debido a la membrana lipídica que estas presentan.

Alotaibi y colaboradores (2021) mencionan que flavonoides como la quercetina afecta la permeabilidad de la bacteria y la galagnina inhibe la síntesis de ADN o ARN. Estos mismos compuestos fueron estudiados por Vargas-Sánchez y colaboradores (2014) demostrando que individualmente tiene un efecto contra bacterias, también demostraron que los flavonoides tienen la capacidad de disminuir la motilidad de la bacteria disminuyendo la patogenicidad de las mismas. Aunque hay compuestos en el propóleo que actúan directamente contra microorganismos, la actividad biológica se relaciona más por la composición total del propóleo que con sus compuestos individuales.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los EEP es una prueba que nos ayuda a dar más herramientas para la caracterización de propóleo. Estudios realizados por Machado *et al.*, (2016), mostraron que EEP tenían misma actividad antimicrobiana, pero cantidades diferentes de fenoles y flavonoides totales, mostrando que no hay una relación directa entre la cantidad de fenoles y flavonoides totales y la actividad antimicrobiana. Evaluar la actividad antimicrobiana nos aporta más herramientas para caracterizar los propóleos de cada región.

## 8. CONCLUSIONES

El color de los propóleos de la región de Cuauhtémoc en forma general fue de un verdoso amarillo, siendo los recolectados en El Vergel, los que presentaron un verde amarillo más oscuro, con diferencias significativas a los demás en los valores de  $L^*$  y  $b^*$ , con 54.85 y 18.20 respectivamente.

En los análisis proximales se observaron gran variabilidad en lípidos, proteínas y cenizas, en los propóleos de la región de Cuauhtémoc, registrándose diferencias significativas, siendo menor la cantidad de lípidos en los propóleos del Campo 25 con 32.2 %. Mientras que en los propóleos el mayor contenido de proteína con 2.13 y 2.5 % se registraron en campo 25 y el campo 2B, respectivamente, el mayor contenido de ceniza se registró en El Vergel con 2.48 %.

No se registraron diferencias significativas en la cantidad de fenoles obtenidos en los propóleos de la región, considerándose todos ellos de alta calidad con valores entre 193.12 y 214.3 mgEA/mL.

La cantidad de flavonoides obtenidas en los diferentes propóleos de la región de Cuauhtémoc fue baja con valores entre 33.36 y 36.7 mgEQ/mL. Sin presentar diferencias significativas entre ellos.

Los propóleos que registraron la mayor actividad antioxidante fueron los de la localidad del campo 2B con un valor de IC50 de 92.97  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que los propóleos del apiario de Cusihiuriachi, registraron la menor actividad antioxidante con un valor de IC50 de 296  $\mu\text{g/mL}$ .

No se encontró actividad antimicrobiana de los propóleos contra *Escherichia coli*, pero si contra *Staphylococcus aureus*, registrándose el menor crecimiento bacteriano en los propóleos del campo 25 con 2.2 Log (UFC/mL), Todos los propóleos mostraron efecto bactericida contra *Melissococcus plutonius*, a una concentración de 20 mg/mL obteniendo halos de inhibición mayores a los 16 mm.

## 9. RECOMENDACIONES

Para estudios futuros recomendaría evaluar un mínimo de seis colmenas por apiario, debido a la complejidad en la composición de los propóleos, y la variabilidad que estos puedan tener de colonia a colonia y entre apiarios.

Es conveniente llevar a cabo este estudio en diferentes épocas del año, para determinar si existen cambios en las propiedades del propóleo.

Seleccionar el método de extracción del propóleo adecuado es de suma importancia debido a que todos los estudios serán a partir de EEP

Es importante señalar que el solvente recomendado para los extractos de propóleo es el alcohol de caña a una concentración de 70%, debido a que a esta concentración podremos obtener mayor cantidad de compuestos poli fenólicos en nuestros extractos, así como mayor efecto en sus actividades benéficas, además de proporcionar un fácil manejo de los polifenoles para sus estudios.



## 10. REFERENCIAS.

- Abedinia, A., Ariffin, F., Huda, N., & Nafchi, A. M. (2018). Preparation and characterization of a novel biocomposite based on duck feet gelatin as alternative to bovine gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 855-862.
- Alotaibi, A., Ebiloma, G. U., Williams, R., Alfayez, I. A., Natto, M. J., Alenezi, S., & Watson, D. G. (2021). Activity of Compounds from Temperate Propolis against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana*. *Molecules*, 26(13), 3912.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., ... & Zampini, C. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1-49.
- Bankova V., Davide Bertelli, Renata Borba, Bruno José Conti, Ildenize Barbosa da Silva Cunha, Carolina Danert, Marcos Nogueira Eberlin, Soraia I Falcão, María Inés Isla, María Inés Nieva Moreno, Giulia Papotti, Milena Popova, Karina Basso Santiago, Ana Salas, Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya, Nicolas Vilczaki Schwab, José Maurício Sforcin, Michael Simone-Finstrom, Marla Spivak, Boryana Trusheva, Miguel Vilas-Boas, Michael Wilson & Catiana Zampini (2016): Standard methods for *Apis mellifera* propolis research, *Journal of Apicultural Research*, DOI: 10.1080/00218839.2016.1222661.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- Brazil. Ministry of Health. National Health Surveillance Agency (ANVISA). (2001, January 19). Normative Instruction n° 3: Technical Regulations of Identify and Quality of Bee Venom, Royal Bee, Jelly Wax, Lyophilized Royal Jelly, Bee Pollen, Propolis and Propolis Extract. Retrieved from <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798>
- Chen, C. T., Chien, Y. H., Yu, Y. H., & Chen, Y. W. (2019). Extraction and analysis of Taiwanese green propolis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (143), e58743.
- Chopra, S., Pillai, K.K., Husain, S.Z. y Giri, D.K. (1995). Propolis protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Experimental and Molecular Pathology*. 62: 190-198
- Cushnie, T.P.T. y Lamb, A.J. 2005a. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26:343-356.
- Cushnie, T.P. y Lamb, A.J. 2005b. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*. 101: 243-248.
- Devequi-Nunes D, Machado BAS, Barreto GdA, Rebouças Silva J, da Silva DF, da Rocha JLC, *et al.*, (2018) Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS ONE* 13(12): e0207676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207676>
- Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P., & Simonetti, P. (2007). Analysis of the polyphenolic fraction

of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(3), 390-399.

- Hernández Zarate, M. S., Abraham Juárez, M. D. R., Ceron García, A., Ozuna López, C., Gutiérrez Chávez, A. J., Segoviano Garfias, J. D. J. N., & Avila Ramos, F. (2018). Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Science and Technology*, 38, 210-215.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.
- Irmak, M.K., Fadillioglu, E. y Sogut, S. (2003). Effects of caffeic acid phenethyl ester and alpha-tocopherol on reperfusion injury in rat brain. *Cell Biochemistry and Function*. 21: 283-289.
- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013.
- Machado BAS, Silva RPD, Barreto GdA, Costa SS, Silva DFd, Brandão HN, *et al.* (2016) Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS ONE* 11(1): e0145954. doi:10.1371/journal.pone.0145954
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 50(1), 5-18.
- Martinsen, B. K., Aaby, K., & Skrede, G. (2020). Effect of temperature on stability of anthocyanins, ascorbic acid and color in strawberry and raspberry jams. *Food Chemistry*, 316, 126297.
- Maruta, H., & He, H. (2020). PAK1-blockers: Potential Therapeutics against COVID-19. *Medicine in drug discovery*, 6, 100039.
- Mora, D. P. P., Torres, O. M., Buitrago, M. R., & Garcia, O. A. T. (2019). Efecto de extractos de propóleos colombianos sobre la expresión génica de células cancerígenas. *Revista SayWa*, 1(1).
- Murray, S. K., Kurkul, C. M., Mularo, A. J., Hale, V. L., Adams, R. M., & Johnson, R. M. (2023). Antibacterial effects of propolis and brood comb extracts on the causative agent of European Foulbrood (*Melissococcus plutonius*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 1-10.
- Nader, R. A., Mackieh, R., Wehbe, R., El Obeid, D., Sabatier, J. M., & Fajloun, Z. (2021). Beehive products as antibacterial agents: a review. *Antibiotics*, 10(6), 717.
- NOM-003-SAG/GAN-2017. Norma Oficial Mexicana. Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. Diario Oficial de la Federación [DOF]. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2017).
- NOM-116-SSA1-1994, Bienes y servicios. Cereales y sus productos. Cereales secos y sus productos semielaborados. Harinas de cereales secos. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- Li-Chang, L., Yue-Wen, C. y Cheng-Chun, C. (2003). Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. *Journal of Food*

and Drug Analysis. 11(4): 277-282.

- Pahlavani, N., Sedaghat, A., Moghaddam, A. B., Kiapey, S. S. M., Navashenaq, J. G., Jarahi, L., & Ghayour-Mobarhan, M. (2019). Effects of propolis and melatonin on oxidative stress, inflammation, and clinical status in patients with primary sepsis: Study protocol and review on previous studies. *Clinical nutrition ESPEN*, 33, 125-131.
- Pavlovic, R., Borgonovo, G., Leoni, V., Giupponi, L., Ceciliani, G., Sala, S., ... & Giorgi, A. (2020). Effectiveness of different analytical methods for the characterization of propolis: A case of study in Northern Italy. *Molecules*, 25(3), 504.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., & Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(9), 2502-2506.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D., & Gniewosz, M. (2019). Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *Journal of food science and technology*, 56(12), 5386-5395.
- Popova, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G. L., & Sabatini, A. G. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38(3), 306-311.
- Popova, M., Giannopoulou, E., Skalicka-Woźniak, K., Graikou, K., Widelski, J., Bankova, V., ... & Chinou, I. (2017). Characterization and biological evaluation of propolis from Poland. *Molecules*, 22(7), 1159.
- Rodríguez Pérez, B., Canales Martínez, M. M., Penieres Carrillo, J. G., & Cruz Sánchez, T. A. (2020). Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of Mexican propolis. *Acta universitaria*, 30.
- Santos, L. M., Fonseca, M. S., Sokolonski, A. R., Deegan, K. R., Araújo, R. P., Umsza-Guez, M. A., ... & Machado, B. A. (2020). Propolis: Types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1369-1382.
- Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, 30(6), 894-905.
- Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M., & Juszczak, L. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Product Research*, 29(5), 416-422.
- Šuran, J., Capanec, I., Mašek, T., Radić, B., Radić, S., Tlak Gajger, I., & Vlainić, J. (2021). Propolis extract and its bioactive compounds—From traditional to modern extraction technologies. *Molecules*, 26(10), 2930.
- Sulaeman, A., Marliyati, S. A., & Fahrudin, M. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of stingless bee propolis from Indonesia. *Journal of Apicultural Science*, 63(1), 139-147.
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013.
- Wang, F., Yuan, J., Li, J., Liu, H., Wei, F., & Xuan, H. (2022). Antibacterial activity of Chinese

propolis and its synergy with  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(4), 1789-1797.

Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., Sánchez Escalante, J. J., & Sánchez-Escalante, A. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Biotecnia*, 16(1), 32-37.

Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Domínguez, Z., Robles, R., ... & Hernandez, J. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1747-1756.